Evaluación de la interacción de dos péptidos catiónicos sobre membranas de *Klebsiella pneumoniae* sensible mediante dinámica molecular

VALERIA ANDREA CORTÉS BARBOSA

Directora
***MSc*. Sandra Patricia Rivera Sánchez**
Codirector
PhD. Jose Fernando Oñate Garzòn

Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2021

Evaluación de la interacción de dos péptidos catiónicos sobre membranas de *Klebsiella pneumoniae* sensible mediante dinámica molecular

VALERIA ANDREA CORTÉS BARBOSA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Microbiólogo

Directora
***MSc.* Sandra Patricia Rivera Sánchez**
Codirector
PhD. Jose Fernando Oñate Garzón

Línea de Investigación:
Microbiología clínica
Grupo de Investigación:
GIMIA

Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2021

IMPACTOS

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	**Las interacciones moleculares presentadas por el péptido con la membrana de *Klebsiella pneumoniae,* puede evitar ensayos prolongados con antibióticos**	**Sector salud, Industrial y doméstico**
Científico	**Generación de conocimiento de alternativas terapéuticas frente a bacterias**	**Comunidad científica e interesados**
Técnico	**Técnicas efectivas para la evaluación de la capacidad antibacteriana de agentes terapéuticos**	**Personal técnico e interesados**
Ambiental	**Control ambiental mediante la disminución de ensayos, ya sean de los efluentes o sus derivados**	**Sector salud, Industrial y doméstico**
Social	**En términos de apropiación social de la ciencia se construye la participación activa de diversos grupos sociales.**	**Grupos sociales, personas que trabajan en ciencia, tecnología y ciudadanos**

Evaluación de la interacción de dos péptidos catiónicos sobre membranas de *Klebsiella pneumoniae* sensible mediante dinámica molecular

Valeria Andrea Cortés Barbosa [1], José Fernando Oñate Garzon[2], Sandra Patricia Rivera Sánchez [1,3].

[1]Grupo de investigación en microbiología, industrial y ambiental (GIMIA).
[2]Grupo de investigación en química y biotecnología (QUIBIO)
[3]Universidad Santiago de Cali, campus pampalinda calle 5 #62-00, Santiago de Cali, Colombia.

RESUMEN

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Uno de los principales factores por los que las cepas bacterianas (incluida *Klebsiella pneumoniae)* han perdido sensibilidad, se debe al uso continuo y al mal uso de los antibióticos. La investigación bacteriológica a lo largo de los últimos años demuestra la rápida progresión de la resistencia bacteriana a los antibióticos. en efecto, cada vez que se ha empleado un nuevo antibiótico las bacterias se han adaptado a él con mayor rapidez. La Organización Mundial de la Salud (OMS), enfatiza en la importancia y relevancia de este serio problema de salud global y en la necesidad de desarrollar nuevos antibióticos que ejerzan su actividad en blancos de acción distintos a los antibióticos convencionales, como por ejemplo, los péptidos antimicrobianos (PAMs).En este estudio el objetivo fue evaluar la interacción de dos péptidos uno ΔM2 derivado de Cecropina D con 39 aminoácidos y el otro buforina I en membranas de modelo que imitan bacterias de tipo salvaje (wild-type) de *K. pneumoniae* mediante dinámica molecular *in si*lico con el software GROMACS.
El estudio in silico se realizó para predecir interacciones específicas entre los aminoácidos del ΔM2 y buforina I y los lípidos del modelo de membranas. El análisis reveló que el péptido largo ΔM2 derivado de Cecropina D con 39 aminoácidos y buforina l, presentaron una mayor interacción con el fosfolípido 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfatidiletanolamina(POPE) formando interacciones de tipo de puentes de hidrógeno, existiendo una cualidad importante para la estabilidad de los péptidos y además permitiendo realizar aportes para fortalecer estudios posteriores los cuales ayuden en el desarrollo de nuevos fármacos.

Palabras clave: péptidos antimicrobianos (PAMs); buforina; *klebsiella pneumoniae*; dinámica molecular.

Evaluation of the interaction of two cationic peptides on membranes of sensitive *Klebsiella pneumoniae* by molecular dynamics

ABSTRACT

The study of the sensitivity of microorganisms to antimicrobials is one of the most important functions of clinical microbiology laboratories. One of the main factors why bacterial strains (including Klebsiella pneumoniae) have lost sensitivity is due to the continuous use and misuse of antibiotics. Bacteriological research over the last few years shows the rapid progression of bacterial resistance to antibiotics. in fact, each time a new antibiotic has been used, bacteria have adapted to it more rapidly. The World Health Organization (WHO) emphasizes the importance and relevance of this serious global health problem and the need to develop new antibiotics that exert their activity on targets other than conventional antibiotics, such as antimicrobial peptides (AMPs). In this study the objective was to evaluate the interaction of two peptides one ΔM2 derived from Cecropin D with 39 amino acids and the other buforin I in model membranes mimicking wild-type Klebsiella pneumoniae bacteria by in silico molecular dynamics using GROMACS software.
The in silico study was performed to predict specific interaction between the amino acids of ΔM2 and buforin I and the lipids of the model membranes. The analysis revealed that the long peptide ΔM2 derived from Cecropin D with 39 amino acids and buforin I, presented a greater interaction with the phospholipid 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-

3-phosphatidylethanolamine (POPE) forming hydrogen bridge type interactions, an important quality for the stability of the peptides and also allowing contributions to strengthen further studies which help in the development of new drugs.

Keywords: antimicrobial peptides (PAM); buforin; *klebsiella pneumoniae*; molecular dynamics.

INTRODUCCIÓN

Klebsiella pneumoniae es una bacteria Gram negativa, encapsulada, no móvil, fermenta la lactosa, anaerobio facultativo. Es encontrada en la flora normal de la boca, la piel y los intestinos. Es miembro importante del género de la enterobacterias. Además *K. pneumoniae* es un patógeno oportunista que puede causar enfermedades tales como sepsis, neumonía e infecciones del tracto urinario y de los tejidos blandos. La mayoría de las infecciones causadas por esta bacteria se presentan en personas que han estado en contacto con entidades asociadas al cuidado de pacientes, como personas hospitalizadas, inmunosuprimidos entre otras(1).

Debido a su frecuencia y mecanismos patogénicos que puede presentar, *K. pneumoniae* se ha considerado como una bacteria de gran importancia en la etiología de infecciones asociadas a instituciones hospitalarias o adquiridas en la comunidad con una presencia en UCI para adultos que supera el 15 % y en UCI para neonatales una frecuencia que supera el 10 %, por esta problemática la Organización Mundial de la Salud (OMS) publica su primera lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos. esta lista se divide en 3 categorías de acuerdo a la urgencia con la que necesitan nuevos antibióticos en las que se encuentra prioridad critica, elevada y media . En la prioridad critica incluye las bacterias enterobacteriáceas como *K. pneumoniae,* debido a que son bacterias que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales. Muchas de estas infecciones se están volviendo rápidamente resistentes a fármacos capaces de salvar vidas(2). Una de las causas relacionadas con esta problemática es el uso indiscriminado de los antibióticos. La falta de conocimiento de los mecanismos de resistencia de las bacterias ha llevado a una disminución acentuada de las opciones terapéuticas en los hospitales y en la comunidad. además este mal uso y abuso de los antibióticos representan uno de los principales factores que contribuyen a la resistencia antimicrobiana. Cabe recordar que estas bacterias cuando evolucionan y son capaces de adaptarse y resistir a los antibióticos estas infecciones se vuelven difíciles de tratar con los métodos convencionales o que se han llevado a la práctica durante años, por eso es de vital importancia buscar nuevas alternativas como vacunas, probióticos, bacteriófagos o los péptidos antimicrobianos(3).

Como se decían anteriormente, entre estas nuevas alternativas encontramos a los péptidos antimicrobianos (PAM) son moléculas relativamente pequeñas que contienen entre 12 y 60 aminoácidos, forman parte de la respuesta de defensa de diversas especies de organismos y participan mediando la respuesta primaria hacía varios patógenos como bacterias, parásitos, infecciones víricas y fúngicas. En mamíferos son sintetizados en la piel, mucosas o sitios propensos a las infecciones (4) . El mecanismo general por el cual los péptidos ejercen su acción consiste en dañar la membrana celular del patógeno. La interacción del PAM con el microorganismo es mediante fuerzas electrostáticas entre su residuo amino positivo y la carga negativa de la membrana celular del patógeno(5). Recientemente, se ha sugerido un mecanismo más específico para romper la barrera de permeabilidad de las membranas que implica que el agente catiónico antimicrobiano induce la separación de los componentes lipídicos zwitterionicos de los lípidos aniónicos y posiblemente la formación de defectos de límite de fase entre dominios lipídicos(6), mecanismo parecido al encontrado en este estudio. Sin embargo, las fases o dominios segregados en las membranas no provocan por sí mismos toxicidad, ya que se cree que los dominios están comúnmente presentes en membranas biológicas . Cuando los dominios se forman de forma aguda como consecuencia de la adición de un agente antimicrobiano, no hay tiempo suficiente para que la membrana se reorganice para acomodar este cambio en la organización(5). Tal mecanismo puede ser particularmente importante para compuestos antimicrobianos que tienen una secuencia rica en residuos catiónicos y tienen flexibilidad conformacional que puede adaptarse a la distancia entre cargas en la superficie de la membrana(45).La membrana bacteriana tiene

un papel importante en la supervivencia de las células bacterianas y en la potencia de los péptidos antimicrobianos para proteger al huésped(7). La mayoría de las membranas procariotas se constituyen principalmente por fosfatidiletanolamina (POPE), fosfatidilglicerol (POPG) y cardiolipina (PMCL). Los lípidos aniónicos predominantes en las membranas bacterianas son el fosfatidilglicerol (POPG) y la cardiolipina .(PMCL) pero esto puede ser POPG o PMCL o ambos y no depende de si es un organismo Gram negativo o Gram positivo. Es la exposición de los grupos fosfatos de estos lípidos aniónicos, zwiterionicos (6), junto con los grupos fosfatos de los lipopolisacáridos que proporciona la selectividad de los agentes antimicrobianos catiónicos para la toxicidad contra bacterias pero no contra células de mamíferos(46). Así mismo en la literatura se ha reportado que el porcentaje de lípidos en un aislado de *K. pneumoniae* son 82% de (POPE), 6% de (PMCL) y 5% de (POPG)(8).Actualmente, numerosas investigaciones se basan en la alteración de secuencias naturales para obtener péptidos modificados.(9) Adicionalmente, uno de los organismos más utilizados para aislar péptidos antimicrobianos es la polilla *Galleria mellonella (Lepidoptera: Pyralidae),* este organismo ha sido utilizado en diferentes estudios para evaluar la producción de PAMs debido a su fácil manipulación y alta producción proteica(10). Las cecropinas están constituidas por 34 y 39 aminoácidos, y tienen una estructura de doble hélice unidas entre sí por un lazo. La mayoría de las cecropinas son amidadas en la región C-terminal, y dicha amidación es importante para la interacción de las cecropinas con los lípidos, estando relacionada con la actividad antimicrobiana de amplio espectro(9). En un estudio reciente de Rivera *et al* (2020) (8), quienes investigaron la actividad antibacteriana in vitro de un péptido antimicrobiano catiónico (CAMP) sintético derivado del péptido similar a cecropina D de Galleria mellonella llamado ΔM2 contra cepas clínicas de *K. pneumoniae* (wild-type) y cepas multirresistentes de *K.pneumoniae,* obtuvieron la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los aislados de *K. pneumoniae* mostrando así susceptibilidad a ΔM2, con valores de MIC de 4 a 8 µg / mL para las cepas (wild-type) y de 8 a 16 µg / mL para las multirresistentes. Sin embargo, los valores de MIC encontrados aquí para los aislados clínicos fueron considerablemente más bajos en comparación con los reportados previamente para otros péptidos catiónicos(8).

En cuanto a la Buforina I, es un péptido de 39 aminoácidos que fue purificado y caracterizado por Park en 1996 del estómago del sapo asiático que mostró fuertes actividades antimicrobianas contra una amplia gama de microorganismos, incluidas bacterias Gram-positivos, Gram-negativos y hongos. En un investigación sobre La actividad antimicrobiana de la Buforina I esta se evaluó frente a 15 de las cepas bacterianas y fúngicas patógenas más importantes(11). Donde obtuvieron un rango de MIC entre 4 y 16 µg/mL. Buforina I no solo inhibió la formación de biopelículas, sino que también mostró una alta actividad de radiación de biopelículas. Buforina I fue estable en plasma humano y también a diferentes temperaturas. Aunque no se observaron propiedades anticancerígenas significativas para la Buforina I, la falta de citotoxicidad así como la falta de actividad hemolítica confirman su seguridad. El alto índice terapéutico indicó que la Buforina I tiene un potencial farmacéutico considerable y puede ser un candidato razonable para reemplazar a los antibióticos o administrarse en combinación con antibióticos para aumentar la eficacia y reducir la dosis de antibióticos(11). Debido a este potencial en la actividad antimicrobiana que presento la Buforina I, se empleó para este estudio in silico como un comparador.

Finalmente todo esto se puede llevar a cabo mediante la Dinámica Molecular, esta es una técnica de simulación molecular computacional que permite analizar el comportamiento o evolución de un sistema (físico, químico o biológico) a través del tiempo, calculando las fuerzas entre los átomos que lo conforman mediante distintos algoritmos(12). Es claro que los experimentos tienen un papel fundamental a la hora de validar los métodos de simulación. En el momento en que se desarrollan las investigaciones es imprescindible una acción interdisciplinar en la cual, experimentos teóricos complementen a los experimentales y viceversa. Así mismo, esta mutua colaboración enriquece las investigaciones y se generan resultados de mayor relevancia(13). A causa de esto, se utilizan los sistemas modelos de membrana artificial que facilita la compresión de los efectos de los lípidos de las membranas sobre la actividad de los fármacos, contando también con otros beneficios como su bajo costo; también se resalta que aún no se tienen datos de la interacción entre el péptido ΔM2 y el modelo de membranas *de K. pneumoniae* . Por ende, el objetivo de este estudio fue evaluar la interacción de dos péptidos: uno, ΔM2 derivado de Cecropina D con 39 aminoácidos y el otro, Buforina I en modelos de membranas que imitan bacterias de tipo salvaje (wild-type) de *K. pneumoniae* mediante dinámica molecular in sílico, hecho que contribuirá significativamente para continuar con la investigación de *K. pneumoniae* multirresistente a futuro. Así, conociendo el desempeño de los dos péptidos frente a *K. pneumoniae*, se podría dar a conocer cuál es la mejor alternativa

terapéutica para reducir la tasa de mortalidad y morbilidad en la problemática de la resistencia bacteriana. Además, estas simulaciones del péptido ΔM2 y la buforina I fueron realizadas para hacer comparaciones y poder dar a conocer su estado actual en nuestro medio.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Extracción de péptidos

El péptido largo catiónico está derivado de la secuencia del péptido neutro Gm cecropina D-like (WT) denominados ΔM2, con carga neta de +9 https://www.nature.com/articles/ja2016134. La Buforina I se escogió porque presenta 39 aminoácidos y se encuentra en la base de datos wangapd3 (https://wangapd3.com/database/query_output.php?ID=02264), dicha base de datos es original de péptidos antimicrobianos donde se selecciona manualmente en función de un conjunto de criterios de recopilación de datos, la cual contiene 3283 péptidos antimicrobianos de seis reinos(14).

2.2 Parámetros fisicoquímicos de los péptidos

La herramienta empleada para buscar los parámetros fisicoquímicos de los péptidos fue PEPCALCULATER (PepCalc.com - Peptide property calculator) https://pepcalc.com/ el cual es un servidor en línea que consiste en una calculadora de péptidos de innovagen donde se realiza cálculos y estimaciones sobre propiedades fisicoquímicas como: solubilidad en agua, carga neta del péptido, entre otras propiedades(15).

2.3 Modelado estructural *in sílico* de los péptido antimicrobianos.

Primero, se obtuvo el modelo estructura de los péptidos usando la plataforma PEP-FOLD 3 (PEP-FOLD 3 versión 2.0), este servidor es un enfoque de Novo, destinado a predecir estructuras de péptidos a partir de secuencias de aminoácidos, el cual está basado en la letra SA del alfabeto estructural para describir las conformaciones de cuatro residuos consecutivos, acoplándolo a un logaritmo y a un campo de fuerza(16) .

2.4. Validación

Mediante el uso de la plataforma I-TASSER(I-TASSER suite versión 5.1) que cuenta con un enfoque jerárquico para la predicción de la estructura de la proteína y la anotación de función basada en la estructura(17), se generaron modelos atómicos tridimensionales (3D) de los péptidos usando múltiples alineaciones de subprocesos contra la base de datos de estructura de proteínas RCSB protein data bank (https://www.rcsb.org/)(18), la cual es una base de datos de la estructura tridimensional de las proteínas, macromoléculas y ácidos nucleicos(18), donde la predicción estructural con mayor confianza según su puntaje fueron seleccionados. Además, para los mejores modelos, se verificó su calidad estereoquímica mediante gráficos de Ramachandran en MOLPROBITY (http://molprobity.biochem.duke.edu/). Este, es un servicio web de validación de estructuras que proporciona una evaluación sólida de amplio espectro de la calidad del modelo, tanto a nivel global como local; tanto para proteínas como para ácidos nucleicos(19). Todas las estructuras se visualizaron con PyMOL (PyMOL Versión 2.5.0) https://pymol.org/2/ y DISCOVERY (DISCOVERY Studio 2020) https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download.

2.5 Construcción *in sílico* de modelo de membrana de *Klebsiella pneumoniae*-Gram-negativa

El modelo de membrana de *K. pneumoniae* se desarrolló *in sílico* utilizando CHARMM-GUI (https://www.charmm-gui.org/), es una plataforma web, ideal para construir de forma interactiva sistemas complejos y preparar sus entradas con protocolos de simulación bien establecidos y reproducibles para simulaciones moleculares de última generación, utilizando paquetes de simulación como CHARMM, NAMD, GROMACS(20). Con la finalidad de poder construir una membrana que cumpliera con todos los parámetros necesarios para la realización de este trabajo, se continuó en la construcción del modelo de membrana de *K. pneumoniae* (wild type), donde se utilizaron 3 tipos de fosfolípidos, incluyendo 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfatidiletanolamina (POPE), cardiolipina (PMCL1) y 1-Palmitoil-2 -oleil-sn-glicero-3- (fosfo-rac- (1-glicerol)) (POPG). El número de moléculas en las monocapas externas e internas del modelo de membrana *in sílico* de *K. pneumoniae* (wild type), fue de 82 POPE, 6 PMCL1 y 5 POPG . Es importante resaltar que los péptidos se utilizaron para ensamblar sobre la superficie de la membrana para así realizar la simulación(21).

2.6 Predicción de la interacción molecular entre los péptidos antimicrobianos (PAMs) y *Klebsiella pneumoniae* sensible poblacional.

2.6.1. Energía de minimización y equilibración.

Para la simulación de dinámica molecular del péptido largo y la Buforina I se utilizó la Versión Nightly Build (2021-08-26) Linux-x86_64-multicore del software Gromacs (Gromacs 2020). En el método de colocación de iones, la concentración de NaCl fue de 0,5 M, con un espesor de agua de 22,5 Å y utilizando el campo de fuerza CHARMM-GUI (20), que es adecuado para describir la distribución de moléculas dentro de un sistema grande como membranas. Los sistemas se ajustaron lentamente calentando a una temperatura de 310 ° K a 1 fs (femtosegundo) / paso durante 75 ps (picosegundos) para garantizar que el sistema no presentara choques estéricos o geometría inapropiada y a 2 fs/ paso durante 300 ps en el paso de equilibrio(22).

La minimización de energía del sistema se obtuvo utilizando el algoritmo de descenso más empinado con un valor de tolerancia de 1000 kJ mol^{-1} nm^{-1}en 5000 pasos con el esquema de corte Verlet. Se utilizó el algoritmo de Berendsen para 5000000 n pasos para equilibrar la temperatura y la presión del sistema. Al equilibrar el sistema, la MD de producción para la recopilación de datos se ejecutará durante 10 nanosegundos (ns), utilizando los algoritmos Nose-Hoover y Parrinello-Rahman para ajustar la temperatura y la presión. Se aplicará la suma de Particle Mesh Ewald (PME) para corregir las interacciones electrostáticas de largo alcance(23).

2.6.2. Dinámica molecular (MD)

Se ejecutó la dinámica molecular (MD) de producción para la recogida de datos durante 10 ns, ya que es el tiempo suficiente para saber si hay o no, un contacto entre el péptido y la membrana; para la dinámica molecular, se utilizó un límite libre de 12 Å simulando durante 10 nanosegundos; la suma de Particle Mesh Ewald (PME) se aplicó para corregir interacciones electrostáticas de largo alcance; los enlaces que contienen átomos de hidrógeno involucrados, se restringieron mediante el algoritmo SHAKE a sus valores de energía minimizados, lo que permitió utilizar un intervalo de tiempo de integración numérica de 2 fs en la simulación(22).

2.6.3. Análisis de la dinámica molecular (MD)

Para comprender el mecanismo de acción de los péptidos, se analizó la interacción entre los péptidos y fosfolípidos utilizando GROMACS (Gromacs 2020) https://manual.gromacs.org/documentation/(24); se calculó también, la desviación cuadrática media (RMSD), el radio de giro y los enlaces de hidrógeno de la molécula; se contó con la distribución de densidad parcial de la molécula y los fosfolípidos en la dirección del eje z; se analizó la interacción

entre los péptidos y los fosfolípidos utilizando las versiones académicas de PYMOL (PyMOL Versión 2.5.0) https://pymol.org/ (25) y Discovery Studio Visualizer (DISCOVERY Studio 2020) http://accelrys.com ;para determinar la estabilidad de esta estructura durante los 10 nanosegundos ns o 10,000 ps, se utilizaron Visual Molecular Dynamics (VMD) (Visual Molecular Dynamics Versión 1.9.3 (2016-11-30) https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/ ; además, se utilizaron los fosfolípidos obtenidos de la revisión bibliográfica; finalmente, se analizó la interacción entre el péptido y los fosfolípidos utilizando las versiones académicas de PYMOL (PyMOL Versión 2.5.0) https://pymol.org/2/ y Discovery Studio Visualizer (DISCOVERY Studio 2020) (http://accelrys.com) (26).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Parámetros fisicoquímicos

En la Tabla 1. Se observan los parámetros fisicoquímicos tanto del péptido ΔM2 a evaluar como el de la buforina I, donde se obtiene una hidrofobicidad más alta de parte del péptido ΔM2 en comparación con la hidrofobicidad de la buforina I, por otro lado los dos péptidos cuentan con carga neta positiva y el mismo tamaño de longitud.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos del péptido ΔM2 y la buforina I.

péptidos	secuencia	Carga neta	hidrofobicidad	Longitud	Solubilidad
Péptido ΔM2	RNFFKRIRRAGKRIRKAIISAAPAVETLAQAQKIIKGGD	+9	46.27	39	Alta
Buforina I	AGRGKQGGKVRAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNY	+12	23.50	39	Alta

En la **tabla 1** se observa que tanto el péptido ΔM2 como la buforina I presentan cargas catiónicas de +9 y +12 lo que es bueno para predecir algún tipo de interacción entre la carga catiónica de los péptidos y la carga aniónica presente de las membranas de la bacterias Gram-negativas de *K. pneumoniae* (wild type). Las membranas citoplasmáticas bacterianas son ricas en fosfolípidos aniónicos, los cuales le confiere una carga negativa a la superficie. Además, la superficie bacteriana contiene otros componentes aniónicos que contribuyen con la carga negativa. Por lo tanto, la carga es un parámetro importante en el mecanismo de acción de los péptidos(9). Los péptidos antimicrobianos poseen diversas características fisicoquímicas y estructurales, las cuales se deben tener en cuenta porque desempeñan un papel fundamental en la regulación de su actividad antimicrobiana, su mecanismo de acción y mejorar la selectividad de los péptidos. Como se evidencia en la **tabla 1** los péptidos usados en este estudio no sobrepasaron el umbral de hidrofobicidad del 50%, lo que nos puede ir orientando a una alta probabilidad de su interacción con las membranas bacterianas y posterior inserción.

Las membranas citoplasmáticas son ricas en fosfolípidos aniónicos y los péptidos antimicrobianos son catiónicos con cargas de +9 y +12. La carga es responsable de las interacciones electrostáticas iniciales entre el péptido y la membrana microbiana aniónica. Además, varios estudios apoyan que el aumento de la carga en una secuencia de péptidos mejora la actividad antimicrobiana(27).Un ejemplo de esto es un estudio donde realizaron modificaciones en la carga de una secuencia molde del péptido P19, mientras que la hidrofobicidad, anfipaticidad y el grado de estructuración en varios análogos eran conservados, observando así que la reducción de la carga (desde +6 hasta +1) estaba asociada con la disminución de la actividad antimicrobiana en bacterias Gram-negativas(9). también se ha realizado estudios de péptidos extraídos de cecropina, dicho péptido presentaba una carga +5 el cual no obtuvo una buena actividad antimicrobiana presentando una MIC de 32 y 256 µg/ml (21).debido a esto es de suma importancia tener en cuenta la carga de los péptidos para estudios posteriores.

Otro parámetro es la hidrofobicidad del péptido, la cual es definida como el porcentaje de residuos hidrofóbicos dentro de la secuencia, esta es aproximadamente del 50% para la mayoría de los PAMs aislados naturalmente y este parámetro determina la extensión de la partición del péptido dentro del núcleo hidrofóbico de la membrana. De hecho, los péptidos con valores de hidrofobicidad superiores al 50% son asociados con actividades hemolíticas muy altas y con una actividad antimicrobiana disminuida. Esto se debe a que cuando se incrementan los niveles de hidrofobicidad por encima del umbral del 50%, se incrementa la dimerización u oligomerización de los péptidos reduciendo las moléculas en solución lo que disminuye la actividad antimicrobiana deseada(9). Los péptidos alfa-helicoidales han sido en recientes estudios reportados como insecticidas; son catiónicos, y poseen un porcentaje de hidrofobicidad entre 40% y 65%, características que se consideran importantes para la interacción con las fracciones lipídicas de las membranas(28).

En otro estudio sobre el Papel de la hidrofobicidad del péptido en el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos alfa-helicoidales, estos autores pudieron observar de que existe una correlación entre la hidrofobicidad del péptido y la actividad hemolítica puede explicarse por el mecanismo de discriminación de membrana. Los péptidos con mayor hidrofobicidad penetrarán más profundamente en el núcleo hidrofóbico de la membrana de los glóbulos rojos y la baja hidrofobicidad evita que las moléculas peptídicas entren en la membrana citoplasmática de los eritrocitos para causar hemólisis. El hecho de que las actividades antimicrobianas de los péptidos se vuelven más débiles con la disminución de la hidrofobicidad se puede atribuir a la mayor solubilidad de estos péptidos en un entorno acuoso; e incluso si los péptidos alcanzan la superficie de la membrana (a través de una atracción inicial de los residuos cargados positivamente en el péptido con la superficie cargada negativamente de los grupos de cabeza de fosfolípidos), la hidrofobicidad general del péptido debe ser lo suficientemente grande como para permitir que se divida en el componente hidrofóbico del lípido, donde se induce la estructura de hélice α del péptido para maximizar las interacciones hidrofóbicas de la cara no polar de la hélice α anfipática y el lípido. No se comprende bien exactamente cómo el péptido rompe la membrana para una discusión más extensa de la interacción de los péptidos antimicrobianos con las membranas. Pero estos autores creen que existe un umbral de hidrofobicidad relacionado con la actividad antimicrobiana del péptido; es decir, se puede ajustar la hidrofobicidad del péptido para obtener la actividad antimicrobiana óptima(29).

3.2 Estructura de los péptidos

Esta relación estructura-actividad según en investigación corresponde a una eficiente actividad antimicrobiana(9) es decir que al mantenerse estable tiene mayor potencial como antimicrobiano; por lo tanto, para determinar la estabilidad de esta estructura se realizó una trayectoria con un tiempo de 10 (ns) los cuales no fueron suficientes para saber si ocurría algún tipo de interacción entre los péptidos y el modelo de membrana de *K. pneumoniae* (wild type). Se seleccionaron en Molprobity los modelos que tenían más del 85% de residuos de aminoácidos en las regiones favorecidas y adicionales permitidas, Los modelos seleccionados son los que se observan en la **figura 1** donde se muestra las estructuras de los péptidos, para así poder evidenciar que estás no sufrieron alguna variabilidad en cuanto a su estructura, además se pudo encontrar que por parte del péptido ΔM2
y la buforina I, al inicio de sus respectivas regiones favorecidas se presentaron los residuos de aminoácidos como la arginina, lisina y alanina, los cuales permiten interactuar con los lípidos de las membranas. Esto genera una estructura α-helicoidal anfipática, que proporciona la posibilidad de insertarse en el sector hidrofóbico de las bicapas lipídicas bacterianas y causar daños letales (9) pero en este estudio no se observó inserción a los 10 ns. La relación entre estructura-actividad ha sido una herramienta de gran uso para el estudio de la actividad biológica de los PAMs hacia los microorganismos(30). Un ejemplo de esto es un estudio donde se utilizó un péptido alfa-helicoidal para estudiar los efectos de hidrofobicidad del péptido sobre el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos. donde reemplazaron residuos de leucina con residuos de alanina menos hidrofóbicos o los de alanina con los de leucina más hidrofóbicos en la cara no polar de la hélice. Ahí concluyeron que una mayor hidrofobicidad se correlaciono con una mayor actividad hemolítica. Mientras una hidrofobicidad optima se podía obtener una alta actividad antimicrobiana(29).

Es importante clarificar, que entre las estructuras, la más común es la hélice α, ya que las otras no son tan favorables energéticamente por una configuración robusta. La segunda estructura estable formada por puentes

de hidrógeno se conoce como hojas β(31).En el caso de la hélice α, la cadena adopta una estructura helicoidal, que se mantiene mediante puentes de hidrógeno con los grupos R orientados hacia el exterior. Para formar esta estructura, el grupo carboxilo de cada aminoácido (n) se une mediante un puente de hidrógeno al grupo amino de otro aminoácido (n+4). Todos los péptidos tienen un grupo amino en un extremo y un grupo carboxilo en el otro, lo que los hace ser estructuras muy estables, dando lugar a un máximo número de interacciones(32). Además los péptidos alfa-helicoidales han sido en recientes estudios reportados como insecticidas; son catiónicos, y poseen un porcentaje de hidrofobicidad entre 40% y 65%, características que se consideran importantes para la interacción con las fracciones lipídicas de las membranas. No obstante, el estudio de su efectividad sobre otros modelos celulares como bacterias, levaduras y eritrocitos, ha permitido conocer su capacidad citolítica(23).

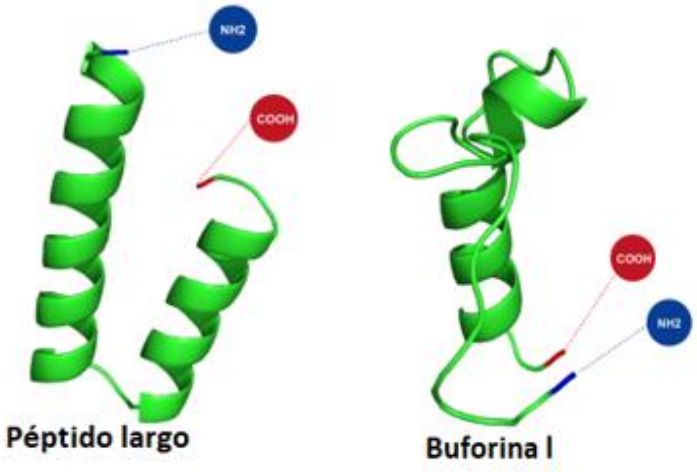


Figura 1. Estructura de los péptidos ΔM2 y la Buforina I con sus respectivos grupos NH2- terminal y COOH terminal.

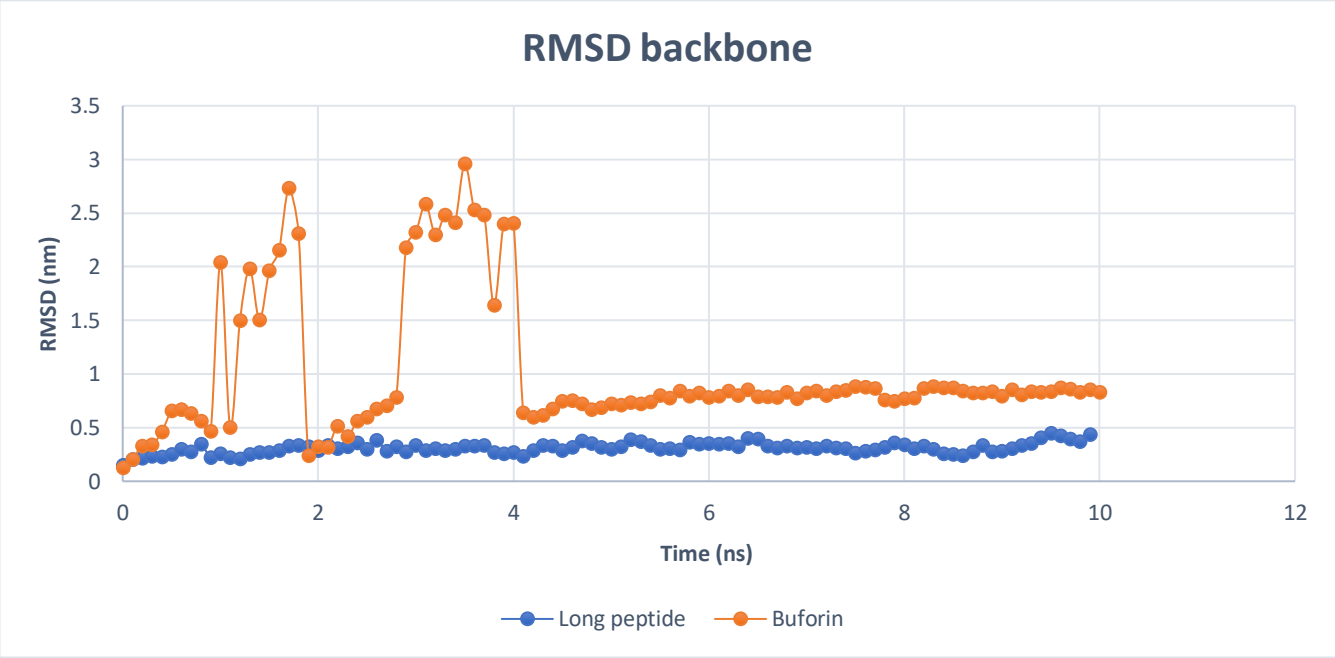
3.3 Predicción de la interacción molecular entre los (PAMs) y *Klebsiella pneumoniae* sensible poblacional.

El péptido ΔM2 derivado de la cecropina D y la buforina I, fueron elegidos para el modelado molecular y el ensayo in sílico porque presentaban similitudes en cuanto a sus propiedades, las cuales se tuvieron en cuenta para llevar a cabo este estudio, como la longitud, es decir, cada péptido presentaba una secuencia de 39 aminoácidos y además, tienen cargas netas catiónicas mostrando cargas positivas de +9 y +12, factores fisicoquímicos importantes, los que fueron considerados para poder llevar a cabo este estudio.

Los enfoques computacionales pueden ser valiosos para optimizar los AMP para contrastar los mecanismos de resistencia. Se conoce que los estudios tradicionales de diseño y optimización de péptidos son costosos y requieren mucho tiempo. Un enfoque racional in sílico para el diseño de AMP puede reducir drásticamente los costos de producción, el tiempo requerido para la evaluación de la actividad, la toxicidad y sobre todo en la actualidad hay muchos péptidos sin estudiar(33). El objetivo de estos alineamientos consiste en establecer la equivalencia entre dos o más estructuras según su forma y conformación tridimensional. Por lo tanto, un parámetro importante en este tipo de alineamiento es la desviación cuadrática media, en inglés Root Mean Squared Deviation (RMSD), el RMSD, es una distancia media cuadrática mínima entre las estructuras básicas de las proteínas superpuestas. Este valor RMSD puede ser utilizado para estudiar el grado de divergencia de las estructuras alineadas (por movimientos). A mayor valor RMSD, mayores son las diferencias(28). Este parámetro se ha utilizado para guiar el estudio del péptido ΔM2 y la buforina I en el sistema de modelo de membrana de *K.*

pneumoniae (wild type) durante 10ns; como lo muestra la **figura 2.** El (RMSD) con un tiempo de 0 a 10 ns, logro evidenciar variaciones del péptido ΔM2 y de la buforina I.
la buforina I presento unas fluctuaciones mucho más fuertes entre los tiempos de 1 a 4 ns, es decir, hubo un mayor movimiento por parte de la buforina I, dándonos a mostrar que la buforina I realizo mayores movimientos para tratar de anclarse a la membrana durante la simulación de los 10 ns por lo tanto esta discrepa de las coordenadas iniciales, mostrando mayores diferencias y cambios en su estructura inicial las cuales fueron registradas por parte del RMSD, mientras que el péptido ΔM2 permaneció más estable en su trayectoria.

En otros estudios de DM utilizados para predecir la interacción entre un péptido de 18 aminoácidos (ΔM1) y modelos de membrana de *K. pneumoniae*, en el análisis del RMSD al final de los 5ns en las membranas de *K. pneumoniae* el péptido se dobló por la mitad perdiendo su estructura inicial, debido a la presencia de mayores interacciones con POPE y enlaces de hidrógeno que afectaron la estabilidad del péptido(21).



La figura 2. Comparación de la desviación cuadrática media de la raíz (RMSD) del péptido largo y la buforina I en el modelo de membrana de *K.pneumoniae* (wild type).

3.4. Evaluación *in sílico* de la interacción molecular de los dos péptidos a *Klebsiella Pneumoniae* sensible.

La estructura secundaria más común de los Péptidos antimicrobianos es la hélice α, debido a la importancia de sus interacciones con proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de las membranas celulares. De hecho, el tipo de fosfolípido modula las interacciones con el péptido, incidiendo en la estabilidad de su estructura y por lo tanto en su actividad [25]. Esta flexibilidad en la región central del péptido ΔM2 puede reflejar una bisagra que facilita el contacto con la región apolar de los fosfolípidos, permitiendo que el péptido interactue con la membrana de *K. Pneumoniae* (34).La **Figura 3,** muestra los efectos en la estructura, al interactuar el péptido ΔM2 sobre la membrana modelo de *K. pneumoniae:*

En el trascurso de los 10 ns el contacto que se presenció entre el peptido ΔM2 con la membrana de *K. pneumoniae* (wild type), no fue muy drástico de la configuración estructural inicial del péptido ΔM2; lo que nos da a conocer

que el péptido durante su trayectoria permaneció estable; siendo esto importante porque la estabilidad, es una propiedad estructural para la actividad antibacteriana(3). También la presencia de algunos residuos como lo son arginina genera cambios significativos ya que la carga catiónica de Arg proporciona un medio eficaz para atraer los péptidos a las membranas diana y el enlace de hidrógeno facilita su interacción con superficies cargadas negativamente como lipopolisacáridos, ácido teicoico o grupos de cabeza de fosfolípidos(35).

Otros estudios, mostraron que la dinámica molecular para predecir la interacción entre un péptido corto de 18 aminoácidos ΔM1 y modelos de membrana de *K. pneumoniae (wild type)* presento una pérdida de la estructura del péptido corto de 18 aminoácidos ΔM1, dicha pérdida se le atribuye a la presencia de mayores interacciones con POPE, principalmente mediante enlaces de hidrógeno, los cuales afectaron la estabilidad del péptido y por ende relacionado con la actividad antimicrobiana(3). La interacción inicial de los péptidos antimicrobianos con las bacterias, generalmente, es producida por su carga positiva y su atracción electrostática hacia las superficies polianiónicas de las paredes, ya sea por los ácidos teicoicos y lipoteicoicos en los Gram positivos o los lipopolisacáridos en los Gram negativos(36). Después de esta interacción los péptidos antimicrobianos generan áreas de inestabilidad en la membrana externa, permitiendo la translocación de estos mismos a través de la bicapa externa; una vez localizados en la membrana, pueden sufrir modificaciones en su conformación y producir daños en la membrana o internamente (37).En otras bacterias, los polisacáridos de la cápsula limitan la interacción de los péptidos antimicrobianos con sus objetivos de membrana, lo que demuestra que los mutantes sin cápsula de *K. Pneumoniae* son más sensibles a la muerte por los péptidos antimicrobianos(38).

Otros autores discuten que los péptidos generalmente no están estructurados en solución, pero debido a su carga catiónica, son atraídos electrostáticamente a las membranas bacterianas aniónicas donde tienden a volverse helicoidales. Esta primera interacción inicial de los péptidos con la hoja externa de la membrana bacteriana citoplasmática es un paso determinante crucial en los eventos que conducen a su actividad bacteriostática o bactericida. De ahí la importancia de comprender cómo esta interacción afecta los reordenamientos en la membrana resultantes de la segregación apartando los lípidos aniónicos de los lípidos zwitteroinicos, frente a la formación de defectos y la eficiencia permeabilizante(39). La fuerte correlación entre la capacidad de ciertos péptidos para inducir la agrupación de lípidos y su toxicidad solo para bacterias que contienen lípidos aniónicos y zwitteriónicos en sus membranas sugiere que este fenómeno contribuye a las actividades antimicrobianas solo de ciertos agentes antimicrobianos. Sin embargo, no se conoce el mecanismo exacto por el cual la segregación de lípidos de membrana en las bacterias conduce a la toxicidad, aunque varios procesos pueden contribuir a este nuevo mecanismo antimicrobiano. La agrupación de lípidos dará como resultado límites entre estos grupos y el resto de la membrana. Tal límite tendrá una línea de tensión que provocará la formación de defectos y disminuirá la resistencia de la membrana. Un defecto menor puede permitir una mayor permeabilidad solo cuando la membrana está bajo tensión. Un defecto mayor puede permitir la disipación del gradiente electroquímico. Un defecto mucho mayor permitiría el paso de moléculas polares más grandes y se acercaría a las propiedades de un poro. La agrupación de lípidos aniónicos por los agentes antimicrobianos catiónicos también podría eliminar estos lípidos de los dominios bacterianos existentes, dañando el funcionamiento biológico de estos dominios. No se debe ver estos mecanismos como alternativas sino como una combinación de mecanismos(40). Por lo anterior se puede concluir que estos mecanismos de acción son similares a los encontrados en este estudio.

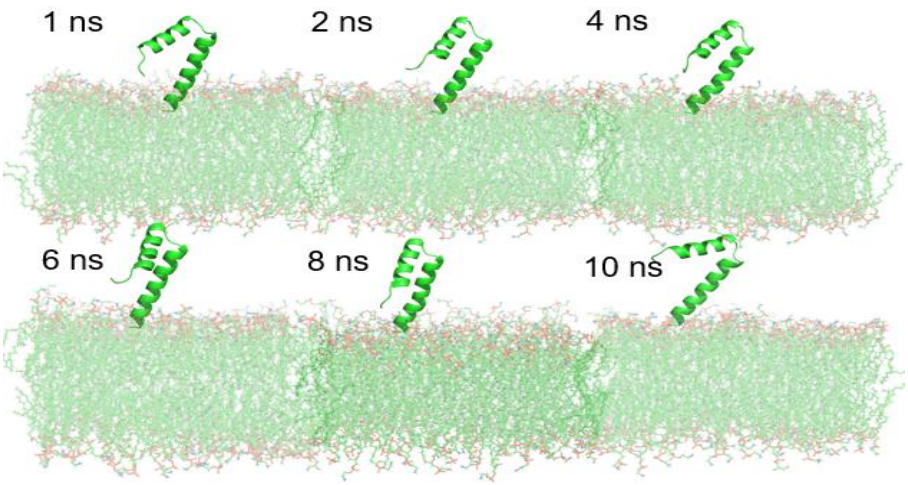


Figura 3. Estructuras 3D obtenida de la simulación con dinámica molecular en diferentes momentos en nanosegundos A)Estructura 3D del péptido ΔM2 en *K.pneumoniae* modelo de membrana durante 1,2,4,6,8 y 10ns.

En la **Figura 4A**. Se muestra las interacciones detalladas del péptido ΔM2 con los fosfolípidos presentes en la membrana de *K. pneumoniae*,(wild type) en el tiempo de 10 ns. En donde se presentó una mayor participación de parte del fosfolípido POPE a través de enlaces de hidrógeno y sus interacciones electrostáticas. Sin embargo, el residuo arginina en la posición 6 (arg6) interactuó con el fosfolípido POPE solamente a través de enlaces de hidrógeno, mientras los residuos de arginina en la posición 1 (arg1), lisina en la posición 5 (lys5),isoleucina en la posición 8(ile8) y fenilalanina en la posición 4 (phe4) presentaron interacciones con enlaces de hidrógeno y electrostáticas, todas con el mismo fosfolípido POPE, es de resaltar que estas interacciones son las que estuvieron más cerca y en mayor contacto con el modelo de membrana de *K.pneumoniae* (wild type). Las interacciones electroestáticas, están involucradas en el evento de unión donde se encuentran cargados positivamente y se dan entre los residuos lisina, arginina, histidina, tirosina(41). La relación entre la estabilidad estructural del péptido y su actividad antimicrobiana proporcionada por la interacción de residuos de arginina y fosfolípidos de la membrana se ha informado previamente. Aunque es evidente una relación entre los residuos de arginina y el efecto antibacteriano de los péptidos, no está del todo claro qué propiedades específicas contribuyen a esta actividad. Se podría inferir una relación probable para la interacción entre los residuos de arginina de los péptidos helicoidales y los fosfolípidos aniónicos en las membranas de las bacterias, como el fosfolípido POPG(3). Por lo tanto, se pueden formar puentes salinos e interacciones electrostáticas entre la cadena lateral (grupos amino) de los residuos de arginina en los extremos de la hélice alfa del péptido y los fosfatos en el grupo de POPG.

La (**figura 4B**) muestra los tipos de interacción HB: enlaces de hidrógeno, HI: hidrofobicidad y EI: electrostáticas que estuvieron en mayor contacto con el modelo de membrana de *K.pneumoniae.* Aquí, los residuos de arginina (arg15), treonina (thr27) glicina (gly11) y serina (ser20) fueron los que presentaron el mayor número de interacciones de tipo de enlaces de hidrogeno (HB), los cuales se forman cuando se comparte un protón entre dos moléculas, formando un enlace débil(32). Las interacciones por puentes de hidrógeno son generados en las cadenas laterales dentro del bolsillo hidrofóbico que posee la diana en su sitio activo(42). estos aminoácidos se denominan estándar, debido a que estas moléculas contienen un átomo de carbono central (el carbono α) al que están unidos un grupo amino, un grupo carboxilato, un átomo de hidrógeno y un grupo R (cadena lateral).
El residuo arginina (arg8) fue el único que presentó interacciones de tipo hidrofóbicas (HI) durante los 10 ns. Cabe decir, que la hidrofobicidad es el parámetro que determina la extensión de la partición del péptido dentro del núcleo hidrofóbico de la membrana. Las interacciones hidrófobas, suelen disponerse en el interior de la proteína evitando de esta manera las interacciones con el agua interviniendo en el correcto plegamiento de la proteína(43).
Estas interacciones permiten la entrada del péptido en la membrana bacteriana y simultáneamente contribuyen a la estabilidad de su estructura helicoidal. Además, estas interacciones interrumpen la estructura de la bicapa lipídica, probablemente induciendo la separación lateral de los fosfolípidos debido a las interacciones entre sus

cabezas polares y los residuos catiónicos del péptido. Este fenómeno facilita la interacción del péptido ΔM2 en la membrana al desplazar lateralmente los fosfolípidos y reorganizar los lípidos aniónicos en un dominio separado(3). Además los aminoácidos como glicina, lisina y serina son un elemento fundamental para la interacción con las membranas, de igual manera se ha encontrado en la literatura que arginina es uno de los residuos que más se encuentran en estos procesos(22), como es el caso de este trabajo en el cual se encontró presente la arginina durante los 10 ns.

en un estudio realizaron un diseño racional de péptidos antimicrobianos α -helicoidales con actividades mejoradas y especificidad/índice terapéutico(44), en el cual utilizaron un péptido transmembrana helicoidal *α* basado en polileucina para demostrar que el péptido reducía la temperatura de transición de fase en mayor medida en las bicapas de fosfatidiletanolamina (POPE) que en las bicapas de fosfatidilcolina (POPG) o fosfatidilglicerol, lo que indica una mayor alteración de la organización de POPE. Ahí concluyeron que la especificidad antimicrobiana de los péptidos antimicrobianos α -helicoidales es el resultado de las diferencias en la composición de la bicapa lipídica entre las células eucariotas y bacterianas(44).

Por otro lado, en este estudio el péptido ΔM2 presentó una mayor estabilidad de su estructura donde se evidencio mayor interacción con el fosfolípido POPE, principalmente enlaces de hidrógeno y electrostáticas.
En otros estudios realizados sobre dinámica molecular para predecir la interacción entre un péptido corto de 18 aminoácidos ΔM1 y modelos de membrana de *K. pneumoniae (wild type),* evidenciaron una pérdida de la estructura inicial a los 5ns(3), debido a la presencia de mayores interacciones con POPE, principalmente enlaces de hidrógeno que afectaron la estabilidad del péptido durante su trayectoria.

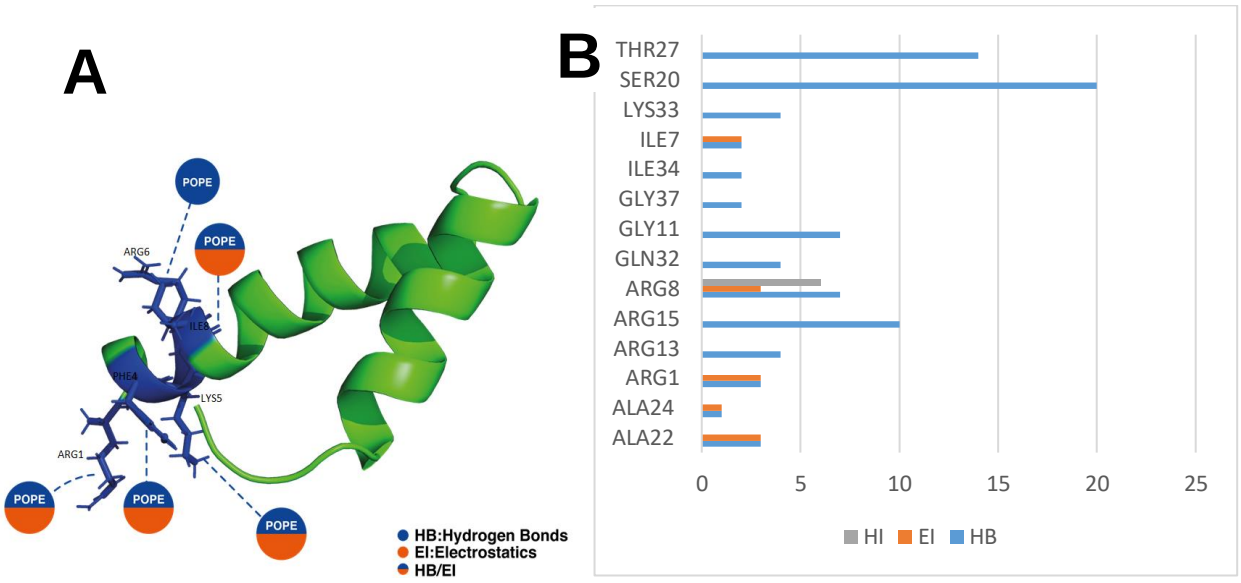


Figura 4. Interacciones de los residuos del péptido ΔM2 A) estructura 3D del péptido ΔM2 de interacciones con fosfolípidos que estuvieron en contacto con el modelo de membrana de *K.pneumoniae* durante los 10 ns. B) residuos del péptido ΔM2 que interactuaron con mayor frecuencia en el modelo de membrana de *K.pneumoniae*

3.4.1 BUFORINA I

La Buforina I (Buf) surgen como una alternativa, por sus destacadas propiedades antimicrobianas particularmente contra bacterias. De hecho, estudios recientes sugieren que varios AMP muestran actividad antiendotoxina que es estimulada por la unión del péptido al lipopolisacárido bacteriano (LPS) y al ácido lipoteicoico, lo que da como resultado la prevención de la sepsis y el shock séptico asociados con la presencia de patógenos Gram-negativos(45). La buforina I es un AMP de 39 aminoácidos que se aisló por primera vez del tejido del estómago del sapo asiático *Bufo bufo gargarizans*(46). La buforina I destaca el papel de las histonas en la inmunidad innata. De hecho, las buforinas inactivan a un microorganismo al translocarse al interior de la célula, sin permeabilización de la membrana y, por tanto, se unen a los ácidos nucleicos(46).

En la **figura 5A** se obtuvo el perfil de densidad de los fosfolípidos (POPE:POPG:CL) y agua (TIP3) de las membranas de *K. pneumoniae* (wild type) en presencia del ligando a lo largo del eje; Allí se observó una mayor asimetría de la densidad de POPE en comparación con el resto de los fosfolípidos de las membranas de *K.pneumoniae*. Estas asimetrías en la densidad de los fosfolípidos de la membrana pueden explicarse por las interacciones con la buforina, debido a que se observaron interacciones como puentes de hidrógeno. También se evidenciaron unos cambios conformacionales de 5.3nm de parte del fosfolípido POPE en la membrana de *K pneumoniae*, mientras que se encontraron menos interacciones con el fosfolipido POPG. Aunque *K. pneumoniae* es una bacteria Gram-negativa, su estructura de membrana difieren mucho, particularmente en la proporción de fosfolípidos POPE y POPG.(3) Por ejemplo: *K. pneumoniae* tiene una mayor proporción de POPE, lo que incrementó la interacción del péptido con este fosfolípido(3).

En la **figura 5B.** se observan los primeros momentos donde empieza a desestabilizarse la estructura de la buforina I, la cual ocurre desde el inicio hasta los 4 ns de trayectoria lo que demuestra que hubo unos cambios respectivos en la estructura durante ese tiempo que pueden ser considerables a la conformación general del sistema durante su trayectoria de 10ns. Esta desestabilización de la estructura secundaria del péptido, puede estar relacionado con la disminución de la actividad antimicrobiana en *K. pneumoniae* (11). Debido a que en otros estudios in sílico realizados con la buforina I, donde se ha estudiado la relación de la estabilidad térmica y su estructura, se demostró cuánto cambia la estructura del péptido con respecto a la estructura inicial en el transcurso de la simulación al aumentar la temperatura del sistema, así, mostrando una diferencia significativa tanto en su estructura como actividad antimicrobiana. Debido a esto, es importante estudiar la estabilidad de los péptidos a diferentes temperaturas para predecir su comportamiento durante los procesos. En general, los péptidos antimicrobianos debido a estructuras simples, secuencias de aminoácidos cortas y falta de estructuras tercera y cuarta, son estables a altas temperaturas. Sin embargo, el residuo (Pro) prolina, que induce una torcedura en la hélice α de la familia de las buforinas, es la característica estructural clave requerida para la propiedad de penetración celular que conduce a los microbicidas y su relación con el movimiento en la estructura(11). Se ha demostrado que la prolina está directa mente involucrada en el paso del AMP a través de la membrana de las bacterias, con independencia de que exista un receptor, sin alterar la membrana. Luego de atravesar dicha membrana, interactúa con el ADN de la bacteria para, finalmente, interrumpir los procesos vitales de la misma. La prolina es un residuo de rompimiento de la hélice, el cual cambia la dirección de la cadena polipeptídica(47)

Aunque los estudios de laboratorio proporcionan una visión general de la estabilidad del péptido a diferentes temperaturas, no se proporciona información sobre los posibles cambios estructurales debido a la exposición a altas temperaturas. Por lo tanto, los estudios de bioinformática son valiosos en este sentido(11).

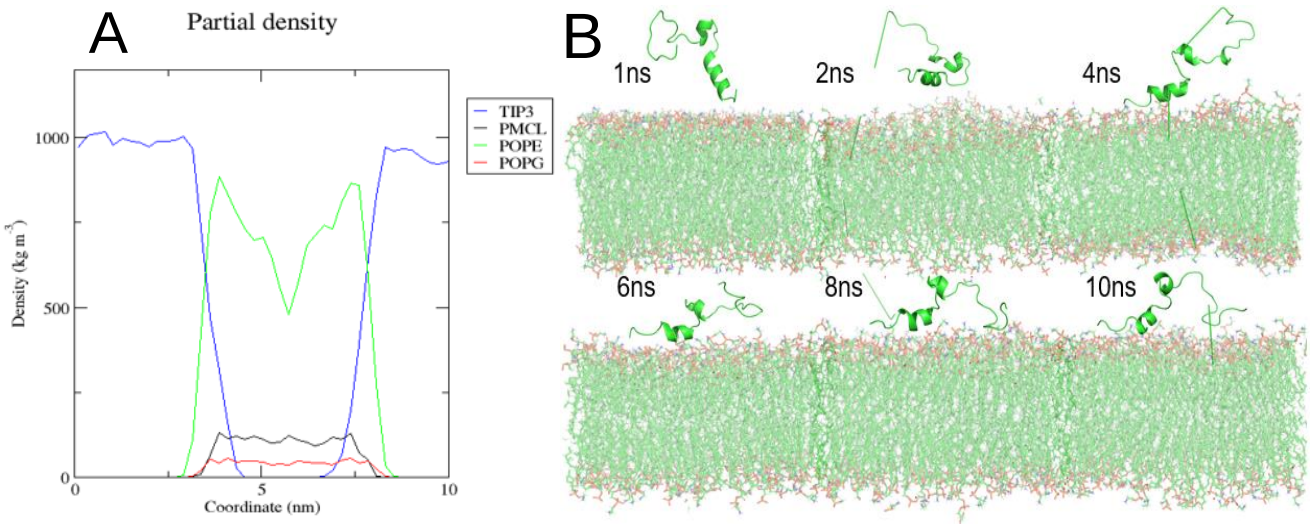


Figura 5. Efectos de la buforina I sobre la membrana modelo de *K. pneumoniae* sensible poblacional. A) densidad parcial de la buforina I con los fosfolípidos y la molécula de agua obtenido por medio de la simulación con dinámica molecular. B)Estructura 3D de la buforina I en el modelo de membrana de *K.pneumoniae* registradas durante 1,2,4,6,8 y 10ns.

En la **Figura 6A.** Se muestra las interacciones detalladas de la buforina I con los fosfolípidos presentes en la membrana de *K. pneumoniae*,(wild type) durante los 10 ns. En donde se presentó una mayor participación de parte del fosfolípido POPE a través de enlaces de hidrogeno y sus interacciones electrostáticas , sin embargo, también se presentó interacción de parte del fosfolípido PMCL a través de enlaces de hidrógeno, donde estuvieron involucrados los residuos lisina, en la posición 5 (lys5); lisina, en la posición 9 (lys9); glicina en la posición 7 (gly7) y alanina en la posición 14 (ala14), los cuales interactuaron con el fosfolípido POPE mediante interacciones por enlaces de hidrógeno y electrostáticas; mientras la alanina en la posición 1 (ala1) presentó interacciones sólo de puentes de hidrógeno con el fosfolípido PMCL. Se conoce, que los péptidos catiónicos contienen residuos que le proporcionan carga positiva como la arginina, histidina y lisina, esta composición le da estabilidad al péptido al momento de la interacción con la bicapa. Estos aminoácidos son un elemento fundamental para la interacción con las membranas; se ha encontrado anteriormente en la literatura que arginina es uno de los residuos que más se encuentran en estos procesos(22) , como es el caso de este trabajo que se encontró presente la arginina durante los 10 ns. Los residuos de Arg son los más importantes para las interacciones de la membrana, ya que las cadenas laterales cargadas positivamente de los grupos catiónicos proporcionan las fuerzas de atracción electrostáticas iniciales de largo alcance que guían al péptido antimicrobiano hacia las membranas bacterianas cargadas negativamente. Las argininas también pueden generar interacciones electrostáticas con otros residuos (enlaces H, puentes salinos y contactos catiónicos-π) importantes para la estabilidad estructural(35). En estudios anteriores, se ha informado que Arg es uno de los mejores residuos para inactivar bacterias(35).

En un estudio del papel de la arginina y la lisina en el mecanismo antimicrobiano de los péptidos antimicrobianos derivados de histonas con variantes que contienen solo residuos catiónicos de arginina o lisina. Se demostró que el péptido ARD I-IV rico en arginina tiene una actividad antimicrobiana de amplio espectro a concentraciones micromolares(43). Para todos los péptidos la actividad antimicrobiana aumentó con un mayor contenido de arginina. Se observa una estabilización de la configuración estructural de la Buforina I a partir de los 6ns, lo que indica que no trae cambios considerables a la conformación general del sistema hasta los 10 ns.

La **Figura 6B** muestra los tipos de interacción HB: enlaces de hidrógeno, HI: hidrofobicidad y EI: electrostáticas; que estuvieron en mayor contacto con el modelo de membrana de *K.pneumoniae,* donde los residuos de arginina (arg11) y serina (ser18) (ser19) presentaron el mayor número de interacciones con puentes de hidrógeno y algunos residuos como arginina (arg20) (arg29) y fenilalanina (phe25) presentaron interacciones electrostática. Las

interacciones electroestáticas, están involucradas en el evento de unión, las cuales se encuentran cargadas positivamente y se dan entre los residuos lisina, arginina, histidina, tirosina(48). Arginina (Arg) y lisina (Lys) son residuos polares que poseen cadenas laterales de naturaleza anfifílica, con un grupo guanidino (pKa = 11–13) o amino (pKa = 9–10) con carga positiva, respectivamente. Además, las interacciones de la cadena lateral de Arg involucran principalmente al grupo guanidino, mientras que Lys tiene contactos con otros residuos a través de sus grupos metileno y amino. La capacidad mejorada de Arg para las interacciones electrostáticas parece provenir de la carga catiónica deslocalizada sobre el grupo guanidino versus una carga catiónica más localizada para Lys. Además, el grupo guanidino es capaz de formar enlaces H más extensos y fuertes con otros donantes y aceptores(35). El único residuo que presentó interacciones hidrofóbicas fue la lisina en la posición 36 (lys36). Los aminoácidos tirosinasa (Tyr) y lisina (Lis) son catalogados como los aminoácidos centrales en la estructura del sitio activo de la proteína, en cambio los aminoácidos como ácido aspártico (Asp), triptófano (Trp) y leucina (Leu), son clasificados como los aminoácidos de la mitad de la proteína(48).

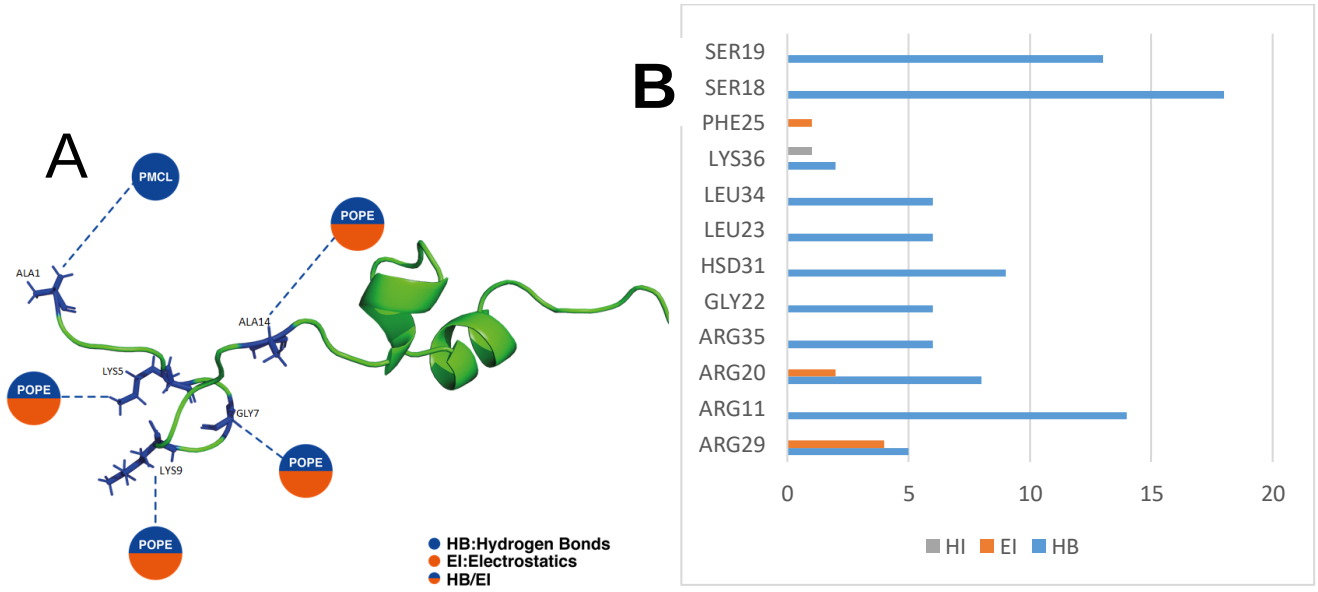


Figura 6. Interacción de los residuos de la buforina I.A) estructura 3D de la buforina en interacciones con fosfolipidos que estuvieron en contacto con el modelo de membrana de *K.pneumoniae* durante los 10 ns. B) residuos de la buforina I, que interactuaron con mayor frecuencia en el modelo de membrana de *K.pneumoniae*

De acuerdo con los resultados, se produjo una pérdida de la estructura de la buforina I en la membrana de *K. pneumoniae*, debido a los movimientos que realizo dicho péptido para tratar de anclarse a la membrana según la literatura la presencia de mayores interacciones con POPE; los enlaces de hidrógeno pueden afectar la estabilidad del péptido(49). Por otro lado el péptido ΔM2 , mostro estabilidad en la membrana. En un estudio anterior la estabilidad del péptido ΔM1 se debía al mayor número de interacción con POPG(21), pero en este estudio realizado con el péptido ΔM2 se presentó mayor interacción con el fosfolípido POPE.

3.4.2 GRÁFICAS DE INTERACCIONES DEL PÉPTIDO ΔM2 Y LA BUFORINA I

En la **Figura 7.** Se observa el mayor número de interacciones presentes entre los fosfolípidos de la membrana, aquí se encuentra el número de interacciones en función del tiempo de 1 a 10ns, como resultado, se tiene que el péptido ΔM2 interactuó principalmente por puentes de hidrógeno, en el tiempo de 4 ns fue donde más interactuó por medio de estos enlaces; por otro lado, la buforina I tuvo mayor interacciones por puentes de hidrógeno en el tiempo de 1ns. Esto se le puede atribuir a la presencia de los residuos en mayor cantidad de arginina y lisina, ya que la Arg y Lys en la secuencia de aminoácidos de los péptidos catiónicos tienen más afinidad para unirse a los grupos fosfato en la membrana bacteriana, debido a un mayor número de interacciones de enlaces de hidrógeno(11).

Las interacciones de enlace de hidrógeno (puentes de hidrógeno), que se forman entre un átomo de hidrógeno unido covalentemente a un átomo electronegativo y otro átomo electronegativo, son de suma importancia para el ensamblaje, la estructura y el funcionamiento de las proteínas de membrana(9); Luego se observan las interacciones electrostáticas en donde se evidenció su presencia en menor cantidad, tanto por parte del péptido ΔM2 como de la buforina I y por ultimo su hidrofobicidad donde fue un poco más alta de parte de la buforina I en los tiempo de 2ns y 8ns. Es importante destacar que las interacciones juegan un papel primordial en la estabilización de la estructura tridimensional de las proteínas(50). Este trabajo se realizó con péptidos catiónicos en el cual se encontraron un número alto de puentes de hidrógeno, además, la carga y la diferencia que presentaron las membranas de las bacterias Gram- negativas, debido a que estas contienen lipopolisacáridos en su membrana externa, le confieren la carga neta aniónica a la superficie de las células bacterianas. Por ende, son las responsables del primer acercamiento entre los péptidos y los patógenos, permitiendo la interacción necesaria para que el péptido pueda alcanzar su objetivo(51).

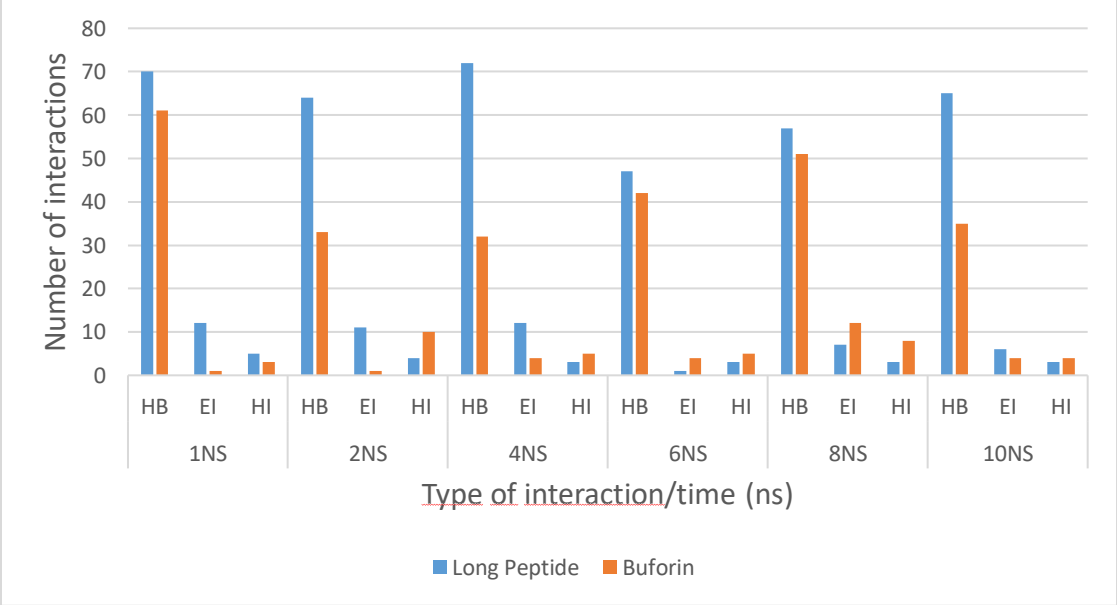


Figura 7. Total de Interacciones del péptido ΔM2 y la buforina I; HB: puentes de hidrógeno; EI: interacciones electrostáticas; HI: interacciones hidrofóbicas durante los 10ns.

En la Figura 8 se muestra el número de interacciones con los fosfolípidos usados en el modelo de membrana de *K. pneumoniae* (wild-type) de una manera específica en función al tiempo de 1 a 10ns; mostrando por parte del péptido ΔM2, que en la mayoría del tiempo este tuvo principalmente interacción con el fosfolípido POPE, mientras que presentó en menor cantidad interacción con el fosfolípido POPG y por último no se evidenció interacciones con el fosfolípido PMCL. Su mayor interacción con el fosfolípido POPE se dio en el tiempo de 4ns. La buforina I, sí presentó interacción con los 3 fosfolipidos principalmente con POPE seguido de PMCL y finalmente con POPG. La mayor interacción con el fosfolípido POPE se dio en el tiempo de 8ns y su mayor interacción con el fosfolípido PMCL se dio en el tiempo de 4ns. Obteniendo unos resultados variables en comparación con el péptido ΔM2. Estos resultados se pueden obtener, debido a las cargas que maneja cada fosfolípido, es decir, PMCL y POPG presentan cargas negativas, mientras POPE se comporta tanto positivo como negativamente (zwitterion).

Los resultados generales, junto con el modelado molecular, respaldan un paso inicial de la interacción, ya que el tiempo utilizado fue de 10ns (corto) y por tanto no se obtuvo una evidencia considerable. Sin embargo, estas interacciones permiten la entrada del péptido en la membrana bacteriana y simultáneamente contribuyen a la estabilidad de su estructura helicoidal. Además, estas interacciones interrumpen la estructura de la bicapa lipídica, probablemente induciendo la separación lateral de los fosfolípidos debido a las interacciones entre sus cabezas polares y los residuos catiónicos del péptido. Así mismo, facilita la inserción del péptido en la membrana al desplazar lateralmente los fosfolípidos y reorganizar los lípidos aniónicos en un dominio separado(51). Estas estructuras pueden luego insertarse en las membranas de partículas infecciosas y crear poros. Los gradientes de energía e iónicos se pierden posteriormente y la lisis celular ocurre en minutos.(46)

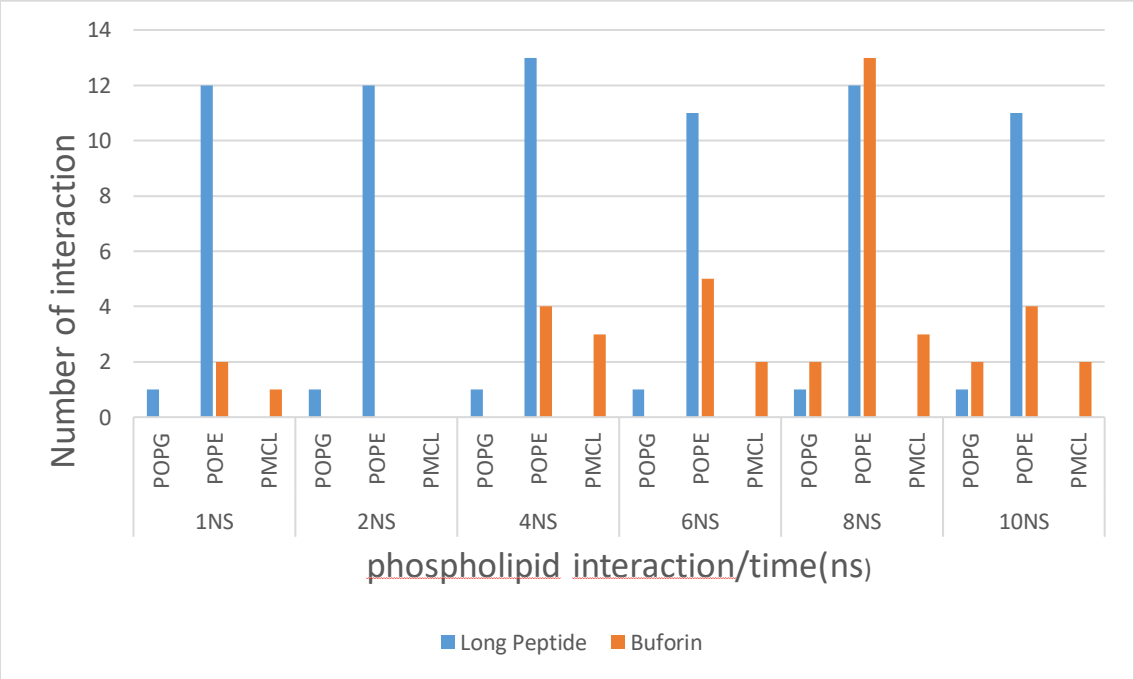


Figura 8. Interacciones del péptido ΔM2 y la buforina I con los fosfolípidos usados en el modelo de membrana de *Klebsiella pneumoniae.* POPG: fosfatidilglicerol; POPE: fosfatidiletanolamina; PMCL:cardiolipina.

La estabilidad de las estructuras en los péptidos varió, siendo el péptido ΔM2 el más estable ante la interacción con la membrana modelo de *K. pneumoniae* (wild type). Mientras, la buforina I, sufrió una desestabilización de su estructura inicial, donde se evidenció varios cambios según el trayecto de los 10 ns. En estudios anteriores el péptido ΔM1 se evaluó frente a cepas *K. pneumoniae* (MDRKp), observando un fuerte efecto bactericida de ΔM1 contra las cepas MDR.(52) Por otro lado, en una investigación realizada a la buforina I, como una alternativa a los antibióticos convencionales se confirmó que la buforina I, tiene el potencial de expandir la producción y un alto valor de desarrollo en medicamentos para animales, protección del medio ambiente, conservantes de alimentos e

infecciones humanas(11). Con lo cual se puede predecir que es posible que estos péptidos presenten actividad antimicrobiana(10).

Los péptidos derivados de cecropina muestran un potencial para contrarrestar las cepas de *K. pneumoniae.* Siendo relevante para este estudio el tipo de interacción con los fosfolípidos de la membrana de cepas sensibles y en posteriores estudios de cepas resistentes. Permitiendo elucidar la afinidad y por consiguiente la probable actividad antimicrobiana(9). Además existen escasas alternativas para impulsar el diseño y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos con baja respuesta de resistencia, debido a la disminución de los presupuestos en investigación y desarrollo de la industria, la inactividad del gobierno y el incremento de la prevalencia de las bacterias resistentes. Con el fin de ayudar a esta problemática se ha planteado el uso de nuevas alternativas terapéuticas como el uso de estos péptidos(4).

4. CONCLUSIONES

- Se demostró la interacción molecular del péptido ΔM2 frente a las membranas de *K. pneumoniae* (wild type), donde se mostró una mayor actividad con el fosfolípido POPE.
- Se evidenció la interacción molecular de la buforina I, frente a las membranas de *K. pneumoniae* (wild type), donde se observó una actividad con los fosfolípidos POPE y PMCL1.
- El aminoácido que más interactuó con las membranas de *K. pneumoniae* (wild type), fue la arginina (arg).
- Los resultados de este estudio realizado *in sílico,* sirven como un aporte y una aproximación para mostrar la actividad del péptido ΔM2, frente a la membrana de *K. pneumoniae (WTKp)*, y así complementar los resultados en futuros estudios in vitro.
- Se espera que este trabajo de investigación constituya un aporte en el diseño, desarrollo y obtención de moléculas innovadoras basadas en PAMs, para permitir el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a mi familia por brindarme el apoyo, amor y comprensión necesarios a lo largo de mi carrera y en esta etapa principalmente por ser tan pacientes y darme toda la ayuda que necesité; a los docentes Sandra Rivera, Yamil Liscano, Iván Ocampo y José Oñate, los cuales me brindaron todas las ayudas posibles para desarrollar este proyecto; a todos aquellos que con paciencia y esfuerzo me guiaron en este proceso y sobre todo me impulsaron a desarrollar un trabajo de investigación de calidad; igualmente, doy gracias a la Dirección General de Investigaciones de la Universidad Santiago de Cali, por financiar el proyecto número 924.621120-2227, así mismo infinitos agradecimientos a los compañeros y amigos por sus palabras de apoyo y buenos deseos para culminar esta etapa con éxito.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. López Vargas JA, Echeverri Toro LM. K. pneumoniae: ¿The new "'superbacteria'"? Pathogenicity,

epidemiology and resistance mechanisms. Iatreia. 2010;23(2):157–65.
2. OMS OM de la S. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. 2017. Available from: https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed
3. Ocampo-Ibáñez ID, Liscano Y R-SS. A Novel Cecropin D-Derived Short Cationic Antimicrobial Peptide Exhibits Antibacterial Activity Against Wild-Type and Multidrug-Resistant Strains of Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa. 2020;16. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1176934320936266
4. Jessica Castañeda-Casimiro,* José Antonio Ortega-Roque AM, Venegas-Medina,** Alejandra Aquino-Andrade,** Jeanet Serafín-López **, Sergio Estrada-Parra ** Iris Estrada***. Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. 2009;18:14. Available from: https://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2009/al091d.pdf
5. Richard M Epand 1 RFE. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. 2008; Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18822270/
6. Vitor Teixeira a, b,⇑, Maria J. Feio b MB a. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. 2012;
7. Raquel F Epand 1, Lee Maloy, Ayyalusamy Ramamoorthy RME. Amphipathic helical cationic antimicrobial peptides promote rapid formation of crystalline states in the presence of phosphatidylglycerol: lipid clustering in anionic membranes. 2010; Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20513400/
8. Sandra Patricia Rivera-Sánchez 1, Helen Astrid Agudelo-Góngora 1, José Oñate-Garzón 2, Liliana Janeth Flórez-Elvira 3, Adriana Correa 1, Paola Andrea Londoño 4, Juan David Londoño-Mosquera 5, Alberto Aragón-Muriel 5, Dorian Polo-Cerón 5 IDO-I 1. Antibacterial Activity of a Cationic Antimicrobial Peptide against Multidrug-Resistant Gram-Negative Clinical Isolates and Their Potential Molecular Targets. 2020; Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33142969/
9. José Fernando Oñate Garzón. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA Y ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE PEPTIDOS CATIONICOS DERIVADOS DE CECROPINA-Galleria mellonella. universidad de antioquia; 2016.
10. GONGORA HAA. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN PÉPTIDO CATIÓNICO FRENTE A BACTERIAS MULTIRRESISTENTES. UNIVERSIDAD SANTAGO DE CALI; 2020.
11. YazdiaAliJavadmaneshbcJebraeilMovaffaghd S. Buforin I an alternative to conventional antibiotics: Evaluation of the antimicrobial properties, stability, and safety. 2021; Available from: https://usc.elogim.com:2119/science/article/pii/S0882401021005751
12. Hugo Aceves Luna. Dinámica molecular de la permeabilidad de Nanotubos de Carbono en una Bicapa Lipídica [Internet]. CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES AVANZADOS; 2018. Available from: https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/2131/1/Tesis Hugo Aceves Luna final.pdf
13. Bueren-Calabuig JA. Dinamica molecular. In: Dinamica molecular.
14. universidad de nebraska. wangapd3 [Internet]. 2017. Available from: https://aps.unmc.edu/
15. PEPCALC [Internet]. 2015. Available from: https://pepcalc.com/
16. Camproux AC, Gautier R TP. PEP-FOLD3 [Internet]. 2004. Available from: https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3
17. A Roy, A Kucukural YZ. Y. I-TASSER [Internet]. 2015. Available from: https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/
18. DW Heinz, WA Baase, FW Dahlquist BM. PDB-RCSB [Internet]. Available from: https://www.rcsb.org/
19. Vicente B. Chen , un W. Bryan Arendall, III , un Jeffrey J. Headd , un Daniel A. Keedy , un Robert M. Immormino , un Gary J. Kapral , una Laura W. Murray , un Jane S. Richardson , una y David C. Richardson a *. MolProbity : validación de la estructura de todos los átomos para cristalografía macromolecular. 2009; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2803126/
20. J. Lee, M. Hitzenberger, M. Rieger, NR Kern MZ y WI. CHARMM-GUI [Internet]. 2020. Available from: charmm-gui.org
21. Aeruginosa U nuevo péptido antimicrobiano catiónico corto derivado de cecropina D exhibe actividad antibacteriana contra cepas silvestres y resistentes a múltiples fármacos de K pneumoniae y P, Autores M todos los, Iván Darío Ocampo-Ibáñez, Yamil Liscano SPR-S. Un nuevo péptido antimicrobiano catiónico corto derivado de cecropina D exhibe actividad antibacteriana contra cepas silvestres y resistentes a múltiples fármacos de Klebsiella pneumoniae y Pseudomonas aeruginosa. 16. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1176934320936266
22. yamil liscano, laura medina, jose oñate, fanny guzman, Monica pickholz jean paul delgado. Selección in

silico y evaluación de pugnins con actividad antibacteriana y anticancerígena utilizando el transcriptoma cutáneo de Treefrog (Boana pugnax). 2021;32. Available from: https://www.mdpi.com/1999-4923/13/4/578/htm#
23. yamil liscano, laura medina, jose oñate garzon fanny guzman. Selección in silico y evaluación de pugnins con actividad antibacteriana y anticancerígena utilizando el transcriptoma cutáneo de Treefrog (Boana pugnax). 2021;13. Available from: https://www.mdpi.com/1999-4923/13/4/578/htm
24. GROMACS [Internet]. 2015. Available from: https://www.gromacs.org/
25. LLC DS. PyMOL [Internet]. 2010. Available from: https://pymol.org/2/
26. todos los derechos reservados. DISCOVERY STUDIO [Internet]. 2002. Available from: http://accelrys.com
27. C.Gomez-Fernándezb J-G-MJA. The increase in positively charged residues in cecropin D-like Galleria mellonella favors its interaction with membrane models that imitate bacterial membranes. 2017; Available from: https://usc.elogim.com:2119/science/article/pii/S0003986117302060
28. Giraldo Hincapie PA. Diseño y evaluación de péptidos insecticidas para el control de Aedes aegypti. 2020; Available from: https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/79336
29. Yuxin Chen, 1 Michael T. Guarnieri, 1 Adriana I. Vasil, 2 Michael L. Vasil, 2 Colin T. Mant 1 and Robert S. Hodges1. Role of Peptide Hydrophobicity in the Mechanism of Action of α-Helical Antimicrobial Peptides. 2006; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1855469/
30. ArturSchmidtchenaMukeshPasupuletiaMartinMalmstenb. Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. 2014; Available from: https://usc.elogim.com:2119/science/article/pii/S0001868613000754
31. Scherer2 LO-Q and LG-C. Plegamiento de las proteínas: Un problema interdisciplinario. :12. Available from: https://www.redalyc.org/pdf/475/47548114.pdf
32. Matilde Julián Seguí. Estructura y propiedades de las proteínas. Available from: https://www.uv.es/tunon/pdf_doc/trabajo_matilde.pdf
33. Luca1 M Di, Giuseppe Maccari2 & Riccardo Nifos ı. Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools. 2014;14.
34. Garzon jenifer pasachova sara ramirez martinez. Efecto de los péptidos antimicrobianos derivados del LL37 en el crecimiento bacteriano y evaluación de la formación de biopelícula en cepas clínicas y ATCC de bacilos Gram negativos. universidad colegio mayor de cundinamarca; 2019.
35. AlessioBonucciaEnricoBalduccibManueleMartinellicRebeccaPognia. Human neutrophil peptide 1 variants bearing arginine modified cationic side chains: Effects on membrane partitioning. 2014; Available from: https://usc.elogim.com:2119/science/article/pii/S0301462214000581
36. Aristizabal isabella hernandez. Descripción y clasificación de péptidos antimicrobianos con actividad antibacteriana contra cepas de Staphylococcus aureus resistentes a vancomicina. universidad santiago de cali; 2021.
37. Téllez GA, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos Antimicrobial peptides. Infectio. 2010;14(1):55–67.
38. José Oñate-Garzón 1, Alessio Ausili 2, Marcela Manrique-Moreno 1, Alejandro Torrecillas 2, Francisco J Aranda 2, Edwin Patiño 3 JCG-F 4. The increase in positively charged residues in cecropin D-like Galleria mellonella favors its interaction with membrane models that imitate bacterial membranes. 2017; Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28720376/
39. Raquel F. Epand,† Lee Maloy,‡ Ayyalusamy Ramamoorthy and RME. Amphipathic Helical Cationic Antimicrobial Peptides Promote Rapid Formation of Crystalline States in the Presence of Phosphatidylglycerol: Lipid Clustering in Anionic Membranes. 2010; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2877319/
40. Raquel F. Epand, 1 Guangshun Wang, 2 Bob Berno 3 and Richard M. Epand1. Lipid segregation explains selective toxicity of a series of fragments derived from the human cathelicidin LL-37. Antimicrob Agents Chemother. 2009; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2737875/
41. A RES. Propiedades Termodinamicas del Efecto Hidrofobico en la ´ Estabilidad Proteica. 2015;9. Available from: https://jci.uniautonoma.edu.co/2015/2015-1.pdf
42. Model. JMG. Extending the universal force field for interactive molecular modeling. 2017; Available from: https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/28950182/IM-UFF:_Extending_the_universal_force_field_for_interactive_molecular_modeling.
43. muñoz carolina, lopez valeriano groot helena. el secreto antimicrobiano de las histonas. 2014;16:3.
44. Yuxin Chen 1, Colin T Mant, Susan W Farmer, Robert E W Hancock, Michael L Vasil RSH. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. 2005;

Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15677462/
45. ChangKimb JHH. Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. 2008; Available from: https://usc.elogim.com:2119/science/article/pii/S0005273608003544
46. A JHC, B BHS, Sun Chang Kim. Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. 2008;6.
47. Aminoácidos, péptidos y proteínas. In. Available from: http://biblio3.url.edu.gt/Publi/Libros/2013/Bioquimica/08-O.pdf
48. Liceth Yurany Escobar Meneses1; Paola Andrea Mina Amú2. Evaluación in silico de la interacción entre meropenem y variantes alélicas De la enzima KPC. universidad santiago de cali;
49. Epand RM, Epand RF. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. Biochim Biophys Acta - Biomembr [Internet]. 2009;1788(1):289–94. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.023
50. Furey an M, Mehta SC, Sankaran B, Hu L, Prasad BVV, Palzkill T. Local interactions with the Glu166 base and the conformation of an active site loop play key roles in carbapenem hydrolysis by the KPC-2 β-lactamase. Available from: https://www.jbc.org/article/S0021-9258(21)00593-7/fulltext
51. Kevin Samael Olascoaga-Del Angel, Grecia Sánchez-Evangelista IC-N, María del Carmen Galicia-Sánchez, Angélica Gómez-Luna SJI-A, Castañeda-Sánchez y JI. Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas. 2018;8. Available from: https://www.anmm.org.mx/GMM/2018/n6/GMM_6_18_681-688.pdf
52. Lovisa Ringstad 1, Elisabeth Protopapa , Britta Lindholm-Sethson , Artur Schmidtchen , Andrew Nelson MM. Un estudio electroquímico de la interacción entre péptidos derivados del complemento y monocapas y bicapas de DOPC. 2008; Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18052298/