

Diseño de péptidos antimicrobianos *in silico* mediante el análisis de proteomas de virus, bacterias y hongos

In silico design of antimicrobial peptides through the analysis of viruses, bacteria and fungi proteomes

Jairo Alexander Morillo Garces*, Sergio Orduz**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.114445

RESUMEN

Debido a la creciente resistencia de microorganismos patógenos a los antibióticos, se ha visto la necesidad de encontrar nuevos compuestos antimicrobianos como opciones de tratamiento. En respuesta, se han adoptado enfoques alternativos, entre los cuales se encuentran los péptidos antimicrobianos (PAMs) que son parte natural del sistema inmunológico de todos los organismos. Existen estudios que han demostrado las ventajas que presentan los PAMs en comparación con los antibióticos habituales como su actividad de amplio espectro, mecanismos de acción y selectividad hacia las células bacterianas sobre las células huésped y menor probabilidad de generar resistencia. Razones por las cuales esta investigación se enfocó en la identificación, selección, modificación y evaluación *in silico* de los PAMs encontrados en el proteoma de virus, bacterias y hongos mediante el uso de herramientas bioinformáticas y de inteligencia artificial específicas, que estimaron parámetros como estructura, función, posible modo de acción, capacidad hemolítica, toxicidad, capacidad de unión a membrana, y su capacidad antimicrobiana. Lo que sugiere que los nuevos péptidos encontrados en este estudio sean candidatos a futuros ensayos *in vitro* e *in vivo* como una alternativa efectiva a los antibióticos tradicionales.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos, inteligencia artificial, resistencia antimicrobiana, bioinformática.

ABSTRACT

With the increasing resistance of pathogenic organisms to antibiotics, the need to find new antimicrobial compounds as treatment options has increased. In response, alternative approaches have been adopted, among which are antimicrobial peptides (AMPs). AMPs are a natural part of the immune system of all organisms. Several studies have shown that AMPs have a great advantage compared to usual antibiotics based on their broad-spectrum activity, mechanisms of action, and selectivity to bacterial cells over host cells, and less likely to generate resistance. For these reasons, this research aimed at the identification, selection, modification, and *in silico* evaluation of AMPs found in the proteome of viruses, bacteria, and fungi through the use of specific bioinformatics and artificial intelligence tools that assessed parameters such as structure, function, possible mode of action, hemolytic capacity, toxicity, membrane binding capacity, and mainly its antimicrobial capacity. Whence, the novel peptides found in this research are expected to be candidates for future *in vitro* and *in vivo* trials as an effective alternative to traditional antibiotics.

Keywords: Antimicrobial peptides, artificial intelligence, antimicrobial resistance, bioinformatics.

Recibido: mayo 27 de 2024

Aprobado: marzo 10 de 2025

* Zootecnista, M.Sc., en Ciencias-Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. jmorillo@unal.edu.co
ORCID 0000-0002-5315-1123

** Biol., M.Sc., Ph.D. Profesor Titular, Departamento de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Carrera 65 No 59^a-110. 050034. sorduzp@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

En los últimos ochenta años, los antibióticos han desempeñado un papel crucial en la preservación de la vida y la salud humana, así como en el impulso de la producción animal, lo que ha tenido un impacto significativo en el desarrollo socioeconómico. No obstante, el uso indebido de estos medicamentos ha exacerbado el problema de la resistencia bacteriana, lo que representa una amenaza creciente. La resistencia compromete la eficacia de los tratamientos y puede conducir al fracaso terapéutico y al aumento, tanto de la morbilidad como de la mortalidad, lo que a su vez se traduce en costos sanitarios más elevados. La Organización Mundial de Sanidad Animal estimó que el consumo mundial de antibióticos veterinarios alcanzó las 76.704 toneladas en 2018 (Gehring *et al.*, 2023). Además, se estimó que el consumo mundial de antibióticos en entornos clínicos aumentó de 9,8 dosis diarias definidas (DDD) por 1000 habitantes por día en el año 2000 a 14,3 DDD por 1000 habitantes por día en el 2018 (Browne *et al.*, 2021). La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2021 ha señalado que la resistencia a los antimicrobianos figura entre las diez principales amenazas para la salud pública a nivel global. El abuso y el uso excesivo de antimicrobianos son los factores primordiales que impulsan la selección de patógenos resistentes a los medicamentos. La falta de antimicrobianos eficaces compromete los avances de la medicina moderna en el tratamiento de infecciones, especialmente durante procedimientos quirúrgicos importantes. Con el incremento de la resistencia a los antibióticos, se vuelven más frecuentes las infecciones difíciles de tratar, lo que contribuye al aumento de la mortalidad. Por lo que se requieren nuevas alternativas a los antimicrobianos tradicionales.

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son reconocidos como moléculas con actividad antimicrobiana, con baja toxicidad y baja probabilidad de generar resistencia. (Makhlynets y Caputo, 2021). Algunos PAMs pueden actuar con un efecto letal directo, mientras que otros tienen actividad como antibiofilm, neutralización de toxinas o actividad inmunomoduladora. En el primer caso, su principal modo de acción es la alteración de la integridad de la membrana (Weeks *et al.*, 2021). Los PAMs tienen aplicaciones en áreas agrícolas, biológicas, médicas y fisiológicas, además de tener uso potencial en producción animal (Xiao *et al.*, 2015). En enero de 2025, la base de datos de péptidos antimicrobianos APD3 reporta 5099 péptidos, incluidos 3306 péptidos antimicrobianos naturales.

La bioinformática ha surgido como respuesta al crecimiento exponencial de datos generados por técnicas de

secuenciación de proteínas y de genomas, lo que ha llevado a la construcción de bases de datos y al desarrollo de algoritmos informáticos eficientes (Ebrahimi *et al.*, 2023). Estas bases de datos contienen información diversa, desde funciones y estructuras, hasta similitudes de secuencias y estructuras tridimensionales de moléculas (Radusky, 2017). La bioinformática ha evolucionado rápidamente y se ha convertido en una herramienta crucial en diversas áreas, como biología molecular, química computacional, genética, farmacología, agricultura y medicina (Patel *et al.*, 2021). Por otra parte, los péptidos antimicrobianos ofrecen una alternativa farmacéutica prometedora, pero pueden ser sensibles a condiciones ambientales, tener potencial de toxicidad y ser costosos de producir (Pfalzgraff *et al.*, 2018). Para su aplicación clínica es esencial desarrollar análogos sintéticos estables que superen estas limitaciones. Con el objetivo de acelerar este proceso y reducir costos, este estudio describe la selección, análisis y modificación *in silico* de péptidos antimicrobianos encontrados en proteomas de virus, bacterias y hongos, utilizando herramientas bioinformáticas y de inteligencia artificial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de proteomas y de posibles PAMs

Se seleccionaron proteomas de virus, bacterias y hongos de UniProtKB (The Universal Protein Knowledgebase, 2024) para ser analizadas con PepMultiFinder 2.0 (Branch *et al.*, 2022a) con las variables de búsqueda seleccionadas de acuerdo a la metodología de Duque-Salazar *et al.* (2020), salvo el tamaño de los péptidos, ya que el costo de síntesis es menor para péptidos más cortos cuando se realizan ensayos *in vitro*. Además, los péptidos pequeños tienen menos probabilidad de ser degradados por proteasas. La clasificación de los péptidos como posibles PAMs se realizó con herramientas de inteligencia artificial disponibles en CAMPR3 (Waghu e Ilicula-Thomas, 2020), AmpClass 1.0 (Branch *et al.*, 2022b) y AMP Scanner Vr.2 (Veltri *et al.*, 2018). Se seleccionaron péptidos con probabilidad antimicrobiana igual o superior al 98%.

Evaluación de seguridad, índice de inestabilidad de los péptidos y anclaje en membranas

Los péptidos seleccionados se evaluaron en las plataformas HAPPENN (Timmons y Hewage, 2023) y HEMOPI-3 (Chaudhary *et al.*, 2016) valorando su capacidad hemolítica y la predicción de la toxicidad se realizó en TOXINPRED (Gupta *et al.*, 2013). En ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) se evaluó el índice de inestabilidad de los péptidos, también se estimó la predicción de anclajes anfipáticos en membranas con AMPHIPASEEK (Sapay *et al.*, 2006) y en AllerTOP v.2 (Dimitrov *et al.*, 2014), se realizó la predicción de alergenidad.

Modificación de los péptidos antimicrobianos

Se seleccionaron y modificaron 10 péptidos, con el objetivo de mejorar sus propiedades fisicoquímicas con ayuda de TYPE-PEPTIDE (Tamayo *et al.*, 2018) y de Heli-Quest (Gautier *et al.*, 2008), identificando sus principales propiedades fisicoquímicas. Las modificaciones no abarcaron más del 50% de los aminoácidos de cada péptido verificando que conservaran sus efectos citotóxicos, antimicrobianos, no hemolíticos y no alergénicos.

Predicción de la actividad antimicrobiana con patógenos específicos y determinación de estructura 3D

Finalmente, los péptidos resultantes se analizaron en la plataforma DBAASP v3, (Pirtskhalava *et al.*, 2021) para predecir el potencial antimicrobiano de los PAMs contra microorganismos patógenos particulares y se utilizó AlphaFold2 (Mirdita *et al.*, 2022) para predecir la estructura 3D de los péptidos y sus homólogos modificados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Organismos evaluados y péptidos resultantes

Para evaluar la eficacia del análisis de proteomas y asegurar un análisis confiable y preciso, se estableció como mínimo examinar 150,000 proteínas. Este umbral permitió la selección de 65 proteomas que dieron lugar a un total de 195,258 proteínas para ser analizadas mediante herramientas bioinformáticas. De este total, 126,167 fueron de bacterias, 58,748 de hongos y 10,343 de virus.

Se analizaron los proteomas con PepMultiFinder 2.0, que identificaron 741,791 péptidos, 468,620 de bacterias, 249,065 de hongos y 24,106 de virus. Estos péptidos se evaluaron utilizando los clasificadores de CAM-PR3, AmpClass 1.0 y AMP Scanner Vr.2, estableciendo como criterio que la mayoría de los algoritmos de cada clasificador tuviera una probabilidad mayor o igual al 98%; como resultado se seleccionaron 318 péptidos.

Tabla 1. Péptidos seleccionados en el análisis bioinformático de proteomas con PepMultiFinder 2.0 y su información de origen.

Nombre	Péptido	Organismo de origen	Nombre del organismo	Nº de proteínas	Código del proteoma en UniProt	Nº de péptidos encontrados
BfP1	GGIFKKT F ALLKKI	Virus	<i>Brevibacillus fago Emery</i>	102	UP000015097	217
OvP2	LVLKKLKKLIK QLPNA</td><td>Virus</td><td><i>Orpheovirus IHUMI-LCC2</i></td><td>1.199</td><td>UP000236316</td><td>2.354</td></tr><tr><td>AbP3</td><td>GLKRALTL FKWI	Bacteria	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	9.474	UP000318527	22.402
AmP4	LRLFKGS I KAFIK	Bacteria	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	4.467	UP000001572	15.904
BsP5	FSKAFGW V KKIF	Bacteria	<i>Bacillus safensis</i>	3.746	UP000325032	18.284
BsP6	IGKRIKKY I VWL V	Bacteria	<i>Bacillus safensis</i>	3.746	UP000325032	18.284
FpP7	LKKLSA A FKKLVA	Hongo	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	13.806	UP000015241	52.044
CsP8	IGGRSVKWLKKL I VT A	Hongo	<i>Cochliobolus sativus</i>	12.174	UP000016934	53.267
MrP9	VPKVLGLKKV F AKR	Hongo	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	17.976	UP000017559	72.088
MrP10	LKKFGKALF K PLI	Hongo	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	17.976	UP000017559	72.088

Tabla 2. Predicción de la actividad antimicrobiana de los péptidos encontrados en el análisis bioinformático con los algoritmos de inteligencia artificial disponibles en AMP Scanner Vr.2, CAMPR3, y AmpClass 1.0.

Péptido	AMP Scanner Vr.2	CAMPR3				AmpClass 1.0				
		Support Vector Machine (SVM)	Random Forest	Artificial Neural Network (ANN)	Discriminant Analysis	Regresión Logística	Red Neuronal	Árbol de Decisión	Bosque Aleatorio	XGBoost
BfP1	0,99	1,00	0,97*	AMP	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	1,00
OvP2	1,00	0,99	0,97*	AMP	1,00	0,97*	0,99	0,99	0,97*	1,00
AbP3	0,99	0,99	0,99	AMP	0,97*	0,96*	0,97*	0,98	0,97*	1,00
AmP4	1,00	0,96*	1,00	AMP	0,99	0,98	0,99	0,99	0,98	1,00
BsP5	1,00	0,98	0,98	AMP	0,98	0,98	0,99	0,98	0,98	1,00
BsP6	0,99	1,00	0,99	AMP	0,98	0,95*	0,98	0,99	0,99	1,00
FpP7	0,98	0,98	0,97*	AMP	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00
CsP8	1,00	0,99	0,99	AMP	0,99	0,95*	0,98	0,99	0,96*	1,00
MrP9	1,00	0,98	0,99	AMP	1,00	0,98	0,99	0,99	0,98	1,00
MrP10	1,00	0,97*	0,99	AMP	1,00	0,96*	0,99	0,99	0,99	1,00

* Valores por debajo del punto de corte (0,98) que representan de manera integral alto valor predictivo y en conjunto con los otros predictores estimados cumplen con las propiedades requeridas para considerarse como péptidos antimicrobianos.

Para predecir la bioseguridad de los péptidos, se utilizó HAPPENN para identificar posibles efectos hemolíticos, eliminando 85 péptidos. Luego, se aplicó HEMOPI-3, confirmando que los 233 péptidos restantes son considerados no hemolíticos. Se utilizaron otras herramientas para evaluar toxicidad y estabilidad. TOXINPRED, determinó que ninguno de los 233 péptidos tuvo una probabilidad significativa de ser tóxico, mientras que ProtParam reveló que 14 péptidos eran potencialmente inestables. Para evaluar la probabilidad de anclaje en membranas, se utilizó AMPHIPASEEK, identificando 85 péptidos con alta probabilidad de anclaje, los 134 que se descartaron tenían una capacidad media o baja de unirse a membranas. Además, se evaluó el potencial de alergenicidad con AllerTOP v.2, donde se descartaron 28 péptidos con esta característica.

Para mantener únicamente los péptidos con baja similitud a los ya reportados, se descartaron péptidos con similitud superior al 70% con péptidos antimicrobianos conocidos en APD3, resultando en la eliminación de 20

péptidos. Luego, los 37 restantes se evaluaron con DBAASP v3 para predecir su potencial antimicrobiano. Después de este análisis, solo se seleccionaron 10 péptidos con las características deseadas para ser considerados PAMs, que se pueden visualizar en las Tablas 1 y 2.

Los péptidos BsP5 y MrP9 tuvieron probabilidad de ser PAMs mayor o igual al 98% en todos los clasificadores de CAMPR3, AmpClass 1.0 y AMP Scanner Vr.2, mientras que los otros ocho tuvieron probabilidades de ser antimicrobianos mayores o iguales al 98% en la mayoría de los predictores. Los péptidos seleccionados se nombraron con las primeras letras del nombre científico del organismo de origen y se les asignó un número de referencia para una mejor organización (Tabla 1).

Evaluación de la capacidad hemolítica y de toxicidad de los péptidos seleccionados

Timmons y Hewage (2020) encontraron que la hidrofobicidad cuantificada parece ser crítica para la actividad hemolítica, y que generalmente las secuencias más hi-

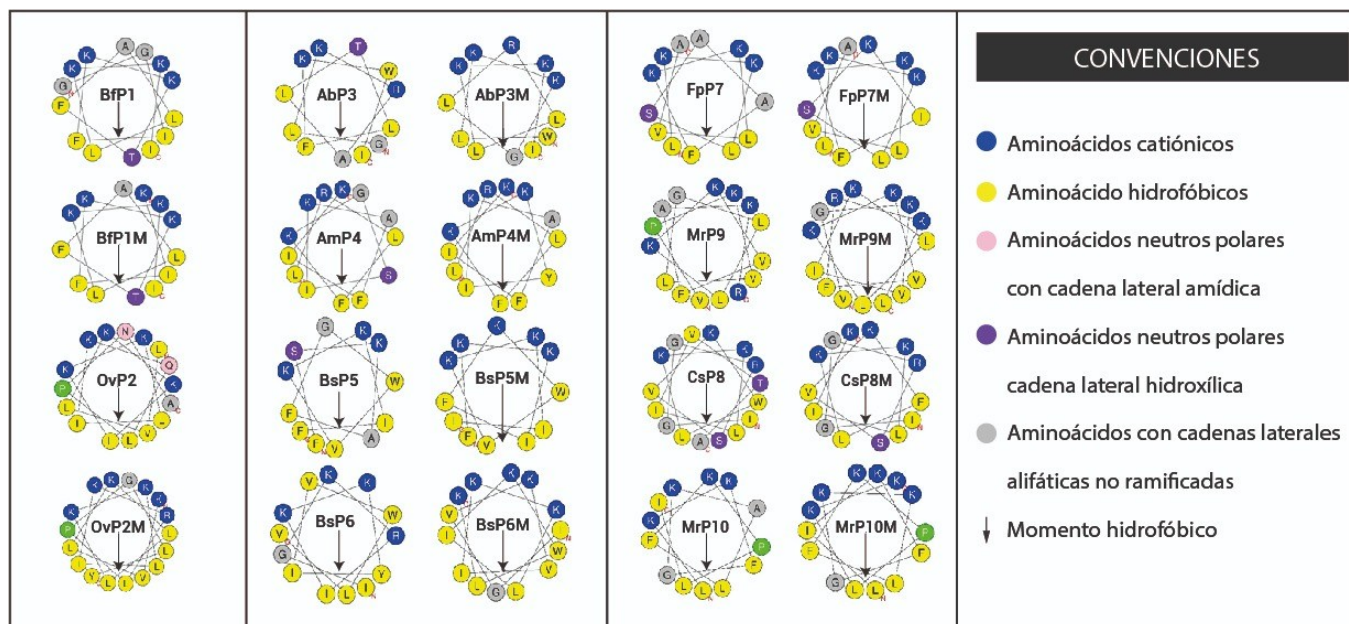


Figura 1. Rueda helicoidal de los péptidos originales y de los modificados obtenidas con HeliQuest, donde se aprecia la distribución de los aminoácidos en un círculo hipotético.

drofóbicas son más hemolíticas que las secuencias menos hidrofóbicas. Además, encontraron que debido a su composición en diferentes lugares del péptido son indicadores de tendencia hemolítica. Revisando estos criterios, se encontró que los 10 péptidos seleccionados en este estudio poseen en su estructura entre 50% y 60% de hidrofobicidad, y la porción hidrofílica con aminoácidos catiónicos como R y K, pero también con S, T y G, lo que probablemente ayude a que la predicción de hemolicidad sea baja.

En la evaluación de toxicidad se determinó que probabilidad de los péptidos de ser tóxicos fue nula. Este hallazgo coincide con estudios similares, como el de Khabbaz *et al.* (2021), quienes con un conjunto de datos desarrollaron un modelo de aprendizaje que extrae PAMs con baja toxicidad para aplicaciones clínicas y con Madrazo y Campos (2022), quienes utilizaron herramientas bioinformáticas para predecir péptidos antimicrobianos no tóxicos. Estos resultados destacan la importancia de evaluar la toxicidad de los péptidos como un obstáculo crítico para el uso clínico.

Índice de inestabilidad de los péptidos y anclaje en membranas

De los 10 péptidos seleccionados, la predicción del índice de inestabilidad más alta fue para BsP6 y MrP9 con valores de 24,21 y 26,93, respectivamente. El análisis estadístico de varias proteínas sugiere que su estabilidad está influenciada principalmente por su estructura prima-

ria, incluyendo la presencia de ciertos dipéptidos. Otros factores como la estructura secundaria, los puentes disulfuro y la unión a ligandos también afectan la estabilidad de las proteínas en el organismo (Gasteiger *et al.*, 2005). En cuanto al anclaje en membranas, todos los péptidos seleccionados y modificados tuvieron resultados admisibles.

Predicción *in silico* de la probabilidad de los péptidos como alérgenos

Algunos PAMs poseen propiedades alérgicas que no deben pasarse por alto, especialmente cuando se considera su posible uso médico (Guryanova y Ovchinnikova, 2022). Arora *et al.* (2020), investigaron 19 clases de proteínas pertenecientes a 11 familias de plantas con potencial alérgico utilizando herramientas bioinformáticas, incluyendo AllerTOP v.2, sus resultados indicaron que solo dos de ellas podrían tener efectos alérgicos. En este contexto, ninguno de los 10 péptidos seleccionados se consideró alérgico de acuerdo con AllerTOP v.2.

Modificaciones de los péptidos

La modificación de los 10 péptidos seleccionados se realizó teniendo en cuenta sus propiedades fisicoquímicas como carga, longitud, porcentaje de hidrofobicidad, índice de Boman, punto isoeléctrico y la rueda helicoidal que se puede visualizar y analizar en los programas TYPE-PEPTIDE y HeliQuest; además se tuvieron en cuenta los parámetros iniciales predichos.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos originales y de los modificados.

Péptido	Secuencia original y modificada	% de similitud (APD3)	Longitud	Carga	pI*	% hidrofobicidad	Índice de Boman
BfP1	GGIFKKT F ALLKKI	43.75%	14	4	11.3	50	-0.33
BfP1M	KIFKKT F ALLKKI	53.85%	13	5	11.4	53.85	0.22
OvP2	LVLK K LKKLIK Q LPNA	50%	16	5	11.4	50	0.28
OvP2M	KVLK L LKKLIK R LPGLY	52.94%	17	6	11.4	47.06	0.20
AbP3	GLK R ALT L FKWI	46.67%	12	3	12	58.33	0.07
AbP3M	WLK K GL R LLKKI	53.33%	12	5	12.1	50	0.77
AmP4	LRLFK G SIKAFIK	47.06%	13	4	12	53.85	0.51
AmP4M	LRLFK K YIKAFIK	43.75%	13	5	11.3	53.85	0.75
BsP5	FSK A FGWVKKIF	38.46%	13	5	12.1	53.85	0.92
BsP5M	FKK I FKVWVKII	50%	12	5	11.4	58.33	0.06
BsP6	IGK R IKKYIVLV V	42.86%	13	4	11.2	53.85	0.05
BsP6M	IGV K VIKKLIKWL K	47.06%	14	5	11.4	57.14	-0.59
FpP7	LKKLS A AFKKLVA	50%	13	4	11.3	61.54	-0.12
FpP7M	LKKLS K IFKKLVA	53.85%	13	5	11.4	53.85	0.2
CsP8	IGGRSVK W LKKLIV T A	38.1%	16	4	12	50	0.24
CsP8M	IGGRSVK F LKKLIK	47.06%	14	5	12.1	42.86	0.85
MrP9	V P KVLGLLKKV F AK R	52.94%	15	5	12.1	53.33	0.30
MrP9M	V G KVILLKKV F RKL	50%	15	6	12.1	53.33	0.46
MrP10	L K KFGK A LFKPL I	46.15%	13	4	11.3	53.85	-0.48
MrP10M	L I KFGK L FKPL K K	53.33%	14	6	11.5	42.86	0.48

*pI= Punto isoeléctrico

Como primer paso, se visualizaron y analizaron las ruedas helicoidales de cada péptido con HeliQuest (Figura 1). Cada aminoácido es representado por un círculo de color, lo cual nos permite apreciar la distribución catiónica e hidrofóbica en las caras opuestas del círculo, en tanto mejor distribuidos se encuentren en cada una de las caras de la hélice, mejor será su anfipaticidad. En este primer análisis se realizó un mapa que conduce a la primera apreciación de los péptidos, identificando los posibles aminoácidos que podrían ser sustituidos, intercambiados, adicionados o eliminados con el fin de generar un nuevo péptido con una correcta formación de las dos caras del péptido (Figura 1). Una de las propiedades clave relacionadas con la actividad biológica de cualquier secuencia es la anfipaticidad, descrita como la distribución topográfica de los residuos polares e hidrofóbicos, lo que resulta en una separación espacial más o menos marcada en la estructura de los PAMs activos. En una conformación helicoidal, los residuos polares/cargados e hidrofóbicos se agrupan en lados opuestos, a través de un cilindro hipotético, alrededor del cual se enrolla la hélice (Rončević *et al.*, 2019).

También se empleó TYPE-PEPTIDE para analizar la distribución de aminoácidos en los péptidos, permitiendo ajustes en su configuración. La herramienta

ofrece visualización 2D y muestra los cambios en los parámetros fisicoquímicos de los péptidos en tiempo real. Se aseguró que las modificaciones realizadas no afectaran negativamente las propiedades del péptido original, como se muestra en la Tabla 3 y se relacionan todas las modificaciones (letras en color rojo) que se realizaron a cada péptido.

El objetivo final del diseño de PAMs es optimizar la selectividad, la eficacia, la estabilidad, la formulación y la administración de los péptidos con el objetivo de mejorar su actividad farmacológica (Wang, 2010). En estudios previos, Hincapié *et al.* (2018), utilizaron herramientas bioinformáticas y algoritmos de inteligencia artificial de CAMPR3 para identificar y mejorar péptidos antimicrobianos a partir del análisis de proteínas, donde encontraron que 2 de 12 PAMs diseñados mostraron concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) entre 3 y 20 μ M contra al menos 3 especies de bacterias. Duque-Salazar *et al.* (2020), validaron *in vitro* una estrategia computacional similar y obtuvieron 11 péptidos con probabilidad del 97% para ser considerados como antimicrobianos. En ensayos *in vitro* se encontró que 10 de los 11 PAMs diseñados tuvieron CIMs entre 4 y 64 μ M contra al menos una especie bacteriana. Finalmente, Monsalve *et al.* (2024), analizaron proteo-

Tabla 4. Determinación de la probabilidad como antimicrobianos de los péptidos modificados en diferentes plataformas de inteligencia artificial.

Péptido	AMP Scanner Vr2	CAMPR3				AmpClass 1.0				
		Support Vector Machine (SVM)	Random Forest	Artificial Neural Network (ANN)	Discriminant Analysis	Regresión Logística	Red Neuronal (%)	Árbol de Decisión	Bosque Aleatorio	XgBoost
BfP1M	0,97*	0,98*	0,99**	AMP	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99**	1,00
OvP2M	1,00	0,96*	0,99**	AMP	1,00	0,99**	0,99	0,99	0,99**	1,00
AbP3M	1,00**	1,00**	0,99	AMP	0,99**	0,99*	0,99**	0,99	1,00**	1,00
AmP4M	0,99*	0,99**	0,99*	AMP	1,00**	0,99*	0,99	0,99	0,99**	1,00
BsP5M	1,00	1,00**	0,97*	AMP	1,00**	0,99**	0,99	0,99	1,00**	1,00
BsP6M	1,00**	1,00	0,99	AMP	1,00**	0,99**	0,99**	0,99	0,99	1,00
FpP7M	1,00**	0,96*	1,00**	AMP	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00
CsP8M	1,00	0,99	0,99	AMP	1,00	0,99**	0,99**	0,99	0,98**	1,00
MrP9M	1,00	0,98	0,97*	AMP	1,00	0,99**	0,99	0,99	0,99	1,00
MrP10M	1,00	1,00**	0,99	AMP	1,00	0,99**	0,99	0,99	0,98*	1,00

*Valores inferiores al péptido original. ** valores superiores al péptido original. M= modificado

mas de ocho especies, identificando alrededor de 500,000 péptidos con PepMultiFinder 1.0, que fueron evaluados con CAMPR3, AMP Scanner Vr.2 y AmpClass 1.0, con probabilidad $\geq 97\%$; y se encontró que 10 de los 18 PAMs tuvieron CIMs entre 0.89 y 15 μM en al menos tres especies bacterianas. En resumen, estas estrategias computacionales demostraron ser rápidas y efectivas para diseñar nuevos PAMs, logrando obtener moléculas activas y potentes sin un uso significativo de recursos y de tiempo.

Como resultado de las modificaciones en la secuencia de los PAMs de este estudio (Tabla 3) se mantuvieron las propiedades fisicoquímicas en los rangos propuestos, teniendo una distribución hidrofóbica más definida, mejorando su anfipaticidad y manteniendo, en su mayoría, la integridad del péptido original en al menos 50%. Para llegar a estos resultados se realizaron cambios que ayudaron a equilibrar las propiedades anfipáticas del péptido y una estructura helicoidal definida, que se ve favorecida por la presencia de residuos estabilizadores de hélice distribuidos a lo largo de la secuencia como L, A y K; además, el agrupamiento de residuos hidrofóbicos en

un lado de la hélice, favorece la inserción en la bicapa de la membrana objetivo (Rončević *et al.*, 2019).

Las modificaciones realizadas en la secuencia de los péptidos mantienen una predicción de actividad antimicrobiana en la mayoría de los predictores (Tabla 4). Destacan particularmente AbP3M, AmP4M, BsP6M, CsP8M y MrP10M, que en algunos algoritmos lograron superar los valores de predicción de 0.98 reportados para el péptido original, siendo este valor predictivo óptimo en nuestro estudio. Otros péptidos también mostraron valores similares, aunque en algunos casos se observó una ligera disminución en este umbral óptimo de 0.98, sin embargo, no por debajo de 0.95, un valor aún considerado aceptable. Este fenómeno se evidenció en los péptidos BfP1M, OvP2M, BsP5M, FpP7M y MrP9M. A pesar de ello, estos péptidos continúan siendo fuertes candidatos para ser considerados como PAMs.

Al realizar el análisis de predicción de la capacidad hemolítica, toxicidad y alergenidad de los péptidos modificados se encontró que están en el rango establecido para considerarlos como no hemolíticos, no tóxicos y

Tabla 5. Predicción de la actividad antimicrobiana de los péptidos originales y modificados con la plataforma DBAASP v3, utilizando el método Machine Learning.

Péptido	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
	Valor Predictivo	Clase	Valor Predictivo	Clase	Valor Predictivo	Clase	Valor Predictivo	Clase
BfP1	0.58	Activo	0.56	No Ac	0,68	Activo	0.59	Activo
BfP1M	0.78	Activo	0.7	Activo	0.83	Activo	0.64	Activo
OvP2	0.66	Activo	0.91	Activo	0.5	Activo	0.63	No Ac
OvP2M	0.87	Activo	0.9	Activo	0.63	Activo	0.56	Activo
AbP3	0.64	Activo	0.58	Activo	0.85	Activo	0.75	Activo
AbP3M	0.77	Activo	0.78	Activo	0.87	Activo	0.52	Activo
AmP4	0.72	Activo	0.74	Activo	0.57	Activo	0.63	Activo
AmP4M	0.65	Activo	0.72	Activo	0.54	Activo	0.6	Activo
BsP5	0.67	Activo	0.78	Activo	0.62	Activo	0.73	Activo
BsP5M	0.81	Activo	0.96	Activo	0.78	Activo	0.62	Activo
BsP6	0.57	Activo	0.55	Activo	0.77	Activo	0.58	Activo
BsP6M	0.53	Activo	0.81	Activo	0.55	Activo	0.67	No Ac
FpP7	0,69	Activo	0,63	Activo	0.76	Activo	0.5	Activo
FpP7M	0.79	Activo	0.93	Activo	0.85	Activo	0.53	No Ac
CsP8	0.59	Activo	0.55	Activo	0.61	Activo	0.59	Activo
CsP8M	0,61	Activo	0.81	Activo	0.63	Activo	0.51	No Ac
MrP9	0.59	Activo	0.74	Activo	0.52	Activo	0.55	Activo
MrP9M	0.61	Activo	0.9	Activo	0.67	Activo	0.58	No Ac
MrP10	0.5	Activo	0.51	Activo	0.61	Activo	0.51	Activo
MrP10M	0.58	Activo	0.83	Activo	0.53	Activo	0.65	No Ac

Si el resultado de la prueba es "activo", significa que el microorganismo en cuestión se inhibirá con un MIC < 25 µg/ml y por el contrario si el resultado es "no activo" (No Ac) implica que los microorganismos probablemente no sean sensibles al efecto inhibitorio del péptido a 100 µg/ml.

tampoco alergénicos, solamente el péptido AmP4M tuvo un valor levemente superior a 0.3 en la plataforma HAPPENN, pero es un valor permisible para que no sea considerado como hemolítico. Los resultados del índice de inestabilidad concuerdan con los péptidos originales, ya que todos los péptidos fueron clasificados como estables. Después de obtener los resultados óptimos para los péptidos modificados se observaron nuevamente en

la plataforma HeliQuest, donde se comprobó que la representación helicoidal de cada péptido mejora de manera significativa la separación de las caras hidrofílicas e hidrofóbicas (Figura 1).

Predicción de la actividad antimicrobiana específica

Los péptidos se evaluaron en la plataforma DBAASP v3 para predecir el potencial antimicrobiano contra espe-

cies como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Tabla 5).

Si el resultado de la prueba es “activo”, significa que el microorganismo en cuestión se inhibirá con un MIC < 25 µg/ml y por el contrario si el resultado es “no activo” (No Ac) implica que los microorganismos probablemente no sean sensibles al efecto inhibitorio del péptido a 100 µg/ml.

DBAASP v3 en una de sus metodologías utiliza el método Machine Learning descrito por Vishnepolsky et al. (2022), que está basado en propiedades computarizadas para secuencias de PAMs y características de genomas, calculadas para una especie microbiana objetivo entre las cuales están *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* y *S. aureus* ATCC 25923 con aplicación de algoritmos de aprendizaje automático para identificar los PAMs. Con relación a estos resultados Kim et al., (2020) utilizaron diferentes herramientas de inteligencia artificial para desarrollar el péptido PA2-GNU7 con alta especificidad para *P. aeruginosa*, actuando sobre la porina OprF para eliminar selectivamente las células, mientras que Maturana et al., (2020) estudiaron el péptido P6.2, que mostró amplia actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus*. Al-Khdhairawi et al., (2023) utilizaron diversos algoritmos de inteligencia artificial, entre los cuales se encuentra DBAASP v3, para predecir 18 péptidos activos contra *K. pneumoniae*, de los cuales ocho fueron considerados no tóxicos ni hemolíticos.

El valor predictivo de la actividad antimicrobiana evaluada mediante Machine Learning (Tabla 5) se basa en la precisión de las predicciones en comparación con datos experimentales. Se utiliza una escala del 0 al 1, donde valores más cercanos a 1 indican mayor precisión. Los resultados que se muestran tanto para los 10 péptidos originales, como para los 10 péptidos modificados tienen un valor predictivo igual o superior a 0.5, lo que indica una alta precisión en la predicción de la actividad antimicrobiana. En los péptidos originales se encontró que BfP1 y OvP2 no tenían efecto sobre las cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 25923 respectivamente, después de las modificaciones tuvo un efecto contrario, por lo cual ahora tienen una mayor probabilidad de ser activos sobre todas las cepas bacterianas en estudio, mientras que hubo un efecto opuesto en los péptidos modificados BsP6M, FpP7M, CsP8M, MrP9M y MrP10M que no son activos frente a la cepa *S. aureus* ATCC 25923, pero los péptidos originales si lo fueron, no obstante siguen siendo péptidos con un alto potencial antimicrobiano (Tabla 5).

Estructura tridimensional de los péptidos originales y modificados

Se utilizó el programa AlphaFold2 junto con ColabFold para determinar la estructura tridimensional de los péptidos. Esta combinación, acelerada por MMseqs2, permite predecir cerca de 1000 estructuras al día. Se encontró que tanto los péptidos originales como los modificados adoptan una estructura de alfa-hélice, importante para las interacciones con las membranas de los patógenos, por lo tanto, se validan las modificaciones realizadas para mejorar la separación de los aminoácidos polares cargados y los hidrofóbicos. La distribución de aminoácidos influye en la estabilidad de la hélice y en la interacción péptido-membrana. Se ha determinado que la conformación de hélice anfipática es crucial para la interacción y la selectividad de los péptidos, y que las modificaciones pueden afectar este equilibrio delicado (Ciurac et al., 2019).

CONCLUSIONES

La metodología utilizada para identificar PAMs mediante herramientas *in silico* se ajustó para su desarrollo, aplicando límites rigurosos para aumentar la probabilidad de éxito. La selección de herramientas bioinformáticas avanzadas permitió buscar, diseñar y perfeccionar PAMs cortos, de manera eficiente, obteniendo 10 péptidos con probabilidad igual o superior a 98 % de ser clasificados como antimicrobianos y además 5 péptidos modificados con alta probabilidad de tener actividad antibacteriana con las cepas *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* y *S. aureus* ATCC 25923. Las estrategias computacionales y de inteligencia artificial involucradas ofrecen la posibilidad de seleccionar, modificar y predecir PAMs de manera ágil, rentable y confiable, potenciando su aplicabilidad en diversas áreas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto de investigación Hermes 55740 de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Khdhairawi, A., Sanuri, D., Akbar, R., Lam, S. D., Sugumar, S., Ibrahim, N., Chieng, S., & Sairi, F. (2023). Machine learning and molecular simulation ascertain antimicrobial peptide against *Klebsiella pneumoniae* from public database. *Computational Biology and Chemistry*, 102, 107800. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem>.

- Arora, R., Kumar, A., Singh, I. K., & Singh, A. (2020). Pathogenesis related proteins: A defensin for plants but an allergen for humans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, 659–672. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.223>.
- Branch, J.W., Orduz, S., Ceballos, A.M., Mera, C.A., Orrego, A. 2022a. PepMultiFinder 2.0. Un algoritmo para buscar péptidos bioactivos en proteomas o listas de secuencias de proteínas. Dirección Nacional de Derechos de Autor. Ministerio del Interior. Registro 13-91-434. Septiembre 12, 2022.
- Branch, J. W., Orduz, S., Ceballos, A. M., Mera, C. A., Orrego, A., Cardona, P., & Muñoz, J. (2022). AmpClass 1.0: Una herramienta informática para la predicción de la actividad antimicrobiana de péptidos [Software]. Dirección Nacional de Derechos de Autor, Ministerio del Interior.
- Browne, A. J., Chipeta, M. G., Haines-Woodhouse, G., Kumaran, E. P., Hamadani, B. H. K., Zarea, S., ... & Dolecek, C. (2021). Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. *The Lancet Planetary Health*, 5(12), e893–e904. [https://doi.org/10.1016/s2542-5196\(21\)00280-1](https://doi.org/10.1016/s2542-5196(21)00280-1)
- Chaudhary, K., Kumar, R., Singh, S., Tuknait, A., Gautam, A., Mathur, D., Anand, P., Varshney, G., & Raghava, G. (2016). A web server and mobile app for computing hemolytic potency of peptides. *Scientific Reports*, 6, 22843. <https://doi.org/10.1038/srep22843>.
- Ciumac, D., Gong, H., Hu, X., & Lu, J. R. (2019). Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 537, 163–185. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.103>.
- Dimitrov, I., Bangov, I., Flower, D. R., & Doytchinova, I. (2014). AllerTOP v.2 - A server for in silico prediction of allergens. *Journal of Molecular Modeling*, 20(6), 2278. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5>.
- Duque-Salazar, G., Mendez-Otalvaro, E., Ceballos-Arroyo, A. M., & Orduz, S. (2020). Design of antimicrobial and cytolytic peptides by computational analysis of bacterial, algal, and invertebrate proteomes. *Amino Acids*, 52(10), 1403–1412. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02900-w>.
- Ebrahimi, F., Dehghani, M., & Makkizadeh, F. (2023). Analysis of Persian bioinformatics research with topic modeling. *BioMed Research International*, 2023, 3728131. <https://doi.org/10.1155/2023/3728131>.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). *Protein Analysis Tools on the ExPASy Server* 571–571. From: *The Proteomics Protocols Handbook Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. <http://www.expasy.org/tools/>
- Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., & Drin, G. (2008). HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics*, 24(18), 2101–2102. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392>.
- Gehring, R., Mochel, J. P., & Schmerold, I. (2023). Understanding the background and clinical significance of the WHO, WOH, and EMA classifications of antimicrobials to mitigate antimicrobial resistance. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1153048. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1153048>.
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., & Raghava, G.P.S. (2013). *In silico* approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PLoS ONE*, 8(9), e73957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>.
- Guryanova, S. V., & Ovchinnikova, T.V. (2022). Immunomodulatory and allergenic properties of antimicrobial peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2499. <https://doi.org/10.3390/ijms23052499>.
- Hincapié, O., Giraldo, P., & Orduz, S. (2018). *In silico* design of polycationic antimicrobial peptides active against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111, 1871–1882. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1080-2>.
- Khabbaz, H., Karimi-Jafari, M. H., Saboury, A. A., & BabaAli, B. (2021). Prediction of antimicrobial peptides toxicity based on their physico-chemical properties using machine learning techniques. *BMC Bioinformatics*, 22(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04468-y>.
- Kim, H., Jang, J. H., Kim, S. C., & Cho, J. H. (2020). Development of a novel hybrid antimicrobial peptide for targeted killing of *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 185, 111814. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech>.
- Madrazo, A. L., & Campos, M. R. S. (2022). *In silico* prediction of peptide variants from chia (*S. hispanica* L.) with antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant potential. *Computational Biology and Chemistry*, 98, 107695. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2022.107695>.
- Makhlynets, O., & Caputo, G. (2021). Characteristics and therapeutic applications of antimicrobial peptides. *Biophysics Reviews*, 2(1), 011301. <https://doi.org/10.1063/5.0035731>.
- Maturana, P., Gonçalves, S., Martinez, M., Espeche, J. C., Santos, N. C., Semorile, L., Maffia, P. C., & Hollmann, A. (2020). Interactions of “de novo” designed peptides with bacterial membranes: Implications in the antimicrobial activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1862(11), 183443. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem>.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Met-*

- hods*, 19(6), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>.
- Monsalve, D., Mesa, A., Mira, L. M., Mera, C., Orduz, S., & Branch-Bedoya, J. W. (2024). Antimicrobial peptides designed by computational analysis of proteomes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 117(1), 55. <https://doi.org/10.1007/s10482-024-01946-0>.
- Organización Mundial de la Salud. (2021). Resistencia a los antimicrobianos. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
- Patel, H., Bhatt, D., Shakhreliya, S., Lam, N. L., Maurya, R., & Singh, V. (2021). An introduction and applications of bioinformatics. *Advances in Bioinformatics*, 1-14.
- PepMultiFinder 2.0 [Internet]. Available from: <https://ciencias.medellin.unal.edu.co/gruposdeinvestigacion/prospeccionydisenobiomoleculas/herramientas/pepmultitools.html>.
- Pfalzgraff, A., Brandenburg, K., & Weind, G. (2018). Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 281. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00281>.
- Pirtskhalava, M., Amstrong, A.A., Grigolava, M., Chubidze, M., Alimbarashvili, E., Vishnepolsky, B., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D.E., & Tartakovsky, M. (2021). DBAASP v3: Database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D288–D297. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa991>.
- Radusky, L. (2017). Herramientas bioinformáticas para el análisis estructural de proteínas a escala genómica. [Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires]
- Ronèevia, T., Puizina, J., & Tossi, A. (2019). Antimicrobial peptides as anti-infective agents in pre-post-antibiotic era? In *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5713. <https://doi.org/10.3390/ijms20225713>.
- Salem, M., Keshavarzi Arshadi, A., & Yuan, J.S. (2022). AMPDeep: hemolytic activity prediction of antimicrobial peptides using transfer learning. *BMC Bioinformatics*, 23(1), 1-17. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1615895/v1>.
- Sapay N, Guermeur Y, & Deléage G (2006). Prediction of amphipathic in-plane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-255>.
- Tamayo S, Castañeda CA, Orduz S. (2018). Type-Peptide 1.0. Herramientas computacionales pedagógicas para el estudio, diseño y optimización de péptidos antimicrobianos basada en sus propiedades físico-químicas. Dirección Nacional de Derechos de Autor. Ministerio del Interior. Registro 13-70-274. Diciembre 5, 2018
- Timmons, P., & Hewage, C. (2020). HAPPENN is a novel tool for hemolytic activity prediction for therapeutic peptides which employs neural networks. *Scientific Reports*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67701-3>
- UniProtKB [Internet]. Available from: <https://www.uniprot.org/>
- Veltri, D., Kamath, U., & Shehu, A. (2018). Deep learning improves antimicrobial peptide recognition. *Bioinformatics*, 34(16), 2740–2747. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty179>
- Vishnepolsky, B., Grigolava, M., Managadze, G., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D.E., Tartakovsky, M., & Pirtskhalava, M. (2022). Comparative analysis of machine learning algorithms on the microbial strain-specific AMP prediction. *Briefings in Bioinformatics*, 23(4), bbac233. <https://doi.org/10.1093/bib/bbac233>
- Waghu, F. H., & Idicula-Thomas, S. (2020). Collection of antimicrobial peptides database and its derivatives: Applications and beyond. *Protein Science*, 29(1), 36–42. <https://doi.org/10.1002/pro.3714>
- Wang, G. S. (2010). Structural studies of antimicrobial peptides provide insight into their mechanisms of action. *Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies*, 141-168. <https://doi.org/10.1079/9781845936570.0141>
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>
- Weeks, R., Algburi, A., & Chikindas, M. (2021). Antimicrobial peptides and peptidomimetics for the control of antimicrobial resistance. *Sustainable Agriculture Reviews 49: Mitigation of Antimicrobial Resistance Vol 2. Natural and Synthetic Approaches*, 205-249. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58259-3_7
- Xiao, H., Shao, F., Wu, M., Ren, W., Xiong, X., Tan, B., & Yin, Y. (2015). The application of antimicrobial peptides as growth and health promoters for swine. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0018-z>.