

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

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

Jairo Alexander Morillo Garcés

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2024

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

Jairo Alexander Morillo Garcés

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Biotecnología

Director (a):

Sergio Orduz Peralta Ph.D. M.Sc. Biólogo

Línea de Investigación:

Sustancias bioactivas para el control de patógenos

Grupo de Investigación:

Biología Funcional

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2024

(Dedicatoria o lema)

A mi Madre que, con sus manos trabajadoras y lucha inmensurable ante la vida, han forjado mi más sincera admiración y la fuerza para continuar.

A mis hijos quienes con su amor incondicional han hecho que mi vida tenga un motivo para seguir adelante con felicidad y fortaleza.

A mi familia, quienes han sido mi inspiración y una bendición en cada alegría y tristeza.

La mente intuitiva es un regalo sagrado y la mente racional es un fiel sirviente.

Hemos creado una sociedad que rinde honores al sirviente y ha olvidado al regalo.

Albert Einstein

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Jairo Alexander Morillo Garces

Fecha 07/12/2023

Agradecimientos

Al Doctor Sergio Ordúz Peralta, director de mi trabajo de tesis de maestría, por aportar su conocimiento, consejos y dedicación, además de extender su mano y apoyo para poder realizar este proyecto.

A mi alma máter, la Universidad Nacional de Colombia por las bases académicas que me inculcaron y llevaron a este punto tan importante del proceso educativo y a mis profesores por su profesionalismo y entusiasmo por compartir su conocimiento.

A Andrea Mesa, perteneciente al grupo de investigación de Biología Funcional de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo en el aporte de su asesoría y guía para mi proceso.

A Adriana Orbes y Alejandro Romero, quienes me impulsaron siempre a perpetuar este sueño y brindar su mano amiga y conocimientos para continuar.

A Carol Andrea Fajardo Cerón, quien con su amor y apoyo tuvo siempre palabras de apoyo y consuelo para que siga siempre adelante.

A Diana Ortiz M.Sc. por su colaboración y entusiasmo al transmitir su conocimiento apoyando a mi parte académica.

Resumen

Debido a la creciente resistencia que presentan algunos organismos patógenos a diferentes antimicrobianos se ha aumentado la necesidad de encontrar nuevos compuestos antimicrobianos como opciones de tratamiento. En respuesta, se han adoptado nuevos enfoques alternativos, entre los cuales se encuentran el uso de péptidos antimicrobianos (AMPs). Los AMPs son una parte natural del sistema inmunológico de todos los organismos, diversos estudios han demostrado que los AMPs presentan gran ventaja en comparación con los antibióticos habituales basados en su actividad de amplio espectro, mecanismos de acción, selectividad de las células huésped y menor probabilidad de generar resistencia. Por estas razones, esta investigación se enfocó en la identificación, selección, modificación y evaluación de AMPs *in silico* encontrados en el proteoma de virus, bacterias y hongos mediante el uso de herramientas bioinformáticas y de inteligencia artificial específicas que valoraron parámetros como estructura, capacidad hemolítica, toxicidad, capacidad de unión a membranas, su potencial como antimicrobianos y su posible efecto anticancerígeno y de penetración celular. Por consiguiente, se espera 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, resistencia antimicrobiana, proteomas, virus, bacterias, hongos, bioinformática, inteligencia artificial.

Abstract

Searching and design of antimicrobial peptides *in silico* through the analysis of proteomes of viruses, bacteria and fungi

Due to the increasing resistance of pathogenic organisms have developed to various antimicrobials, the need to find new antimicrobial compounds as treatment options has increased. In response, new alternative approaches have been adopted, among which are the use of 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, host cell selectivity, and are less likely to generate resistance. For these reasons, this research aimed to the identification, selection, modification, and evaluation about *in silico* 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, hemolytic capacity, toxicity, membrane-binding capability, their potential as antimicrobials, and their possible anticancer and cell-penetration effects. Therefore, 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, antimicrobial resistance, proteomes, viruses, bacteria, fungi, bioinformatics, artificial intelligence.

Contenido

	Pág.
Resumen	VI
Lista de figuras.....	X
Lista de tablas	XI
Lista de Símbolos y abreviaturas	XIII
Introducción.....	15
1. Objetivos.....	19
1.1 Objetivo general.....	19
1.2 Objetivos específicos	19
2. Marco teórico	20
2.1. Resistencia a los antimicrobianos	20
2.2. Péptidos antimicrobianos	22
2.3. Clasificación de los AMPs	23
2.4. Características de los AMPs.....	25
2.5. Mecanismos de acción	27
2.6. Procedencia de péptidos antimicrobianos en diferentes organismos	28
2.6.1 Péptidos antimicrobianos procedentes de bacterias	28
2.6.2 Péptidos antimicrobianos producidos por hongos.....	29
2.6.3 Péptidos antimicrobianos provenientes de virus	29
2.6.4 Péptidos antimicrobianos derivados de otros organismos.....	30
2.7 Potencial de los péptidos antimicrobianos	31
2.8 Diseño de péptidos antimicrobianos	36
2.9 Diseño Racional de péptidos antimicrobianos	37
3. Metodología.....	41
3.1 Selección de proteomas de organismos.....	41
3.2 Selección de los posibles AMPs	42
3.4 Evaluación de la capacidad hemolítica y de toxicidad.....	45
3.5 Valoración de unión a membranas e índice de inestabilidad de los péptidos.....	46
3.6 Predicción <i>in silico</i> de alérgenos.....	47
3.7 Identificación de los péptidos en la literatura.....	47
3.8 Predicción de la actividad antimicrobiana con patógenos específicos.....	48
3.9 Modificación de los péptidos antimicrobianos	48
3.10 Estructura de los péptidos originales y modificados	49

4. Resultados y discusión.....	50
4.1 Organismos evaluados	50
4.2 Clasificación de péptidos mediante métodos <i>in silico</i>	50
4.3 Identificación de péptidos como candidatos a ser antimicrobianos.....	52
4.4 Evaluación de la capacidad hemolítica y de toxicidad de los péptidos seleccionados	56
4.5 Valoración de unión a membranas e índice de inestabilidad de los péptidos.....	59
4.6 Predicción <i>in silico</i> de la probabilidad de los péptidos como alérgenos	61
4.7 Evaluación de similitud en APD3	62
4.8 Predicción de la actividad antimicrobiana.....	64
4.9 Modificaciones de los péptidos	66
4.10 Estructura tridimensional de los péptidos originales y modificados	77
4.11 Propiedades adicionales de los péptidos originales y modificados	81
5. Conclusiones y recomendaciones.....	89
5.1 Conclusiones	89
5.2 Recomendaciones.....	90
A. Anexo. Proteomas de organismos evaluados.....	91
B. Anexo: Resultados de péptidos encontrados con PepMultiFinder 2.0. Se destaca la secuencia, organismo, proteína de origen y posición en la proteína	96
Bibliografía.....	117

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Estructura α -hélice de algunos péptidos antimicrobianos	23
Figura 2: Estructura hoja β de algunos péptidos antimicrobianos	24
Figura 3: Estructura de AMPs flexibles de algunos péptidos antimicrobianos.....	25
Figura 4: Diagrama de flujo de la metodología de selección y mejoramiento de los péptidos antimicrobianos con herramientas bioinformáticas y de inteligencia artificial	49
Figura 5: Rueda helicoidal de los péptidos originales y modificados obtenida con HeliQuest	67
Figura 6: Estructura 3D de los péptidos originales y modificados obtenidas con AlphaFold2.	78

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Mecanismos de resistencia a los antibióticos en diferentes especies de bacterias.....	33
Tabla 2: Repositorios de datos y herramientas de bioinformática para el estudio de compuestos antimicrobianos.....	39
Tabla 3: Conjunto de proteomas seleccionados aleatoriamente desde UniProtKB.....	42
Tabla 4: Péptidos destacados identificados en el análisis bioinformático de proteomas con PepMultiFinder 2.0 y su información de origen.	53
Tabla 5: Péptidos encontrados con alto potencial antimicrobiano y su posición en la proteína de origen.	54
Tabla 6: 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.....	55
Tabla 7: Clasificación de la capacidad hemolítica y toxicidad de los péptidos seleccionados con en el análisis bioinformático de proteomas y herramientas de inteligencia artificial	58
Tabla 8: Clasificación de la capacidad de unión de membranas e índice de inestabilidad de los péptidos seleccionados de entre los encontrados en el análisis bioinformático de proteomas	61
Tabla 9: Porcentaje de similitud de los péptidos de este estudio con péptidos bioactivos contenidos en la plataforma en APD3.....	63
Tabla 10: Predicción de la actividad antimicrobiana de los 10 péptidos seleccionados en la plataforma DBAASP v3, utilizando el método Machine Learning.....	65
Tabla 11: Características fisicoquímicas de los péptidos originales y de los modificados.....	69
Tabla 12: Determinación de la probabilidad como antimicrobianos en diferentes plataformas de inteligencia artificial de los péptidos modificados	72
Tabla 13: Predicción del potencial hemolítico, de toxicidad y predicción de alergenicidad de los péptidos modificados	74
Tabla 14: Capacidad de unión a membranas e índice de inestabilidad de los péptidos modificados. 75	75
Tabla 15: Predicción de la actividad antimicrobiana de los 10 péptidos modificados utilizando el método Machine Learning de la plataforma DBAASP v3.....	76
Tabla 16: Predicción de la actividad antifúngica (Antifp), anticancerígena (AntiCP) y la capacidad de penetración celular (CellPPD) en células eucariotas de los péptidos originales y modificados.....	81
Tabla 17: Predicción de la penetración celular (CPP) y de eficiencia de absorción de los péptidos originales y modificados con la herramienta MLCPP 2.0.....	82
Tabla 18: Predicción de la actividad antiviral de los péptidos originales con diferentes modelos de la herramienta AVPPred	86

Tabla 19: Predicción antiviral de los péptidos modificados con diferentes modelos de la herramienta AVPred	87
---	----

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
A	Alanina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AI4AMP	Identify Anti-Microbial Peptides in AI
AMPs	Péptidos antimicrobianos
AMPHIPASEEK	Amphipathic In-Plane Membrane Anchors Prediction
AMP Scanner	Antimicrobial Peptide Scanner
ANN	Artificial Neural Network
AntiCP	An updated model for predicting anticancer peptides
Antifp	A Prediction server for Antifungal Peptide
APD	Antimicrobial Peptide Database
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
C	Cisteína
CAMP	Collection of Anti-Microbial Peptides
CELLPPD	Cell Penetrating Peptide
D	Ácido Aspártico
DBAASP	Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides
E	Ácido Glutámico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
HAPPENN	Hemolytic Activity Prediction for Peptides Employing Neural Networks
HemoPI	Hemolytic Peptide Identification Server
HDP	Péptidos de defensa del huésped
I	Isoleucina
K	Lisina
kDa	Kilodaltons
L	Leucina
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
ML	Machine-learning
N	Asparagina
P	Prolina
pH	Potencial de Hidrógeno

Abreviatura	Término
ProtParam	Protein Physical & chemical Properties Prediction
R	Arginina
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SVM	Support Vector Machine
T	Treonina
TOXINPRED	Designing and prediction of toxic peptides
UniProtKB	Universal Protein Knowledgebase
V	Valina
μ H	Momento hidrofóbico
W	Triptófano
Y	Tirosina
2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones

Introducción

El descubrimiento y la aplicación de fármacos en la práctica clínica representó un avance revolucionario e importante de la medicina para el control de las enfermedades infecciosas, elevando considerablemente la esperanza de vida de las personas y salvando millones de ellas. Además, los medicamentos han contribuido al éxito en diversos campos clínicos donde se encuentran enfermedades bucales, gastrointestinales, respiratorias, óseas, articulares y de los ojos, cicatrización de heridas, problemas de la piel entre otras, donde las infecciones tienen alta prevalencia (Luong et al., 2020). No obstante, el uso indiscriminado de antibióticos potentes y de amplio espectro ha generado altas tasas de resistencia antimicrobiana (Schmidt, 2017), siendo esta una de las causas de muerte más importante alrededor del mundo, ya que la efectividad de los antibióticos se ve afectada por la aparición de microorganismos resistentes y multirresistentes, lo que hace necesario cambiar el enfoque para su tratamiento. En relación con lo anterior, los antimicrobianos utilizados en la medicina veterinaria tienen gran similitud con las moléculas usadas en la medicina humana, sin embargo, su uso como promotores de crecimiento e inadecuado manejo supone un riesgo para la salud, ya que la cadena alimentaria es una de las principales fuentes de propagación de cepas, transmisión de residuos antimicrobianos y su capacidad de resistencia (Espinosa et al., 2019; Rodríguez y Méndez, 2021). Otra razón para que la resistencia a los antibióticos aparezca tan rápido es que la mayoría de los antibióticos actuales se han desarrollado a partir de compuestos producidos por microorganismos ambientales, reportes de la última década indican la presencia de genes de resistencia a antibióticos en muestras de suelos antiguos de México, EE.UU. y Canadá, que datan de 5.000 a 4 millones de años (Bhullar et al., 2012, D'Costa et al., 2011; Perron et al., 2015). Estos resultados confirman que la resistencia microbiana es un proceso natural, antiguo, e inevitable y es producto de las interacciones dinámicas y competitivas de los microorganismos que se han transmitido a través de genes de resistencia y les ha contribuido significativamente a su supervivencia y, por lo tanto, no responde únicamente a la presión selectiva debida al uso de antibióticos en la práctica médica.

Durante el año 2020 la humanidad vivió una difícil situación sanitaria debido a una pandemia provocada por el virus SARS-CoV-2, y que, gracias al enorme esfuerzo de grandes laboratorios científicos, gobiernos y empresas farmacéuticas en todo el mundo, se han podido desarrollar vacunas contra este patógeno en muy poco tiempo (Quintero, 2021). Sin embargo, aún podrían existir otros microorganismos de este tipo que son ignorados y que podrían ser fatales para la humanidad, por lo cual no se tiene un objetivo claro sobre cómo afrontar este tipo de eventos.

Frente a esta situación, los péptidos antimicrobianos (AMPs) se han convertido en una alternativa prometedora para tratar las enfermedades causadas por diversos microorganismos y para enfrentar la creciente resistencia a los antimicrobianos. En enero de 2024, la base de datos de péptidos antimicrobianos APD3 reporta 3940 péptidos, que incluyen 3146 AMPs, de los seis reinos de la vida, de la siguiente manera 383 bacteriocinas (antibióticos peptídicos de bacterias), 5 de arqueas, 8 de protistas, 29 de hongos, 250 de plantas y 2463 de animales, Además 190 AMPs predichos y 314 sintéticos con diferentes actividades inhibitorias. Su función como moléculas claves de la inmunidad innata justifica su potencialidad como agentes terapéuticos antiinfecciosos, además los AMPs son altamente selectivos y pueden distinguir entre las dianas microbianas y las células huésped. Son capaces de evadir los mecanismos clásicos de resistencia de los agentes infecciosos a diferencia de los medicamentos convencionales (Vázquez et al., 2018).

Asimismo, los estudios sobre los AMPs y sus aplicaciones se han convertido en una parte clave en las áreas de ciencia agrícola, biología, medicina y fisiología, además de tener aplicaciones potenciales en medicina y en producción animal (Xiao et al., 2015). El potencial de estas moléculas para regular el sistema inmunológico está incrementando y podrían actuar en terapias directas o indirectas a través de la inmunomodulación. Por ejemplo, se ha demostrado que el péptido antimicrobiano catelicidina D-CATH2-2 modula el sistema inmunológico y, por lo tanto, genera una protección parcial contra la infección por *Escherichia coli*, sin ningún signo adverso a este componente (Cuperus et al., 2016).

Por otro lado, durante las últimas tres décadas, ha surgido un interés significativo en aprovechar terapéuticamente los péptidos antimicrobianos derivados de células humanas (CHDP) por sus siglas en ingles. Desde 2017, se han publicado unos 5,000 artículos en esta área de investigación (Mookherjee et al., 2020). Hasta la fecha se encuentran publicados más de 18.000. de la misma forma Ji et al., (2024), en su trabajo menciona algunos péptidos en ensayos clínicos como agentes

antimicrobianos, con actividad en el tratamiento de heridas e infecciones, agentes antifúngicos e inhibición de bacterias gramnegativas, entre otras. Aunque estos todavía se limitan al tratamiento local, se impulsa a que se debe realizar más investigación para la aplicación básica y clínica.

Hasta cierto punto, los péptidos antimicrobianos son una buena alternativa farmacéutica, pero son sensibles ante las condiciones ambientales, muchos de ellos tienen potencial de toxicidad, pueden generar alergias y su costo a nivel industrial puede ser muy elevado (Pfalzgraff et al., 2018). Para abrir las aplicaciones clínicas, es necesario e importante desarrollar análogos sintéticos de AMPs y de larga duración que superen las desventajas de los péptidos naturales y los problemas potenciales para los candidatos a fármacos. Con el objetivo de acelerar el proceso de búsqueda, diseño y evaluación de péptidos con capacidad antimicrobiana y disminuir así los costos de las investigaciones *in vitro*, es conveniente el uso de aplicaciones de bioinformática y de inteligencia artificial.

La cámara de comercio de Bogotá en su informe en el sector farmacéutico de febrero de 2024, afirma que el sector farmacéutico nacional se especializa en la fabricación de medicamentos genéricos, cubriendo aproximadamente el 80% de la demanda interna, lo que equivale al 12,5% del Producto Interno Bruto (PIB). Sin embargo, la producción entre enero y noviembre de 2023 experimentó dificultades debido a problemas como la escasez de materias primas y los retrasos en el transporte de insumos importados. Por otro lado, las exportaciones de medicamentos colombianos han tenido un crecimiento sostenido desde 2019. Entre enero y noviembre de 2023, el valor de estas exportaciones subió un 5,6% en comparación con el mismo periodo del año anterior. Además, el volumen de productos exportados tuvo un incremento anual del 8,2%, pasando de 52,6 mil toneladas en 2022 a 58 mil toneladas en 2023, sin embargo Organizaciones como la Organización Mundial de la Salud, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (Cepal) han solicitado a los países a implementar acciones urgentes para impulsar la producción nacional de medicamentos, avanzando hacia una mayor autonomía sanitaria, que se considera crucial en el contexto actual. En relación a lo anterior, este estudio aborda el proceso de selección, análisis y modificación de péptidos a nivel informático (*In silico*), identificados en proteomas de virus, bacterias y hongos. Para ello, se empleó herramientas bioinformáticas que permiten determinar la efectividad y viabilidad de estos péptidos como posibles agentes antimicrobianos. El propósito es llevar estos hallazgos a una fase

de pruebas en laboratorio (*In vitro*) y, con el tiempo, avanzar hacia ensayos clínicos que impliquen pruebas en organismos vivos (*In vivo*). La meta final es que, si los resultados son exitosos, estos péptidos puedan ser producidos y utilizados a gran escala para el tratamiento de infecciones microbianas.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Determinar péptidos antimicrobianos (AMPs) *in silico* mediante el análisis de proteomas de virus, bacterias y hongos.

1.2 Objetivos específicos

- Identificar AMPs encriptados en los proteomas con herramientas bioinformáticas.
- Caracterizar los nuevos AMPs a partir de secuencias obtenidas de los proteomas.
- Optimizar la actividad antimicrobiana de los AMPs promisorios mediante herramientas de inteligencia artificial *in silico*.

2. Marco teórico

2.1. Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia puede definirse como un mecanismo para la conservación al que acuden algunos microorganismos en respuesta a uno o varios antimicrobianos, por medio de mecanismos de acción que disminuyen considerablemente la capacidad inhibitoria que poseen los fármacos (Bisso, 2018).

La resistencia a los antimicrobianos ha sido también llamada epidemia silenciosa y es considerada la responsable de 700.000 muertes en todo el mundo anualmente (Da Silva et al., 2020). Se ha descrito un grupo de bacterias que han demostrado su capacidad para evadir los efectos de casi cualquier antimicrobiano y causar infecciones hospitalarias (Chávez, 2020). Dentro de este grupo se encuentran seis patógenos nosocomiales *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp., denominados de acuerdo a su acrónimo como ESKAPE (Mulani et al., 2019). Se estima que para el año 2050, la resistencia sea la responsable de provocar aproximadamente 10 millones de muertes anuales en el mundo (Organización Panamericana de Salud, 2021). Además, se debe tener en cuenta que este es un fenómeno que aparece de forma natural debido a diferentes mecanismos, generalmente por modificaciones genéticas donde las vías de adquisición de la resistencia se generan mediante mutaciones en el cromosoma o por el intercambio de genes de resistencia; pero este proceso natural, puede acelerarse por el uso inadecuado de los antimicrobianos, tanto en humanos como en la producción agropecuaria (Minsalud, 2018; Quiñones, 2017).

Hace menos de 100 años con la aparición de los antibióticos y su implementación en la práctica clínica, se establecieron intervenciones trascendentales en el tratamiento y control de enfermedades infecciosas, aumentando considerablemente la esperanza de vida (Martínez, 2020; Organización Panamericana de Salud, 2019). La diversidad de los antibióticos ha sido útil para

combatir diferentes tipos de microorganismos logrando salvar un sinnúmero de vidas. Sin embargo, su uso incorrecto para tratar enfermedades que no son causadas por bacterias, su almacenamiento incorrecto, la automedicación, la interrupción de los tratamientos, no cumplir con la dosis y el tiempo indicado (Quintero, 2021), ha generado varios mecanismos de resistencia en organismos patógenos y no patógenos, disminuyendo así la acción de los fármacos comúnmente utilizados durante años para su tratamiento, provocando incluso la muerte (López et al., 2022). Esta problemática también se ve reflejada en la crianza de animales, puesto que algunas drogas se prescriben cuando no se las requiere o se aplican a dosis subinhibitorias, o cuando la duración del tratamiento es inapropiada y en algunos países se ha utilizado como promotores de crecimiento para la cría intensiva de animales de consumo (Nastro, 2019). Los antibióticos erradamente utilizados pueden favorecer la aparición de resistencia, ya sea en los sectores de la salud humana, producción animal o agrícola, puesto que aquí se seleccionan genes que fácilmente son transferibles desde bacterias ambientales a patógenos de animales y de humanos. Posteriormente, estos microorganismos con resistencia pueden dispersarse sutilmente entre humanos, animales y el ambiente (Martínez, 2020).

En el caso de las bacterias, los genes o grupos de genes de resistencia se pueden transmitir horizontalmente entre individuos de la misma especie y entre individuos de diferentes especies, generalmente mediante plásmidos, integrones y transposones; esta última ocurre a través de conjugación, transformación o transducción, siendo la forma más común, ya que los transposones son elementos genéticos que pueden movilizarse dentro y fuera del cromosoma facilitando la incorporación de genes de resistencia múltiple al genoma o a plásmidos (Bisso, 2018; López et al., 2016; Serra, 2017).

Los mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos incluyen la inactivación de los antibióticos por hidrólisis, alteración del sitio blanco de acción del antibiótico, evitando que pueda acceder al sitio blanco y la expulsión del antibiótico desde interior de la célula a través de transportadores y bombas de eflujo unidos a la membrana. Los mecanismos de resistencia ocurren principalmente como resultado de mutaciones de genes y / o transferencia lateral de genes de resistencia de otros patógenos (Penesyan et al., 2015). Estos mecanismos se han visto favorecidos porque la mutación de los microorganismos avanza considerablemente en comparación con el

descubrimiento de nuevos antimicrobianos, dando lugar a la disminución de la susceptibilidad (Contreras et al., 2021).

En los inicios de la era de los antibióticos se creía que al conocer los mecanismos de resistencia de los microorganismos se podría contrarrestar ese efecto mediante la síntesis de nuevos compuestos, sin embargo, el uso de antibióticos en concentraciones subterapéuticas durante largos periodos de tiempo favoreció el desarrollo de cepas resistentes y generaron un fuerte impacto al modificar la microbiota natural de organismos y ambientes (Belloso, 2009).

En este contexto, la resistencia a los antimicrobianos se considera un grave problema de salud pública y requiere de atención por parte de los entes gubernamentales, educativos, la industria farmacéutica y sectores relacionados con investigación e innovación para la búsqueda de soluciones donde los péptidos antimicrobianos son una alternativa prometedora a los antimicrobianos.

2.2. Péptidos antimicrobianos

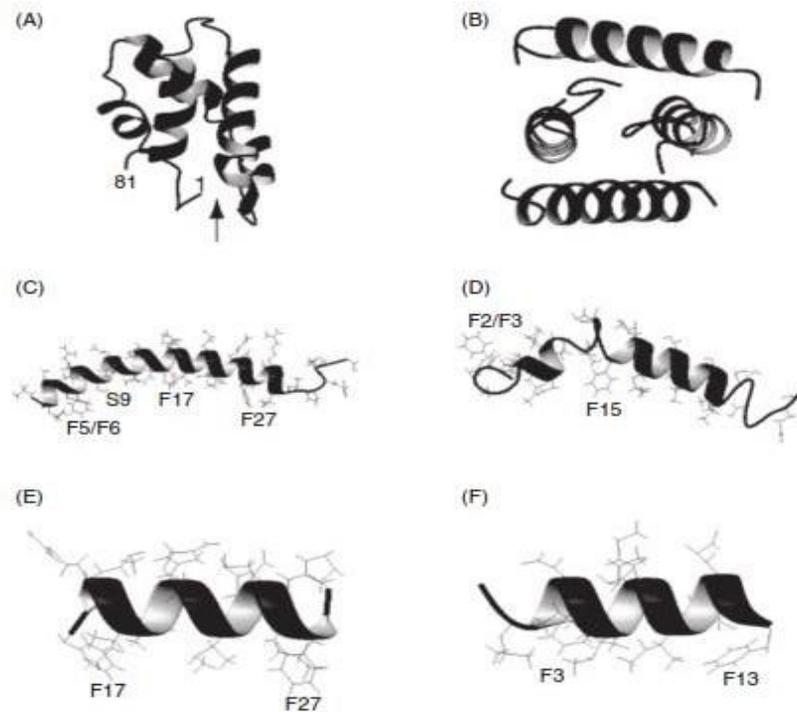
Los péptidos antimicrobianos (AMPs) fueron descubiertos por primera vez en 1922, son moléculas cortas efectoras del sistema inmune innato, que se encuentran en la mayoría de organismos, desde bacterias hasta mamíferos (Téllez y Castaño, 2010). La mayoría son catiónicas y anfifílicas que exhiben una notable selectividad por las bacterias, tienen baja citotoxicidad y las bacterias han mostrado poco potencial para el desarrollo de resistencia (Makhlynets y Caputo, 2021). Los AMPs actúan como moléculas efectoras del sistema inmune en defensa del huésped, intervienen en el control de infecciones, inflamación, angiogénesis, reclutamiento celular y también fungen como agentes anticancerígenos (Wuerth, 2017). De igual manera pueden tener actividades antibacterianas, antiviral, antifúngica, antiparasitarias y anticancerígenas que enfatizan en las funciones inmunomoduladoras con propiedades quimiotácticas, apoptóticas y de cicatrización de heridas (Wang, 2017).

2.3. Clasificación de los AMPs

Los AMPs se pueden clasificar según la longitud, los más cortos contienen solo 2 amino ácidos, mientras que el péptido más corto (sin conjugación), contiene solo 5 aminoácidos. Alrededor del 90% de los péptidos se componen con menos de 50 aminoácidos (Wang, 2017). También se pueden catalogar en relación con su carga en péptidos catiónicos, neutros y aniónicos, entre +2 a +9 a pH fisiológico. Sin embargo, estos péptidos naturales difieren significativamente en secuencia y estructura (Mookherjee et al., 2020)

De acuerdo con su estructura tridimensional pueden clasificarse en péptidos alfa hélice, péptidos hoja beta o en péptidos extendidos/flexibles (Kumar et al., 2018). Los péptidos de hélice α (Figura 1) contienen residuos de alanina, leucina y lisina para estabilizar la hélice, pero no contiene residuos de cisteína, entre estos se encuentran las magaininas, cecropinas, temporinas, fowlicidinas y melitina (Tornesello et al., 2020).

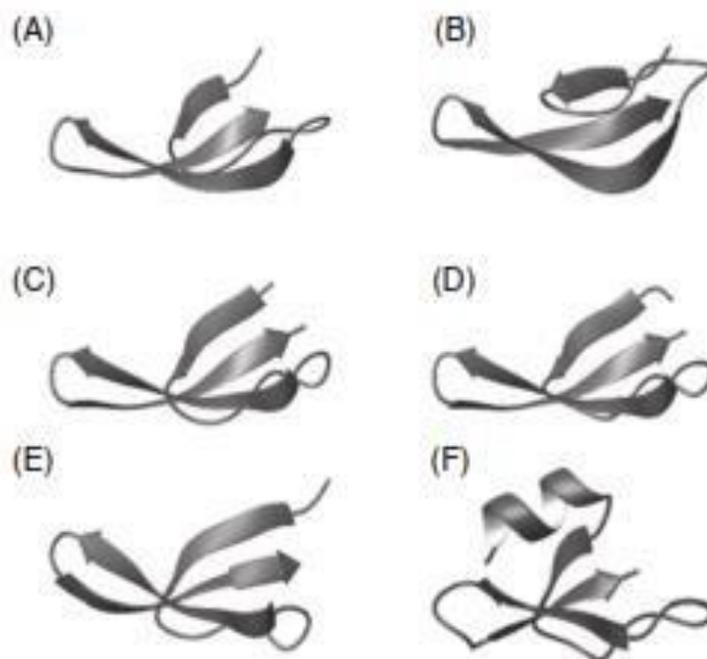
Figura 1: Estructura α -hélice de algunos péptidos antimicrobianos



Estructura tridimensional de péptidos de la familia α -hélice A. Caenopore-5 (*Caenorhabditis elegans*), B Distintina (AMPs doble cadena de ranas), C Catelicidina (humanos), D. Pardaxina (pez), E. LL-37 (humanos), F. Aureina (ranas australianas) (Wang, 2010).

El grupo de hoja β (Figura 2) son ricos en prolina, glicina, triptófano, arginina o histidina y contienen de dos a diez residuos de cisteína que forman hasta cinco puentes disulfuro, aquí se incluyen defensinas de humanos, plantas e insectos, plectasina, lactoferricina, taquiplesina y tanatina (Tornesello et al., 2020).

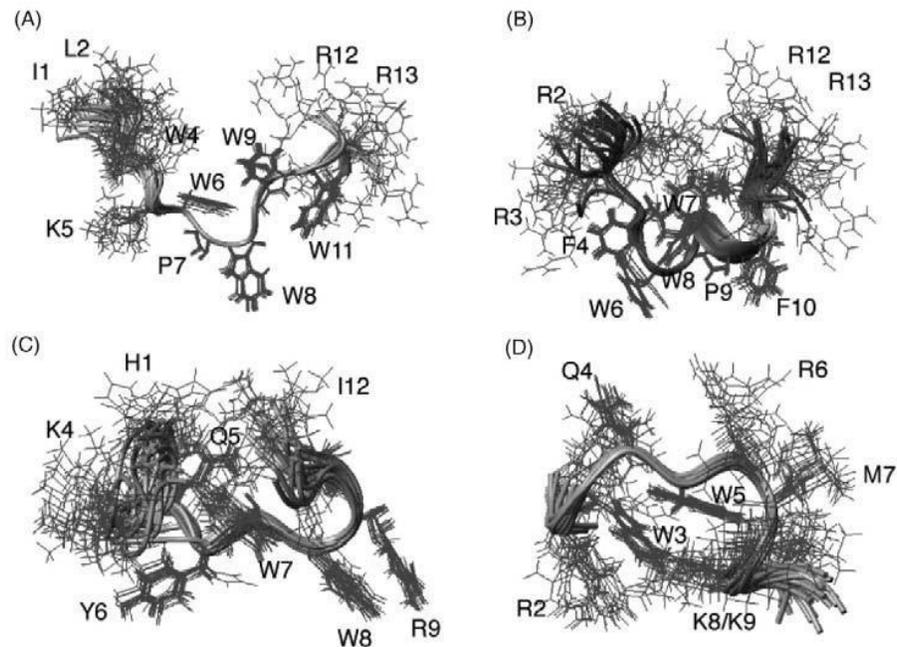
Figura 2: Estructura hoja β de algunos péptidos antimicrobianos



Estructura tridimensional de AMPs de la familia β . (A) HNP-1 (Protein Data Bank (PDB) ID: 3GNY); (B) HNP-3 (PDB ID: 1DFN); (C) HNP-4 (PDB ID: 1ZMM); (D) HD-5 (PDB ID: 1ZMP); (E) HD-6 (PDB ID: 1ZMQ); (F) hBD-1 (PDB ID: 1IJV) (Wang, 2010)

Los péptidos flexibles o extendidos (Figura 3) son generalmente lineales, contienen aminoácidos poco frecuentes e incluyen tritripticina, PR-39, histatinas, bactenecinas e indolicidina, siendo esta última la única molécula activa frente a las membranas de los organismos patógenos (Tornesello et al., 2020).

Figura 3: Estructura de AMPs flexibles de algunos péptidos antimicrobianos



Estructura de AMPs flexibles. A Indolicidina bovina; B. Trypticina; C. PW2 D. Lactoferrina B2 (Wang, 2010).

2.4. Características de los AMPs

Generalmente, los AMPs son moléculas pequeñas aproximadamente de 2 kDa, contienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos o apolares, estructuras de hélices alfa, momento hidrofóbico y anfipaticidad (Lima et al., 2021). Están codificados en el genoma, se producen mediante el proceso normal de traducción ribosómica de un molde de ARNm. El primer producto suele ser una preproteína que luego se procesa hasta la longitud final del AMP activo (Mejía et al., 2020).

El mecanismo de acción que los AMPs utilicen dependerá de su longitud y de su composición. La longitud también influirá en la capacidad de atravesar completamente la membrana bacteriana (Chu-Kung et al., 2010). La cantidad de aminoácidos presentes en los AMPs influyen significativamente en su estructura secundaria y en su mecanismo de acción (Cardillo et al., 2018).

La composición de aminoácidos influye en las funciones de los AMPs dependiendo de los aminoácidos en común entre los objetivos y los mecanismos antimicrobianos (Weeks et al., 2021). En este caso se puede mencionar, las diferencias en predominancia de aminoácidos en los AMPs de acuerdo con su actividad; por ejemplo, los péptidos anticancerígenos son ricos en leucina, glicina, serina y lisina, mientras que los péptidos quimiotácticos tienen alto contenido de cisteína, glicina, treonina y arginina; los AMPs con actividad citotóxica, insecticida, anticancerígena o antibacteriana tienen a la leucina como un aminoácido importante; los AMPs con actividad quimiotáctica, antiparasitaria, antiviral o antifúngica tienen mayor presencia de cisteína, en el caso de AMPs con actividades quimiotácticas y antivirales el aminoácido que predomina es la arginina, finalmente en AMPs espermicidas la alanina es el aminoácido en mayor cantidad (Mishra y Wang, 2012).

La carga eléctrica ejerce un efecto determinante sobre la actividad de los péptidos y depende de la composición de aminoácidos, la posición y cantidad de residuos dentro de su estructura. Estudios han demostrado la correlación entre la carga y su influencia entre las interacciones peptídicas con la membrana, efecto antimicrobiano, nivel de toxicidad y selectividad (Weeks et al., 2021). Los AMPs catiónicos pueden unirse e interactuar con las membranas celulares con carga negativa, generando un cambio del potencial electroquímico, provocando un daño y facilitando la penetración de moléculas más grandes como proteínas, destruyendo la morfología celular y las membranas, provocando finalmente la muerte (Lei et al., 2019).

La hidrofobicidad influye directamente en las interacciones péptido-membranas microbianas, al estar relacionada con la capacidad de penetración de la bicapa lipídica y el grado de interacción (Pasupuleti et al., 2012). La interacción entre los grupos cargados y los residuos hidrofóbicos es compleja, ya que el grado y el posicionamiento de la carga positiva juega un papel importante en el reconocimiento y la adhesión a la membrana, mientras que la hidrofobicidad es esencial para la inserción, interrupción o transposición adecuada de la membrana (Weeks et al., 2021). La anfipaticidad hace referencia a la distribución y abundancia entre residuos hidrofóbicos e hidrofílicos presentes en la estructura primaria, siendo una característica determinante en la actividad antimicrobiana ligada a la estructura 3D. Sin embargo, a pesar de que la anfipaticidad influye en la actividad antimicrobiana y en el nivel de toxicidad, no se puede establecer una

relación clara entre ellas, porque en algunos casos esta característica ha mostrado efectos contradictorios al ser comparados con diferentes péptidos antimicrobianos (Weeks et al., 2021).

2.5. Mecanismos de acción

Los AMPs juegan un papel importante en los sistemas inmunológico innato y en el inmunológico adaptativo de los organismos superiores y son denominados péptidos de defensa del huésped (HDP, por sus siglas en inglés), que se encuentran en los dos sistemas cumpliendo funciones citotóxicas directas contra agentes infecciosos (Makhlynets y Caputo, 2021). Estos péptidos se encuentran en la mayoría de especies y un solo organismo puede contener un número mayor a 24 péptidos diferentes, que se producen en grandes cantidades en los sitios de infección y / o inflamación, confiriendo características antisépticas de amplio espectro (Hancock y Diamond, 2000). Los AMPs actúan directamente sobre los microorganismos, provocando la muerte o favoreciendo el ataque de los macrófagos (Makhlynets y Caputo, 2021).

De igual manera, se ha demostrado que algunos AMPs, como LTX-315, inducen la liberación de antígenos tumorales y dañan potentemente los patrones moleculares asociados al causar alteraciones en los organelos intracelulares de las células cancerosas. Así mismo, varios péptidos son capaces de causar toxicidad de las células cancerosas humanas al ser atraídos a fosfatidilserina cargada negativamente, que se expone selectivamente en la superficie exterior de las membranas plasmáticas de las células cancerosas (Tornesello et al., 2020).

Su naturaleza catiónica permite que su mecanismo de acción sea mediante la unión a los lipopolisacáridos con carga negativa del patógeno, concentrándose en su membrana a través de fuerzas de acción electrostática. Durante esta interacción los AMPs adquieren una conformación tridimensional que optimiza la unión a la membrana, por otra parte, debido a diferencias en la composición de la membrana celular entre organismos eucariotas y procariotas, su interacción con el objetivo evita efectos nocivos al huésped (Semreen et al., 2018). Los péptidos antimicrobianos son conocidos por su capacidad para inactivar y matar microorganismos al desestabilizar sus membranas. Sin embargo, nuevos datos sugieren que algunos AMPs también actúan a través de mecanismos no líticos, es decir, sin romper las membranas. Estos mecanismos alternativos pueden

implicar la inhibición de la síntesis de proteínas, las funciones del ADN y las enzimas intracelulares esenciales, o la alteración de la síntesis de la pared celular. (Scocchi et al., 2017).

De acuerdo con su efecto letal directo se pueden clasificar en péptidos dirigidos a la membrana y péptidos no dirigidos a la membrana o con mecanismos de direccionamiento intracelular. En ambos casos, es importante la interacción con la membrana celular y necesaria para los efectos antimicrobianos; en términos de selectividad se pueden clasificar en dos categorías principales según su funcionalidad: Péptidos citolíticos no selectivos, que pueden atacar tanto células de mamíferos como microorganismos, y Péptidos citolíticos selectivos, que están dirigidos exclusivamente contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos y virus, y no afectan a células de mamíferos a concentraciones similares. Esta selectividad es un factor crítico cuando se utilizan estos péptidos en tratamientos médicos o como agentes antimicrobianos. (Segev-Zarko et al., 2017).

Su actividad inicia por la atracción electrostática con la membrana; y debido a la naturaleza anfipática de los péptidos, algunos se insertan en la membrana o se pueden alinear de manera paralela. Los que se insertan en la bicapa de las membranas, forman poros mediante mecanismos de "duela de barril", o "poros toroidales", mientras que los que se alinean de manera paralela pueden causar un efecto detergente y generar nanovesículas a partir de la membrana (Brogden, 2005).

2.6. Procedencia de péptidos antimicrobianos en diferentes organismos

2.6.1 Péptidos antimicrobianos procedentes de bacterias

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por bacterias y se clasifican en 3 clases principales según sus propiedades estructurales y fisicoquímicas: bacteriocina de clase I, bacteriocina de clase II y bacteriocina de clase III (Negash y Tsehai 2020). Para las bacterias Gram positivas, las bacteriocinas de clase I, conocidas como lantibióticos, se distinguen por la presencia de anillos de tioéter. Los péptidos de clase II no son lantibióticos y se dividen en cuatro subgrupos.

Por ejemplo, las bacteriocinas similares a pediocinas, como la leucocina A y la divercina V41, están en la clase IIa. La clase IIb incluye bacteriocinas con dos cadenas peptídicas separadas, como la plantaricina JK y la lactocina 705. Los péptidos cíclicos forman parte de la clase IIc. Los péptidos lineales no pediocínicos restantes se agrupan en la clase IId, como la entericina Q y la MR10 (Wang 2017).

Recientemente, se ha establecido una clasificación para las bacteriocinas de bacterias Gram-negativas. Los péptidos pequeños, de menos de 10 kDa, se conocen como microcinas y se dividen en dos grupos principales. Las microcinas de clase I son muy pequeñas, de menos de 5 kDa y las microcinas de clase II son un poco más grandes, entre 5 y 10 kDa, y se subdividen en dos tipos: clase IIa y clase IIb. (Wang y Zasloff 2010). Los péptidos de clase IIa tienen enlaces disulfuro, mientras que las microcinas de clase IIb son lineales y cuentan con una modificación química en el extremo C (Duquesne et al., 2007).

2.6.2 Péptidos antimicrobianos producidos por hongos

Hay dos clases principales de AMPs producidos por hongos. La primera clase son los peptaiboles de hongos del suelo de los géneros *Trichoderma* y *Emericellopsis*. Por lo general, constan de 15 a 20 aminoácidos con un alto contenido de ácido aminoisobutírico. Además, el extremo N generalmente contiene un acetilo, mientras que el extremo C tiene un hidroxilaminoácido. Por tanto, se les da el apellido peptaiboles. Por otro lado, están los AMPs fúngicos similares a las defensinas que comúnmente contienen múltiples enlaces disulfuro, como por ejemplo plectasina, micasina-1 y copsina (Wang, 2017).

2.6.3 Péptidos antimicrobianos provenientes de virus

Algunos estudios han investigado el uso de péptidos derivados de virus con resultados prometedores. Por ejemplo, Wang et al., (2017) desarrollaron un péptido dirigido a las células de cáncer de ovario HO-8910, (NPMIRRQ), utilizando el método de biopanning. Este péptido, obtenido de una biblioteca de fagos M13 Ph.D.-7, demostró su capacidad para unirse

selectivamente a células de cáncer de ovario, sin unirse a células de cáncer de cuello uterino. Este comportamiento fue confirmado mediante ensayos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica. Por su parte, Zhou et al., (2015) crearon otro péptido dirigido a las células de cáncer de ovario HO-8910, (SWQIGGN), que fue seleccionado de una biblioteca de fagos Ph.D.-C7C. Este péptido mostró su capacidad para controlar la migración, la viabilidad, la capacidad de adhesión, la invasión y el crecimiento tumoral del cáncer de ovario *in vivo*. Bignone et al., (2014) desarrollaron péptidos utilizando la técnica de presentación de fagos para identificar, aislar y expandir células madre pluripotentes deseadas a partir de una mezcla de líneas celulares hPS provenientes de donantes sanos y enfermos. Los péptidos seleccionados, EWLFEFPTPVDA y DWIATWPDAVRS, demostraron una mayor afinidad por las células progenitoras embrionarias en comparación con péptidos de control como RGD y biotina, como se demostró en un ensayo de inmunofluorescencia.

2.6.4 Péptidos antimicrobianos derivados de otros organismos

Las defensinas son AMPs que se encuentran en animales y plantas, también existen péptidos similares producidos por hongos. Las vías de señalización inmunológica en estos organismos regulan la expresión génica de los péptidos incluyendo receptores celulares que reaccionan a patrones moleculares asociados a patógenos. Después del reconocimiento del patógeno, se activan las vías de señalización y, posteriormente, los factores transcripcionales. Las defensinas actúan como inmunomoduladores y atractores de células inmunes (Contreras et al., 2020).

Los AMPs de plantas llamados defensinas tienen entre 45 a 54 aminoácidos, son ricos en cisteínas, característica que les permite formar estructuras con una alta estabilidad química, proteolítica y térmica (puentes disulfuro). Aunque los AMPs poseen diferencias en longitud, composición de aminoácidos y estructura tridimensional tienen características importantes que se relacionan con actividades como antifúngicos o antibacterianos (Cardillo et al., 2018; Muñoz et al., 2020).

Las cecropinas derivadas de insectos se encuentran en los gusanos de seda, las abejas y en la *Drosophila*, tiene diferentes actividades contra enfermedades inflamatorias y cancerígenas (Dutta

et al., 2019). Los AMPs varía mucho entre especies, por ejemplo, la mariquita arlequín invasora (*Harmonia axyridis*) y la mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) tienen hasta 50 AMP, mientras que el pulgón de los guisantes (*Acyrtosiphon pisum*) carece de AMPs (Shelomi et al., 2020). Jellein, un péptido derivado de la jalea real de abeja, tiene efectos sobre varias bacterias y hongos, y en su forma conjugada con ácido láurico puede inhibir el parásito *Leishmania major* (Zahedifard et al., 2020).

En insectos, los microorganismos patógenos al lograr traspasar las primeras barreras de protección activan un segundo sistema de mecanismo de defensa más complejo, que es el sistema inmune sistémico, que produce péptidos y enzimas bacteriolíticas. En dicho sistema se encuentra la síntesis de péptidos antimicrobianos que tiene dos mecanismos de defensa, el primero es el sistema de la profenoloxidasa también presente en crustáceos, que lleva a cabo su acción a través de la melanización y consecuente inactivación de los agentes agresores; y el segundo es el mecanismo de coagulación de la hemolinfa que produce la inmovilización de los elementos nocivos en la zona de invasión o ataque (Medina y Fernández, 2014).

2.7 Potencial de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos tienen un amplio espectro de acción contra bacterias, hongos, virus y pueden actuar como agentes anticancerígenos, además la probabilidad de desarrollo de resistencia es menor en comparación con los antibióticos convencionales; de igual manera, su efecto quimiotáctico le permite una conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa (Lei et al., 2019; Rivas et al., 2006).

El potencial y aplicaciones de los AMPs son casi ilimitados, ya que en la naturaleza se han caracterizado miles de estas moléculas, además, por la vía sintética se pueden obtener millones de posibles péptidos con actividad farmacológica (Tonarelli y Simonetta, 2013). El diseño y selección se deberían basar en características como la permeabilización de la membrana, actividad biológica, farmacocinética, citotoxicidad, susceptibilidad a la resistencia adquirida para fortalecer la eficacia terapéutica del posible fármaco, en comparación con los ya existentes comercialmente (Starr y Wimley 2017). Son necesarios los conocimientos sobre las metodologías *in silico* y el diseño

racional de péptidos ya que permiten aumentar la variabilidad, especificidad y la actividad antimicrobiana, puesto que sus propiedades naturalmente son benignas, pero se sintetizan en bajos niveles dentro del organismo huésped. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de aumentar el rendimiento de estos elementos de defensa, con una nueva generación de agentes antiinfecciosos de gran potencial para su producción masiva, económica y eficiente (Da Cunha et al., 2017).

Los AMPs han despertado un especial interés como potenciales candidatos a fármacos debido a su amplio espectro de actividad y a su capacidad para superar la resistencia bacteriana. Esto se debe a que su acción se dirige a los componentes lipídicos de la membrana de los patógenos invasores, lo que limita el desarrollo de la resistencia, a diferencia de los medicamentos tradicionales (Semreen et al., 2018). En este contexto, existen diferentes tipos de mecanismos de resistencia a los antibióticos. En la tabla 1 se resumen algunos de los principales antibióticos y algunos patógenos conocidos que pueden inhibir su efecto antimicrobiano, Por ejemplo, los antibióticos betalactámicos que son uno de los grupos de medicamentos más prescritos debido a su estructura común, el anillo betalactámico. Estos antibióticos funcionan bloqueando la actividad de enzimas en la membrana celular bacteriana que son cruciales para la construcción de la pared celular. Al inhibir estas enzimas, que participan en la formación de la red de peptidoglicano, impiden el crecimiento y la reproducción de las bacterias. Los betalactámicos no solo afectan una enzima, sino un grupo de ellas, conocidas como proteínas transportadoras de penicilina (PBP), las cuales tienen diferentes funciones en el proceso de síntesis de la pared celular. Esto les permite ser eficaces contra una variedad de bacterias (Letourneau et al., 2019). Sin embargo, existen microorganismos con potencial para inhibir su función.

Tabla 1: Mecanismos de resistencia a los antibióticos en diferentes especies de bacterias

Mecanismos de resistencia presentes en los patógenos habituales		
Patógeno	Fenotipo de resistencia	Mecanismo principal de resistencia
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	β -lactámicos Macrólidos, lincosamidas, estreptogramina B	Alteración de enzimas diana (PBP) Alteración diana ribosómica (metilación del residuo adenina en el dominio V de ARNr 23S: (<i>ermB</i>); expulsión (<i>mefE</i>)
	Tetraciclinas Trimetoprima y sulfamidas	Protección de la diana ribosómica (<i>tetM</i>) Alteración de enzimas diana (dihidrofolato reductasa; trimetoprima; dihidropteroato sintasa: <i>sul1</i> , <i>sul2</i> en sulfamidas)
	Fluoroquinolonas	Alteración de enzimas diana (ADN girasa: mutaciones <i>gyrA</i> ; topoisomerasa IV: mutaciones <i>parC</i>)
<i>Staphylococcus aureus</i>	β -lactámicos Penicilina Meticilina, oxacilina, nafcilina y cefalosporinas (SARM)	Inhibición enzimática (producción de penicilinas) Alteración de la enzima diana: PBP2A (<i>mecA</i>)
	Glucopéptidos SAIG	Alteración de los precursores diana de la pared celular (la pared celular engrosada se une al antimicrobiano y le impide alcanzar su diana)
	SARG	Alteración de los precursores diana de la pared celular (transferencia de genes <i>vanA</i> mediada por plásmidos a partir de ERV, que da lugar a precursores peptidoglucanos D-ala-D-lac)
Enterococos	β -lactámicos (ampicilina)	Alteración de enzimas diana (PBP5 en <i>Enterococcus faecium</i>); inhibición enzimática: rara (penicilinas en <i>Enterococcus faecalis</i>)
	Aminoglucósidos	Mutaciones de la diana ribosómica, inhibición enzimática (resistencia de alto nivel: enzimas modificantes de aminoglucósidos)
	Vancomicina	Alteración de los precursores diana de la pared celular (resistencia de alto nivel: fenotipos VanA, VanB, VanD; resistencia de bajo nivel: fenotipos VanC, VanE, VanG)

	Linezolid Quinupristina-dalfopristina	Alteración diana ribosómica (mutación G2576U en el dominio V de ARNr 23S) Inhibición enzimática; expulsión; modificación de la diana (<i>E. faecium</i>)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Penicilinas Fluoroquinolonas Tetraciclinas Macrólidos MDR	NGPP: inhibición enzimática (penicilinasas adquiridas a través de plásmidos); NGCR: alteración de enzimas diana (PBP) Alteración de enzimas diana (ADN girasa, topoisomerasa IV); expulsión (sistema de expulsión MtrR-CDE) Protección de la diana ribosómica (gen <i>tetM</i>) Expulsión; alteración de la diana ribosómica (mutación C2611T en el dominio V de ARNr 23S) Expulsión (sistema MtrR-CDE: confiere resistencia a penicilina, tetraciclinas y macrólidos)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	β -lactámicos Aminoglucósidos Fluoroquinolonas MDR	Inhibición enzimática (AmpC, cefalosporinasas, β -lactamasas de espectro ampliado; metalo- β -lactamasas); expulsión activa (MexAB); disminución de la permeabilidad de la membrana externa (pérdida del canal OprD) Inhibición enzimática (enzimas modificantes de aminoglucósidos); expulsión (MexXY); alteración de la diana ribosómica (metilación ribosómica) Expulsión (MexAB, CD, EF, XY, GH, VW); alteración de enzima diana (mutaciones de ADN girasa: <i>gyrA</i>) Sobreexpresión del sistema de expulsión activo MexA-MexB-OprM (resistencia a quinolonas, tetraciclinas y trimetoprima)

<p><i>Acinetobacter baumannii</i></p>	<p>β -lactámicos</p> <p>Aminoglucósidos</p> <p>Quinolonas</p> <p>Tigeciclina</p>	<p>Inhibición enzimática (cefalosporinas AmpC, β -lactamasas adquiridas por plásmidos de las familias TEM, SHV, CTX-M, PER y VEB; MBL de las familias IMP, VIM, SIM; y carbapenemasas serina tipo OXA); alteración de enzima diana (PBP); reducción de la permeabilidad de la membrana externa; bombas de expulsión</p> <p>Inhibición enzimática (enzimas modificantes de aminoglucósidos); bombas de expulsión</p> <p>Bombas de expulsión</p> <p>Bombas de expulsión</p>
<p><i>Stenotrophomonas maltophilia</i></p>	<p>β -lactámicos</p> <p>TMP-SMX</p> <p>Fluoroquinolonas</p> <p>MDR</p>	<p>Membrana externa impermeable; inhibición enzimática (metalo- β-lactamasas inducibles, L1, L2)</p> <p>Alteración de las enzimas diana de sulfamidas (genes <i>sul1</i>, <i>sul2</i>: asociados con plásmidos o integrones de clase 1)</p> <p>Alteración de enzima diana (mutaciones ADN girasa); bombas de expulsión</p> <p>Bombas expulsión MDR (<i>smeDEF</i> confiere resistencia a tetraciclinas, eritromicina, cloranfenicol, norfl oxacino, ofl oxacino)</p>
<p><i>Klebsiella pneumoniae</i></p>	<p>β -lactámicos</p> <p>Fluoroquinolonas</p> <p>Aminoglucósidos</p>	<p>Inhibición enzimática (expresión constitutiva de penicilinasas; β -lactamasas de espectro ampliado; carbapenemasas KPC y NDM-1); disminución permeabilidad de la membrana externa</p> <p>Alteración de enzima diana (mutaciones de ADN girasa: <i>gyrA</i>); expulsión; protección del sitio diana (genes <i>qnr</i> mediados por plásmidos)</p> <p>Inhibición enzimática (enzimas modificantes de aminoglucósidos); alteración de la diana ribosómica (metilación ribosómica)</p>

Especies de <i>Bacteroides</i>	β -lactámicos	Inhibición enzimática (cefalosporinasas <i>cepA</i> codifi cadas cromosómicamente; metalo- β -lactamasas); expulsión (homólogos de las bombas RND); alteración de la diana de los antimicrobianos (PBP)
	Macrólidos, lincosamidas, estreptogramina B	Alteración de la diana ribosómica
	Tetraciclinas	Protección de la diana ribosómica (<i>tetQ</i>); expulsión
	Quinolonas	Alteración de enzima diana (mutaciones de la ADN girasa: <i>gyrA</i>); expulsión

AmpC, ampicilina C; *ARNr*, ARN ribosómico; *CTX-M*, cefotaxima M; *ERV*, enterococos resistentes a vancomicina; *IMP*, imipenem; *KPC*, carbapenemasa de *K. pneumoniae*; *MDR*, multirresistencia antimicrobiana; *MtrR*, resistencia transferible múltiple; *NDM*, metalo- β -lactamasa Nueva Delhi; *NGPP*, *N. gonorrhoeae* productor de penicilinas; *NGRC*, *N. gonorrhoeae* resistente cromosómicamente; *PBP*, proteína de unión a penicilina; *PER*, *Pseudomonas* de resistencia ampliada; *RND*, *resistance-nodulation-division*; *SAIG*, *S. aureus* de resistencia intermedia a glucopéptidos; *SARG*, *S. aureus* resistente a glucopéptidos; *SARM*, *S. aureus* resistente a metilicina; *SHV*, variante sulfhidrilo; *SIM*, imipenemasa Seúl; *TEM*, Temoneira; *TMP-SMX*, trimetoprima-sulfametoxazol; *VEB*, β -lactamasa de espectro ampliado Vietnam; *VIM*, metalo- β -lactamasa por integrón Verona (Opal y Pop 2015).

2.8 Diseño de péptidos antimicrobianos

La bioinformática surgió como respuesta al aumento de los datos generados por las técnicas de secuenciación de proteínas y genomas, conduciendo a una fase intensiva en la construcción de bases de datos y en el desarrollo de algoritmos informáticos eficientes y confiables (Ebrahimi et al., 2023). Las bases de datos contienen información sobre funciones, estructura, localización celular y cromosómica, efectos clínicos de mutaciones, similitudes de secuencias y estructuras tridimensionales de moléculas, etc. (Radusky, 2017). Actualmente, la bioinformática ha evolucionado con rapidez y gracias a la riqueza de su información es una ciencia útil en biología molecular y estructural, química computacional, genética, industria farmacéutica, desarrollo de software de sistemas para la industria agrícola, procesamiento de imágenes médicas, diseño de medicamentos, entre otras. (Patel et al., 2021).

El uso de técnicas bioinformáticas y de inteligencia artificial ha permitido analizar datos biológicos de distintas fuentes, deducir relaciones evolutivas, realizar homologías entre moléculas de diferentes linajes, deducir mecanismos de aparición de nuevas variantes genéticas, simular procesos, desarrollar nuevos modelos estructurales y conocer las consecuencias biológicas que

podrían tener a causa de las modificaciones (Orozco y Arango, 2016). En el caso particular de los péptidos, estas herramientas han facilitado predecir sus propiedades fisicoquímicas y su posible actividad antimicrobiana, conocer las interacciones con la membrana, identificar los blancos de unión, establecer mecanismos de acción, identificar actividades biológicas favorables, dinámicas en procesos fisiológicos y/o patológicos, seleccionar nuevos péptidos activos en función de las predicciones a partir de AMPs ya existentes y conocer su viabilidad como un nuevo agente terapéutico gracias a la aplicación de métodos de inteligencia artificial para la predicción de propiedades farmacológicas, facilitando el diseño de análogos de péptidos con propiedades fisicoquímicas y terapéutica deseadas, teniendo así muchas posibilidades de encontrar y producir péptidos con diversas aplicaciones (Cabello et al., 2016; Martínez, 2020).

2.9 Diseño Racional de péptidos antimicrobianos

Mediante el diseño racional *in silico*, es decir, elaborado por simulación computacional requiere de la unión de diferentes disciplinas como la bioinformática, biología molecular, física, matemáticas, estadística, inteligencia artificial, ingeniería de software, microbiología, química farmacéutica y estrategias de desarrollo preclínico (farmacocinética, formulación y estudios de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad), sin embargo, la información sobre esta última es limitada por lo tanto a pesar de que los AMPs son potenciales fármacos son perceptivos a cambios, por ejemplo, en el pH, esto puede generar cambios en su nivel de citotoxicidad, lo que influye directamente en la relación, estructura/función; por esta razón, uno de los desafíos en su diseño es mantener sus características deseables y estables frente a las condiciones ambientales y procesos fisiológicos para evitar el desarrollo de efectos indeseados que limiten su uso generalizado (Magana et al., 2020; Malik et al., 2016).

Hoy en día el diseño de AMPs se enfoca principalmente en sus usos biomédicos, biotecnológicos y terapéuticos (Guevara et al., 2020). El reto, entonces, consiste en diseñar nuevos péptidos antimicrobianos para obtener ventaja en la lucha contra la generación de resistencia. Para lograrlo, es crucial entender los mecanismos de acción de los PAMs, lo que permite abordar el diseño racional de péptidos antimicrobianos optimizados que puedan usarse eficazmente como fármacos terapéuticos. (Martínez, 2020). El número de modificaciones que se pueden realizar es enorme,

pero se debe tener en cuenta muchas variables y sus diferentes interacciones porque a menudo producen resultados inesperados, por lo tanto, para cumplir el propósito terapéutico y superar las dificultades clínicas es importante considerar las correlaciones entre las características fisicoquímicas y las propiedades farmacológicas de los AMPs como principios generales en el diseño para así poder generar un modelo de fabricación a gran escala, permanente y rentable (Weeks et al., 2021).

El diseño racional de péptidos antimicrobianos debe enfocarse en varios aspectos, como la longitud de la cadena, la estructura secundaria, la carga neta, la hidrofobicidad y la anfifilicidad (Huan et al., 2020). Sin embargo, los AMPs enfrentan problemas debido al aumento de los costos de producción y las limitaciones técnicas en su fabricación; su estabilidad se ve afectada por ciertos niveles de pH; su eficacia disminuye en presencia de hierro y algunos sueros; y son fácilmente degradados por proteasas. Por lo tanto, el AMP ideal debería tener las siguientes características: alta actividad antimicrobiana, baja toxicidad, alta estabilidad frente a proteasas y condiciones ambientales, baja capacidad de unión al suero, y ser de fácil acceso y producción económica. (Li et al., 2017).

Las bases de datos *in silico* (Tabla 2) son herramientas valiosas para predecir los sitios de interacción física con la célula microbiana, la optimización estructural y la variación en la carga mediante los cambios realizados en la organización de aminoácidos (Da Cunha et al., 2017), estas herramientas se han perfeccionado con el tiempo y permiten predecir las propiedades fisicoquímicas y la posible acción antimicrobiana de secuencias peptídicas (Martínez, 2020) y proporcionan una vía más eficiente para el diseño de fármacos (Timmons y Hewage, 2020). Nuevos AMPs con fuertes propiedades antimicrobianas y menor tendencia a generar resistencia a los medicamentos han sido ampliamente estudiados. Los métodos *in silico* para el diseño racional de péptidos buscan mejorar la eficacia biológica y aumentar la eficiencia de producción, agilizando la biosíntesis y disminuyendo los costos de fabricación. (Da Cunha et al., 2017). A continuación, se enumeran algunas bases de datos de AMPs disponibles y comúnmente utilizadas:

Tabla 2: Repositorios de datos y herramientas de bioinformática para el estudio de compuestos antimicrobianos.

	Fecha de creación	Resumen
TANGO	2004	TANGO software informático de agregación de proteínas <i>in vitro</i>
GROMACS	2005	Paquete versátil para dinámica molecular
AGGRESCAN	2007	AGGRESCAN software informático de agregación <i>in vivo</i> de proteínas
CHARMMing	2008	Programa de simulación molecular
HeliQuest	2008	Un servidor web para analizar secuencias con propiedades específicas de hélices alfa.
ExPASy	2012	Portal de recursos que proporciona acceso a bases de datos y software científicos.
ProtParam	2012	Permite el cálculo de variables físicas y químicas para una proteína determinada.
ProPAS	2012	Software independiente para analizar las propiedades de las proteínas.
YADAMP	2012	Base de datos de péptidos antimicrobianos basada en una extensa búsqueda bibliográfica
LAMP2	2013	Base de datos de péptidos antimicrobianos que proporciona un recurso y una herramienta útil para estudios.
CPPpred	2013	Un servidor web para la predicción de penetración celular
ToxinPred	2013	Un servidor web para diseñar y predecir péptidos tóxicos
Hemolytik	2014	Base de datos seleccionada manualmente de péptidos hemolíticos y no hemolíticos validados experimentalmente
3D-HM	2014	Herramienta para caracterizar la polaridad superficial de péptidos anfífilos.
APD3	2016	Base de datos de péptidos antimicrobianos.
CAMP	2016	Colección de péptidos antimicrobianos
DBAASP v.2	2016	Base de datos de actividad antimicrobiana y estructura de péptidos.
Helixator	2016	Una herramienta web que facilita la identificación de segmentos transmembrana de proteínas anfipáticas
SATPdb	2016	Base de datos de péptidos terapéuticos estructuralmente registrados.
pepATTRACT	2017	Herramienta de acoplamiento computacional para estudiar las interacciones péptido-proteína
BAGEL4	2018	Una herramienta de búsqueda genómica para la detección de posibles agrupaciones génicas de bacteriocinas.
DRAMP 2.0	2019	Base de datos que contiene péptidos antimicrobianos generales, de patentes y clínicos.

(Magana et al., 2020)

En el desarrollo de este trabajo se utilizó de algunas herramientas bioinformáticas pertenecientes al grupo de investigación de Biología Funcional de la Universidad Nacional de Colombia de acceso libre, entre las cuales se encuentra PepMultiFinder 2.0, AmpClass 1.0 (Branch et al., 2022) y TYPE-PEPTIDE (Tamayo et al., 2018), ya que son una fuente de desarrollo importante para la investigación moderna, especialmente en el campo de los antimicrobianos, debido a que tener herramientas bioinformáticas propias permite personalizar los análisis y adaptarlos a las necesidades específicas de la investigación. Los investigadores pueden ajustar algoritmos, bases de datos y modelos para abordar problemas únicos y aprovechar datos de manera eficiente, además, se puede mantener la confidencialidad y proteger la propiedad intelectual, lo cual es importante para patentes e investigaciones comerciales. Finalmente, tener herramientas propias facilita la integración con otros sistemas internos y plataformas de investigación, permitiendo un flujo de trabajo más fluido y colaborativo.

Por otro lado, el uso de nuevos recursos para obtener péptidos como el proteoma de bacterias, hongos y virus, es importante puesto que son una fuente natural de diversidad biológica y química, con péptidos y compuestos únicos que pueden tener propiedades antimicrobianas valiosas, si bien existen más estudios sobre bacterias es importante contrastar con otras alternativas ya que pueden ofrecer más opciones innovadoras a los tratamientos actuales, los péptidos que se encuentren en su proteoma pueden ser fuentes prometedoras de nuevos antimicrobianos.

Finalmente, para el desarrollo efectivo de este proyecto, se requirió el uso de diversas herramientas bioinformáticas disponibles en línea y de acceso libre. Estas herramientas se emplearon para el tamizaje de péptidos con características no aptas para su desarrollo, con el objetivo de seleccionar 10 péptidos originales extraídos de los proteomas mencionados. Estos péptidos fueron sometidos a varias modificaciones para mejorar y optimizar sus propiedades antimicrobianas. Por lo cual, se obtuvieron otros 10 péptidos con diferentes características, permitiendo identificar un total de 20 AMPs inéditos con cualidades prometedoras.

3. Metodología

3.1 Selección de proteomas de organismos

Se seleccionaron distintos proteomas de bacterias, hongos y virus de la base de datos de proteínas UniProtKB (The Universal Protein Knowledgebase 2023), en formato FASTA. Estas fuentes fueron elegidas debido a que una gran parte de los péptidos con gran efectividad como antimicrobianos se han encontrado en estudios con bacterias, pero se decidió incluir otros organismos para obtener una visión más completa. Al considerar proteomas de diferentes fuentes, el estudio busca ofrecer un análisis más diversificado y abordar una gama más amplia de organismos para futuras investigaciones.

La selección se realizó al azar, utilizando proteomas de referencia publicados en UniProtKB, para evitar sesgos hacia un único tipo de organismo o fuente de datos. Esto ayudó a garantizar que el proyecto no estuviera inclinado hacia una única tendencia o medio de información que pudiera tener más resultados relevantes.

Al utilizar proteomas de referencia, se obtiene acceso a un conjunto completo de proteínas que se pueden identificar en un organismo, tejido o célula específicos. Este conjunto se basa en datos genómicos y transcriptómicos, y generalmente se refiere a un catálogo o lista de proteínas que se consideran representativas o estándar para ese organismo ya que proporciona una colección bien organizada de secuencias proteicas, incluyendo anotaciones y otros datos relacionados. En bases de datos como UniProtKB, un proteoma de referencia se utiliza para investigaciones comparativas, estudios funcionales y otros análisis bioinformáticos que sirven como una guía o permite a los científicos identificar proteínas y estudiar sus funciones.

Para garantizar la validez del proyecto, se estableció como mínimo analizar 150.000 proteínas. Este umbral se fijó para permitir un análisis *in silico* más confiable y efectivo. Como resultado, se seleccionaron 65 proteomas (Tabla 3) (Anexo A), lo que dio lugar a un total de 195.258 proteínas para ser analizadas mediante herramientas bioinformáticas.

Tabla 3: Conjunto de proteomas seleccionados aleatoriamente desde UniProtKB.

Tipo de organismo	Número total de proteínas
32 proteomas de Virus	10.343
29 proteomas de bacterias	126.167
4 proteomas de Hongos	58.748

3.2 Selección de los posibles AMPs

Para este propósito se utilizó la herramienta bioinformática PepMultiFinder 2.0, desarrollada por el grupo de investigación Biología Funcional (Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín), donde se buscaron posibles AMPs codificados en las proteínas de los organismos seleccionados.

PepMultiFinder 2.0 es un algoritmo diseñado para encontrar secuencias de aminoácidos que tengan características fisicoquímicas específicas. El programa permite a los usuarios definir criterios de búsqueda para seleccionar los fragmentos peptídicos que cumplan con esas características. La innovación de PepMultiFinder 2.0 radica en su capacidad para buscar secuencias en proteomas completos, permitiendo a los usuarios realizar un amplio escrutinio e identificar muchos fragmentos a la vez.

Como resultado, el algoritmo de PepMultiFinder 2.0 genera un archivo en el cual se listan los péptidos encontrados, sus características fisicoquímicas, la proteína de procedencia y la posición que ocupan esos péptidos en la misma. Además, los organiza según la posición de la carga en la secuencia y la presencia o ausencia de aminoácidos aromáticos y alifáticos. En el archivo se puede discriminar los aminoácidos según su carga y el porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, además el programa también permite eliminar de la búsqueda secuencias que contengan aminoácidos que no sean deseables y se puede limitar o no a péptidos con potencial tendencia a formar hélices transmembranales.

De acuerdo a toda la información recopilada y de las diferentes bases de datos ya mencionadas se han logrado determinar características fisicoquímicas comunes en la mayoría de péptidos con actividad biológica, de acuerdo a ello la búsqueda se fundamentó en una serie de variables definidas de acuerdo con Duque-Salazar et al., (2020), no obstante, los criterios de selección pueden variar según las necesidades del usuario y el tipo de ensayo para el que se destinen. Por ejemplo, las variables utilizadas en esta plataforma, según se detalla en el estudio de Monsalve et al., (2024), pueden influir en la selección de péptidos, destacando ciertas características sobre otras. Algunos criterios pueden ser más importantes que otros, según los objetivos específicos del estudio.

- Longitud: 13 a 16 aminoácidos
- Punto isoelectrico: 10 a 12
- Carga: +2 a +6
- Índice de Boman: -1 a 1
- Porcentaje de hidrofobicidad: 40% a 60%
- Aminoácidos excluidos: cisteína (C), ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E)
- No se limitó la búsqueda a péptidos potencialmente transmembranales

Se decidió hacer una variación en 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 más pequeños tienen una menor probabilidad de ser degradados por proteasas.

También se optó por no incluir péptidos que contengan el aminoácido C. Esto es importante porque si hay más de dos residuos de cisteína en la secuencia del péptido, existe el riesgo de formar puentes disulfuro, lo que podría impedir la formación de estructuras como hélices alfa.

Además, se excluyeron péptidos con aminoácidos D y E porque estos reducen la carga positiva del péptido, lo que podría afectar negativamente su interacción con membranas objetivo. La carga positiva es un factor crítico para la función antimicrobiana, por lo que eliminar D y E puede mejorar la eficacia de los péptidos en estos ensayos.

El índice de Boman es un indicador que mide la energía libre promedio de las cadenas laterales de aminoácidos requerida para trasladar un péptido desde ciclohexano hacia el agua (Boman, 2003). Si el índice de Boman de un péptido está cerca de cero, es menos probable que interactúe con receptores y, por lo tanto, es más probable que interactúe con lípidos de membrana y tenga actividad antimicrobiana (Boman, 2003), para este estudio se utilizó un rango entre -1 y +1 para evaluar las posibles interacciones con las membranas bacterianas y las características antimicrobianas.

3.3 Clasificación de los péptidos antimicrobianos

Como resultado del análisis de los 65 proteomas y un total de 195.298 proteínas, se obtuvieron, 741.791 péptidos que cumplieron con los parámetros fisicoquímicos establecidos para su búsqueda en PepMultiFinder 2.0. A continuación, se realizó la clasificación como posibles AMPs con las herramientas de inteligencia artificial proporcionadas por las plataformas en línea CAMPR3 (Waghu e Idicula-Thomas, 2020), AmpClass 1.0 (Branch et al., 2022) y AMP Scanner Vr.2 (Veltri et al., 2018), en los que se estableció que la probabilidad de ser péptido antimicrobiano fuera del 98% o más, con excepción del algoritmo Artificial Neural Network que utiliza CAMPR3 quien clasifica de manera binaria, es decir, indica si es o no AMP. Por otra parte, AMP Scanner Vr.2 (Veltri et al., 2018) entrega los resultados con la probabilidad entre rangos de 0 a 1 para cada uno de los péptidos, para lo cual se escogieron todos los péptidos que tuvieran una probabilidad mayor o igual a 0.98.

CAMPR3 utiliza diferentes algoritmos para la predicción de AMPs entre las cuales están Support Vector Machine (SVM), random forest, Artificial Neural Network (ANN) y discriminant analysis, de la misma manera, AMP Scanner Vr.2 utiliza los algoritmos de regresión logística, red neuronal, árboles de decisión, bosque aleatorio y XGBoost, finalmente AMP Scanner Vr.2 utiliza el algoritmo de búsqueda basado en Deep Neural Network (DNN) para la identificación de péptidos. Estas bases de datos y diferentes métodos de cálculo o enfoques algorítmicos pueden resolver la misma incógnita, pero al utilizar varias de ellas puede ofrecer conclusiones complementarias, proporcionando una visión más completa y confiable, además, permite validar y verificar los resultados. Si todas las herramientas llegan a conclusiones similares, se refuerza la confianza en la

precisión del análisis, reduciendo el riesgo de resultados incorrectos o de fallos debidos a problemas específicos de una herramienta.

3.4 Evaluación de la capacidad hemolítica y de toxicidad

Todos los péptidos encontrados con probabilidad igual o superior al 98% se evaluaron en las plataformas HAPPENN (Timmons y Hewage 2020), AI4AMP (Lin et al., 2021) y HEMOPI-3 (Chaudhary et al., 2016), determinando su probabilidad de causar hemólisis; igualmente se determinó la predicción de toxicidad de cada péptido por medio de TOXINPRED (Gupta et al., 2013). Estas propiedades se evaluaron antes y después de que los péptidos fueran modificados.

En el caso de la plataforma HAPPENN (Timmons y Hewage, 2020) los resultados se establecieron con puntuaciones de 0 a 1, donde 0 indica que el péptido es muy probable que no sea hemolítico y el valor de 1 predice que si lo es; además, se decidió seleccionar los posibles AMPs con resultados con valores entre 0 y 0.30 debido a que valores superiores refleja que podrían ser mayormente hemolíticos. Por otro lado, la plataforma AI4AMP (Lin et al., 2021) en sus resultados arrojan valores entre 0 y 0.5 ya que entre estos rangos hay probabilidad de que no sean hemolíticos y a partir de 0.5 hay una alta probabilidad de serlo. HEMOPI-3 (Chaudhary et al., 2016) ajusta sus resultados puesto que la puntuación de 1 predice la probabilidad de ser hemolítico y 0 que sea muy poco probable de serlo. Finalmente, TOXINPRED (Gupta et al., 2013) establece que valores superiores a 0 la probabilidad de ser tóxicos es más alta y valores negativos se los relaciona como no citotóxicos.

Como se mencionó anteriormente el uso de múltiples herramientas permite comparar su rendimiento, precisión y eficiencia. Esto puede ayudar a seleccionar las mejores herramientas para futuros proyectos y a optimizar flujos de trabajo, puesto que, al utilizar herramientas en línea proporciona flexibilidad para abordar diversos problemas bioinformáticos.

3.5 Valoración de unión a membranas e índice de inestabilidad de los péptidos

A continuación, los péptidos seleccionados se clasificaron por medio de las plataformas en línea como AMPHIPASEEK (Sapay et al., 2006) que predice la capacidad de unión de un péptido a membranas y ProtParam (Gasteiger et al., 2005) que permite pronosticar el índice de inestabilidad de los péptidos.

El programa AMPHIPASEEK (Sapay et al., 2006) identifica la sección de cada péptido donde hay mayor probabilidad de unión a membranas, arrojando valores de puntuación de cada aminoácido dependiendo de la ubicación, estos valores se encuentran entre -1 y valores iguales o + 1, donde los resultados negativos muestran imposibilidad de unión a la membrana, mientras que resultados positivos demuestran una mayor capacidad de unión, se tomaron valores iguales o superiores a 0.5 ya que estos muestran una mayor probabilidad de anclaje, por consiguiente se determinó tomar los valores máximos y mínimos encontrados a lo largo de cada una de las secuencias, proporcionando una visión general de la capacidad de unión de cada péptido de la siguiente manera:

- Valor mínimo negativo y valor máximo negativo = Baja Capacidad de unión
- Valor mínimo negativo y valor máximo positivo = Mediana capacidad de unión
- Valor mínimo positivo y valor máximo positivo = Alta capacidad de unión

De acuerdo a lo anterior, se escogieron los péptidos con una alta capacidad de unión. A pesar de que todos los aminoácidos de la cadena no obtuvieron valores iguales o superiores a 0.5, se garantiza que son capaces de tener una alta probabilidad de interactuar con la membrana al tener toda la cadena con valores positivos.

Finalmente, ProtParam (Gasteiger et al., 2005) es una herramienta que permite realizar el cálculo de varios parámetros físicos y químicos, en ella se incluye la predicción del índice de inestabilidad de los péptidos, donde se establece que valores parametrizados con puntuación menor a 40 se considera como un péptido estable y un valor por encima de 40 predice que puede ser inestable.

Algunas de estas herramientas bioinformáticas están asociadas con bases de datos, recursos o bibliotecas particulares. Debido a la dificultad de encontrar programas que sigan los mismos procedimientos, se decidió usar las versiones disponibles actualmente para asegurar resultados precisos y satisfacer los requisitos del proyecto, incluso si se tienen diferencias en sus funcionalidades o acceso a datos. Este enfoque permite utilizar los recursos existentes y brinda flexibilidad para adaptarse a cambios futuros.

3.6 Predicción *in silico* de alérgenos

En la plataforma AllerTOP v.2 (Dimitrov et al., 2014) se utiliza un conjunto de modelos novedosos para la predicción de alérgenos utilizando diferentes métodos estadísticos y de aprendizaje de máquinas como la regresión logística, árboles de decisión, bosques aleatorios, entre otros. El modelo resultante tiene una precisión aproximada del 85,3 %. Estos algoritmos generan un resultado de manera binaria dándole una ponderación de los resultados definiendo si es un péptido alérgeno o no alérgeno.

3.7 Identificación de los péptidos en la literatura

Después de seleccionar los péptidos resultantes, se realizó una búsqueda en la plataforma que contiene datos de péptidos antimicrobianos (APD, por sus siglas en inglés). APD3 (Wang et al., 2016) es una base de datos de AMPs que contiene actualmente 3940 secuencias de AMPs provenientes de organismos de los seis reinos y péptidos sintéticos. Esta base de datos consta de una serie de funciones de búsqueda entre las cuales los péptidos seleccionados en este estudio se buscaron mediante la función de búsqueda mediante la secuencia. Esta plataforma calcula cual es el péptido de mayor similitud y la actividad correspondiente de cada uno de ellos, por lo cual debido a los objetivos del proyecto se estipuló que las similitudes con los otros péptidos se relacionen directamente con la actividad antimicrobiana de cualquier tipo.

3.8 Predicción de la actividad antimicrobiana con patógenos específicos

Finalmente, los péptidos resultantes se analizaron en la base de datos de la actividad antimicrobiana y estructura de péptidos DBAASP v3, por sus siglas en inglés (Pirtskhalava et al., 2021). Aquí se puede predecir el potencial antimicrobiano de los AMPs contra especies particulares, el alcance de esta plataforma nos permitió evaluar solamente las siguientes cepas bacterianas disponibles en la versión actual: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En esta prueba de susceptibilidad el péptido activo muestra una concentración mínima inhibitoria MIC < 25 µg/ml, y el péptido no activo valor de MIC > 100 µg/ml.

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

3.9 Modificación de los péptidos antimicrobianos

Una vez seleccionados los péptidos, se procedió a modificar cada uno de ellos con el objetivo de mejorar sus propiedades fisicoquímicas, esta tarea se realizó con ayuda de la herramienta bioinformática de la Universidad Nacional de Colombia TYPE-PEPTIDE (Tamayo et al., 2018) y la plataforma en línea HeliQuest (Gautier et al., 2008), donde se predice las estructuras de cada péptido identificado y sus principales propiedades fisicoquímicas.

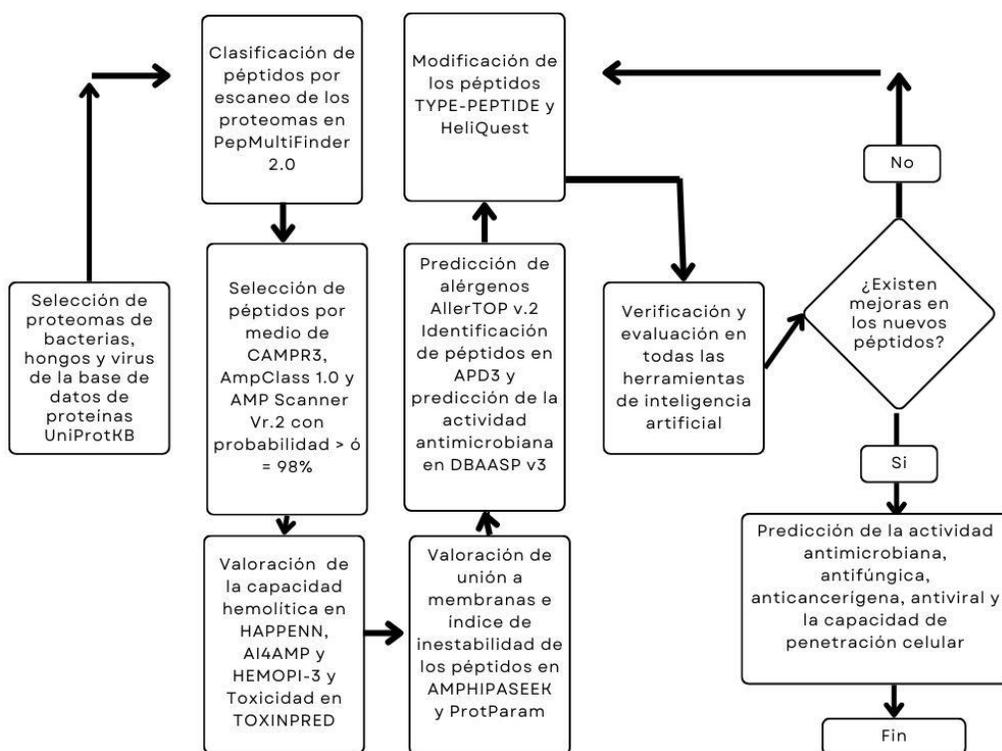
Para cada modificación se tuvo en cuenta que los parámetros iniciales no se vieran afectados en su totalidad, los cambios se realizaron de acuerdo a la organización de la estructura y que su principal efecto fuera antimicrobiano, Existen varios métodos para diseñar péptidos antimicrobianos, que pueden ser de tipo químico, sistemático o de novo (Huan et al., 2020). El método elegido para este proyecto es la mutación dirigida al sitio, que implica rediseñar péptidos antimicrobianos naturales mediante la adición, eliminación o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos (Torres et al., 2019). Para que la integridad de cada péptido no se viera afectada, las modificaciones no

abarcaron más del 50% y sus efectos no hemolítico, no citotóxico, no alergénico se conservaron y en lo posible mejorar la unión a membranas y el índice de estabilidad de los péptidos.

3.10 Estructura de los péptidos originales y modificados

Finalmente se utilizó AlphaFold2 (Mirdita et al., 2022) con el propósito de predecir y visualizar la estructura 3D de todos los péptidos evaluados y sus homólogos ya modificados. Las predicciones se pueden ejecutar por lotes o de forma independiente, y se compilan y visualizan cinco modelos, por lo que se pudo identificar estructuras suficientemente precisas para su representación.

Figura 4: Diagrama de flujo de la metodología de selección y mejoramiento de los péptidos antimicrobianos con herramientas bioinformáticas y de inteligencia artificial.



4. Resultados y discusión

4.1 Organismos evaluados

Con la selección de 65 organismos de la base de datos UniProtKB (The Universal Protein Knowledgebase 2023) que incluyeron virus, bacterias y hongos, se recopilaron los siguientes resultados: de un total de 195.258 proteínas, se obtuvieron 126.167 proteínas de bacterias, 58.748 de hongos y 10.343 de virus (Anexo A).

Para identificar posibles péptidos, se utilizó la plataforma PepMultiFinder 2.0, aplicando los parámetros establecidos previamente. Este análisis arrojó un total de 741.791 posibles péptidos, distribuidos de la siguiente manera: 468.620 péptidos de bacterias, 249.065 de hongos y 24.106 de virus.

4.2 Clasificación de péptidos mediante métodos *in silico*

El total de péptidos obtenidos se valoraron en los clasificadores de CAMPR3 (Waghu e Idicula-Thomas, 2020), AmpClass 1.0 (Branch et al., 2022) y AMP Scanner Vr.2 (Veltri et al., 2018), se estableció como parámetro que en todos los algoritmos de cada clasificador el péptido tuviera una probabilidad mayor o igual a 0.98 en la mayoría de sus predictores. En total se obtuvieron 318 péptidos (Anexo B) que cumplían con los parámetros establecidos.

A continuación, se evaluaron los 318 péptidos en la plataforma HAPPENN (Timmons y Hewage, 2020), y se descartaron 65 péptidos hemolíticos, de acuerdo a esto se preseleccionaron 253 péptidos no hemolíticos, de igual forma, se aplicó un nuevo filtro con la herramienta AI4AMP (Lin et al., 2021), en este último se encontraron 20 péptidos con puntajes mayores a 0.5, valor de referencia para ser considerados como hemolíticos y finalmente se utilizó la herramienta HEMOPI-3 (Chaudhary et al., 2016), plataforma desarrollada con bases de datos de péptidos hemolíticos y no hemolíticos experimentalmente validados, aquí son clasificados con un valor de referencia de 1 para péptidos hemolíticos y 0 no hemolíticos, de acuerdo a esto, se encontró que

los péptidos resultantes consiguieron valores menores a 1, de esta manera se realizó la validación de la información de las predicciones con AI4AMP (Lin et al., 2021) y HAPPENN (Timmons y Hewage, 2020). Por lo tanto, se obtuvo un total de 233 péptidos.

A continuación, se realizó un análisis de toxicidad con la plataforma TOXINPRED, para su interpretación se tuvo en cuenta que valores superiores a 0 son considerados como tóxicos y valores negativos son considerados como no tóxicos, y se determinó que ninguno de los 233 péptidos tuvo una probabilidad significativa de ser tóxico.

Posteriormente los péptidos seleccionados se evaluaron con la herramienta bioinformática ProtParam (Gasteiger et al., 2005), donde se realizó la predicción de estabilidad de los péptidos, determinando que 14 son considerados con una alta probabilidad de ser inestables. Adicionalmente, se realizó la valoración de la probabilidad de unión a membranas para los 219 péptidos restantes con la plataforma en línea AMPHIPASEEK (Sapay et al., 2006), como resultado se encontró que 129 péptidos tienen mediana capacidad y 5 con baja capacidad de unión, por lo que se descartaron, de acuerdo a esto se seleccionaron solamente 85 péptidos calificados con alta probabilidad de unión a membranas.

Con los resultados encontrados anteriormente, los 85 péptidos preseleccionados se analizaron en la plataforma AllerTOP v.2 (Dimitrov et al., 2014) para determinar si son considerados como péptidos alergénicos. Mediante esta plataforma se encontró que 28 péptidos tienen alta probabilidad de producir alergias, por lo tanto, se seleccionaron 57 péptidos con alta probabilidad de ser antimicrobianos y con baja probabilidad de ser alergénicos.

A continuación, estos péptidos preseleccionados se sometieron a un análisis en la plataforma APD3 (Wang et al., 2016). El proceso consistió en mantener únicamente los péptidos con baja similitud con respecto a las secuencias reportadas en esta herramienta y aquellos que tuvieran relación con una actividad antimicrobiana. Como resultado, se eliminaron 20 péptidos que no cumplían con estos criterios. Al final del proceso, se conservaron 37 péptidos con una similitud inferior al 70%, lo que sugiere que son novedosos y refuerza la confianza en su originalidad.

Finalmente, los 37 péptidos preseleccionados se evaluaron en la plataforma DBAASP v3 (Pirtskhalava et al., 2021) Aquí se evaluó la probabilidad de que los péptidos tuvieran actividad

contra especies microbianas como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Por lo cual se descartaron 27 de ellos que tuvieron una menor actividad antimicrobiana con estas especies, de acuerdo a esto se conservaron solamente 10 con los mayores estándares considerados como AMPs; no obstante hay que aclarar que los péptidos descartados en esta fase contienen un alto valor significativo científicamente que podrían tener actividad contra otros patógenos como los causantes de infecciones hospitalarias *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *C. difficile*, *Burkholderia cepacia*, así como patógenos como *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* spp. Estos microorganismos son causantes de varias enfermedades tanto en humanos como en animales (Hawkey, 2015).

4.3 Identificación de péptidos como candidatos a ser antimicrobianos

Una vez completado el análisis y aplicados los filtros utilizando las diversas herramientas bioinformáticas descritas en la metodología, los péptidos seleccionados que cumplieron con los criterios específicos establecidos (se detallan en las tablas 4 y 5), se nombraron con las primeras letras del nombre científico del organismo de donde fue obtenido y se le asignó un número de referencia para una mejor organización.

Se utilizó la información obtenida con PepMultiFinder 2.0 de la proteína de origen y la ubicación de todos los péptidos (Anexo B), puesto que al conocer su origen dentro de la proteína ofrece información valiosa sobre su función, estructura e interacciones, además de poder ubicar su secuencia dentro del ADN codificante.

Tabla 4: Péptidos destacados identificados en el análisis bioinformático de proteomas con PepMultiFinder 2.0 y su información de origen.

Péptido seleccionado	Organismo de origen	Nombre del organismo	Número de proteínas	Código del proteoma en UniProt	Nº de péptidos encontrados
GGIFKKTFFALLKKI	Virus	<i>Brevibacillus</i> fago Emery	102	UP000015097	217
LVLKCLKKLIKQLPN A	Virus	<i>Orpheovirus</i> IHUMI- LCC2	1.199	UP000236316	2.354
GLKRALTLFKWI	Bacteria	<i>Alteromonad</i> <i>aceae</i> bacterium	9.474	UP000318527	22.402
LRLFKGSIKAFIK	Bacteria	<i>Alkaliphilus</i> <i>metalliredige</i> <i>ns</i> (strain QYMF)	4.467	UP000001572	15.904
FSKAFGWVKKIF	Bacteria	<i>Bacillus</i> <i>safensis</i>	3.746	UP000325032	18.284
IGKRIKKYIVWL	Bacteria	<i>Bacillus</i> <i>safensis</i>	3.746	UP000325032	18.284
LKCLSAAFKKLVA	Hongo	<i>Fomitopsis</i> <i>pinicola</i> (strain FP- 58527)	13.806	UP000015241	52.044
IGGRSVKWLKLI A	Hongo	<i>Cochliobolus</i> <i>sativus</i>	12.174	UP000016934	53.267

VPKVLGLLKKVFAK R	Hongo	<i>Moniliophtho ra roreri</i> (strain MCA 2997)	17.976	UP000017559	72.088
LKKFGKALFKPLI	Hongo	<i>Moniliophtho ra roreri</i> (strain MCA 2997)	17.976	UP000017559	72.088

Tabla 5: Péptidos encontrados con alto potencial antimicrobiano y su posición en la proteína de origen.

Nombre	Secuencia del péptido	Organismo de origen	Proteína de origen	Ubicación en la proteína
BfP1	GGIFKKTFFALLKKI	<i>Brevibacillus fago</i> Emery	tr S5MBW5 S5MBW5_9CAUD Probable tape measure protein OS=Brevibacillus phage Emery OX=1296660 GN=EMERY_16 PE=3 SV=1	665-678
OvP2	LVLKLLKLLIKQLPNA	<i>Orpheovirus IHUMI-LCC2</i>	tr A0A2I2L3E5 A0A2I2L3E5_9PHYC NLI interacting factor-like phosphatase OS=Orpheovirus IHUMI-LCC2 OX=2023057 GN=ORPV_133 PE=4 SV=1	94-109
AbP3	GLKRALTLFKWI	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	tr A0A559QL59 A0A559QL59_9ALTE Chemotaxis protein MotA OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_2991 PE=3 SV=1	55-66
AmP4	LRLFKGSIKAFIK	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TKW0 A6TKW0_ALKMQ Radical SAM domain protein OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_0601 PE=4 SV=1	434-446
BsP5	FSKAFGWVKKIF	<i>Bacillus safensis</i>	tr A0A5C0WJ85 A0A5C0WJ85_BACIA SLT domain-containing protein OS=Bacillus safensis OX=561879 GN=yqbO PE=4 SV=1	812-823
BsP6	IGKRIKKYIVWLIV	<i>Bacillus safensis</i>	tr A0A1L6ZF08 A0A1L6ZF08_BACIA Sulfur relay protein TusF OS=Bacillus safensis OX=561879 GN=tuaF PE=4 SV=1	8-20
FpP7	LKKLSAAFKKLVA	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8EFM0 S8EFM0_FOMPI Phosphoacetylglucosamine mutase OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1141107 PE=3 SV=1	192-204
CsP8	IGGRSVKWLKLLIVTA	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2R619 M2R619_COCSN Nitrate reductase OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_28067 PE=3 SV=1	276-291

MrP9	VPKVLGLLKKVFAKR	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	>tr V2WPM3 V2WPM3_MONRO Ras gtpase-activating protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_17122 PE=4 SV=1	756-770
MrP10	LKKFGKALFKPLI	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XHF1 V2XHF1_MONRO Aminopeptidase OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_4705 PE=3 SV=1	653-665

Para la selección de los 10 péptidos que se valoraron en los clasificadores de CAMPR3, AmpClass 1.0 y AMP Scanner Vr.2. se encontró que BsP5 y MrP9 cumplieron con los estándares al 100% en todos los algoritmos. Además, se determinó que 8 péptidos más mostraron resultados prometedores para ser considerados como péptidos antimicrobianos, lo que los convierte en candidatos valiosos para este estudio. Estos péptidos obtuvieron puntuaciones iguales o superiores al 98% en la mayoría de los predictores de CAMPR3 y AmpClass 1.0, con algunos resultados entre el 95% y el 97%, y entre el 98% y el 100% en AMP Scanner Vr.2. Aunque para este estudio no se tomaron en cuenta probabilidades menores a 98% en la mayoría de sus predictores, no significa que estos péptidos no tengan posibilidad de ser considerados como antimicrobianos, por el contrario, esto sugiere que la viabilidad de encontrar nuevos AMPs con un potencial clínico es prometedor (Tabla 6).

Tabla 6: 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 de los estándares evaluados que representan de manera integral alto valor predictivo que en conjunto con los otros predictores estimados cumplen con las propiedades requeridas para considerarse como péptidos antimicrobianos.

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

Salem et al., (2022) afirman que la hemólisis pone fin a la vida útil de los glóbulos rojos de forma prematura, debido a su rompimiento, de acuerdo a este efecto secundario no deseado y su alta gravedad, un péptido hemolítico no puede ser un candidato como fármaco aplicable. Timmons y Hewage (2020), aseguran que los péptidos hemolíticos tienen mayor proporción de residuos hidrofóbicos como leucina e isoleucina y en menor medida, fenilalanina, triptófano y glicina. Mientras tanto, los péptidos no hemolíticos tienen principalmente residuos de lisina y arginina cargados positivamente; con respecto a lo anterior, Greco et al., (2020) evaluaron la actividad hemolítica *in vivo* de varios péptidos con eritrocitos humanos, caninos, bovinos y murinos, descubrieron que los péptidos muestran diversas actividades hacia los eritrocitos, encontrando 4 péptidos altamente hemolíticos contra eritrocitos humanos, de rata y de perro, aquí encontraron que están compuestos por Lys-Lys-Lys-Leu-(1-Nal)Ala-Phe(1-Nal)Ala, el segundo por Lys-Lys-Lys-(N-Bu)Gly-(N1-Nal)Gly-(N-Phe)Gly-(N1-Nal)Gly, el tercero Lys-Lys-Lys-Nle-(2-Nal)Ala-Phe-(2-Nal)Ala y el cuarto Lys-Lys-Lys-Leu(1-Nal)Ala-Tyr-(1-Nal)Ala, finalmente afirman que los eritrocitos caninos muestran una mayor sensibilidad, mientras que las células humanas y de rata son intermedias, y los eritrocitos bovinos están generalmente menos sujetos a la lisis.

Continuando con el razonamiento anterior en esta investigación, de los 10 péptidos elegidos, 2 son codificados en los proteomas de virus, 4 de bacterias y 4 en hongos y tienen bajo potencial hemolítico; en la tabla 7 se reportan los valores predichos para cada uno de ellos los cuales están conformados en su mayoría por aminoácidos como K, L, y G, en algunos con motivos en común como LLKK y LKKL agrupados con otros aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos que les brindan una hidrofobicidad entre el 40 al 60 %, donde se le atribuye sus características fisicoquímicas y su estructura helicoidal. Algunos segmentos (motivos) de péptidos tienen funciones específicas, como la actividad antimicrobiana. Estos fragmentos constan de unidades repetidas que se combinan para crear nuevos péptidos antimicrobianos, o en secuencias específicas que se ubican en el extremo de la cadena peptídica, brindando así protección. Estos motivos también pueden aparecer en diferentes partes de la cadena peptídica (Huan et al., 2020).

De acuerdo a lo anterior estos motivos específicos encontrados probablemente contribuyen a mantener un nivel adecuado de hidrofobicidad y un bajo potencial hemolítico, lo que resulta en una actividad antimicrobiana eficaz sin dañar las células del huésped. En relación a esto Phuong et al., (2020) en su investigación concluyeron que minimizar la hidrofobicidad y el contenido hidrofóbico son factores clave para controlar la hemólisis, pero para optimizar la actividad antimicrobiana requiere una hidrofobicidad que no sea ni demasiada alta ni baja, con un equilibrio catiónico/hidrofobo apropiado y compatibilidad estructural entre los monómeros elegidos, a diferencia de ello Wang (2017) asegura que los AMPs entre sus secuencias y estructuras no tienen características comunes, excepto la carga catiónica y el carácter anfipático, con un contenido global de aproximadamente el 50% de residuos hidrofóbicos

Posteriormente en el análisis de toxicidad realizado en la plataforma TOXINPRED (Gupta et al., 2013), el método de predicción se ha desarrollado mediante la técnica de aprendizaje automático Support Vector Machine (SVM) para la discriminación de péptidos tóxicos de los no tóxicos a través de un modelo basado en la composición de aminoácidos que predice la toxicidad. El conjunto de datos positivos está conformado por toxinas pequeñas de diferentes bases de datos como ATDB, Arachno-Server, ConoServer, DBETH, BTXpred, NTXpred y SwissProt. El conjunto de datos negativos consta de secuencias peptídicas no tóxicas obtenidas de UniProt, SwissProt y TrEMBL. La longitud de las secuencias incluidas en los conjuntos de datos es ≤ 35 aminoácidos (Gupta et al., 2013). El umbral que se utilizó para desarrollar este estudio con el

modelo de aprendizaje SVM fue de 1.0, el máximo valor que emplea esta plataforma. En la tabla 7 se relacionan los valores obtenidos por TOXINPRED de los 10 péptidos seleccionados. Resultados similares encontraron Khabbaz et al., (2021) quienes con un conjunto de datos desarrollaron un modelo de aprendizaje que extrae AMPs con baja toxicidad para aplicaciones clínicas; además, estos autores aseguran que varias propiedades de los AMPs, incluidas las posiciones de formación de hebras y residuos hidrofóbicos son un determinante decisivo de las propiedades de los péptidos, puesto que la toxicidad para las células es un obstáculo crítico para su posible uso clínico. De modo similar, Madrazo y Campos (2022) utilizaron herramientas bioinformáticas para la predicción *in silico* de péptidos de longitud corta derivados de una fracción proteica de semillas de chía con alto potencial antimicrobiano, encontraron 4 péptidos *de novo* considerados como no tóxicos utilizando la plataforma TOXINPRED y obteniendo resultados similares a los reportados en este estudio, con una derivación del umbral de 0.7 con el predictor SVM.

Tabla 7: Clasificación de la capacidad hemolítica y toxicidad de los péptidos seleccionados con en el análisis bioinformático de proteomas y herramientas de inteligencia artificial.

Péptido	Secuencia	HAPPENN	AI4AMP	HEMOPI-3	TOXIN PRED
BfP1	GGIFKKTFFALLKKI	0,04	0,01	0,57	-1,46
OvP2	LVLKKLKLIKQLPNA	0,29	0,02	0,39	-1,15
AbP3	GLKRALTLFKWI	0,12	0,01	0,85	-0,30
AmP4	LRLFKGSIKAFIK	0,10	0,13	0,75	-1,04
BsP5	FSKAFGWVKKIF	0,05	0,48	0,58	-1,43
BsP6	IGKRIKKYIVWLIV	0,20	0,03	0,65	-0,96
FpP7	LKKLSAAFKKLVA	0,003	0,02	0,67	-1,51
CsP8	IGGRSVKWLKKLIVTA	0,21	0,03	0,81	-0,63
MrP9	VPKVLGLLKKVFAKR	0,01	0,04	0,43	-1,15
MrP10	LKKFGKALFKPLI	0,02	0,04	0,54	-0,89

4.5 Valoración de unión a membranas e índice de inestabilidad de los péptidos

La herramienta bioinformática ProtParam (Gasteiger et al., 2005), predice como estable un péptido cuyo índice de inestabilidad tiene valores inferiores a 40. Los autores de este método realizaron el análisis estadístico de diferentes proteínas, descubriendo que los principales determinantes de la estabilidad residen probablemente en su estructura primaria, al parecer hay una correlación entre la sensibilidad de una proteína a la degradación *in vivo* y la presencia de ciertos dipéptidos en ella. La influencia integral de dichos dipéptidos parece contribuir a las características de inestabilidad o estabilidad; además, las características dependientes de la estructura, la presencia de puentes disulfuro, la unión a ligandos, los mecanismos de reconocimiento de proteasas, entre otros, determinan la estabilidad de una proteína o péptido *in vivo*. De manera similar, Wang (2017) afirma que esta propiedad se puede mejorar mediante la incorporación de D-aminoácidos, ya que los péptidos lineales no son suficientemente estables frente a las proteasas. Esto puede deberse a un cambio en la configuración de la cadena polipeptídica, lo que puede reducir la afinidad con el sitio activo de las proteasas. A pesar de que es una sugerencia válida en este estudio no se tuvo en cuenta.

Con referencia a lo anterior, Wang et al., (2014), identificaron un péptido con estabilidad frente a la quimotripsina, mediante ensayos antimicrobianos y de estabilidad. Se descubrió que el péptido GF-17d3, un fragmento modificado derivado del péptido LL-37, la única catelicidina humana, al que se le incorporaron D-aminoácidos, este es capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli* incluso en presencia de quimotripsina, el péptido resultante, conocido como 17BIPHE2, demuestra que la incorporación de D-aminoácidos puede ser una estrategia eficaz para mejorar la estabilidad y la eficacia de los péptidos antimicrobianos.

En el desarrollo de la prueba de inestabilidad se encontró que los péptidos BsP6 y MrP9 obtuvieron los mayores valores reportados, estos fueron de 24,21 y 26,93, respectivamente (Tabla 8), para los demás péptidos los resultados encontrados fueron menores destacando a BfP1, AmP4, FpP7 y MrP10 quienes arrojaron valores negativos con una fuerte propensión a ser mayormente

estables, a pesar de ello es conveniente aclarar que hay que tener presente estos resultados puesto que, al realizar las respectivas modificaciones se puede alterar la estabilidad de los péptidos.

En cuanto a la valoración de la probabilidad de unión a membranas en la plataforma en línea AMPHIPASEEK (Sapay et al., 2006) se puede observar que cada aminoácido tiene una puntuación de manera individual, donde los valores varían entre -1 y mayor o igual a 1. Resultados negativos indican que existe una imposibilidad de unión, mientras que resultados positivos tiene una mayor probabilidad de unión a la membrana, en recomendación a los resultados previstos, si los valores son iguales o superiores a 0.5 se considera que tiene una mejor y más alta probabilidad de adhesión al objetivo. Por tal motivo, se tomaron los valores máximos y mínimos reportados a lo largo de cada una de las secuencias, obteniendo una visión general de cada péptido. Solamente se escogieron los péptidos con valores positivos a lo largo de la cadena. En relación a lo mencionado los resultados de los péptidos seleccionados y sus puntuaciones se presentan en la tabla 8. Se destaca que los péptidos BfP1, OvP2, AmP4, BsP5, FpP7 y MrP10 obtuvieron puntuaciones superiores a 0.5, indicando una alta capacidad de unión a la membrana. Cabe aclarar que todos los 10 péptidos seleccionados muestran valores positivos a lo largo de la cadena peptídica, lo que sugiere una mayor probabilidad de adhesión al objetivo. Esto resalta la fuerte interacción potencial de estos péptidos con la membrana.

En referencia a lo anterior, los AMPs se dirigen y se acoplan a las membranas bacterianas por medio de interacciones péptido-lípido, los sistemas modelo de membrana se han utilizado para detectar interacciones péptido-membrana e investigar el efecto de los péptidos en la estructura de las bicapas lipídicas (Benfield y Henriques, 2020). Referente a ello los AMPs habitualmente se unen a las membranas microbianas a través de la interacción electrostática y provocan alteraciones estructurales (Ciumac et al., 2019). Además, la posición precisa de aminoácidos específicos de la cadena peptídica es decisiva para esta actividad, lo que probablemente sucede porque los aminoácidos poseen una gran variedad de propiedades fisicoquímicas y cada uno está constituido por un único grupo funcional de la cadena lateral ya que esta distribución aseguraría la integridad estructural y la estabilidad de los AMPs de forma conservada para garantizar esta interacción (Ortiz, 2019).

Tabla 8: Clasificación de la capacidad de unión de membranas e índice de inestabilidad de los péptidos seleccionados de entre los encontrados en el análisis bioinformático de proteomas.

Péptido	Secuencia	AMPHIPASEEK		ProtParam
		Valor máximo	Valor mínimo	Índice de inestabilidad
BfP1	GGIFKKTFFALLKKI	0,526	0,157	-2,01
OvP2	LVLKCLKKLIKQLPNA	0,778	0,035	9,68
AbP3	GLKRALTLFKWI	0,296	0,084	16,73
AmP4	LRLFKGSIKAFIK	0,613	0,199	-7,11
BsP5	FSKAFGWVKKIF	0,928	0,399	2,90
BsP6	IGKRIKKYIVWLIV	0,362	0,258	24,21
FpP7	LKKLSAAFKKLVA	0,534	0,126	-21,92
CsP8	IGGRSVKWLKKLIVTA	0,175	0,084	29,24
MrP9	VPKVLGLLKKVFAKR	0,425	0,038	26,93
MrP10	LKKFGKALFKPLI	0,567	0,055	-21,19

Si el resultado de la prueba en ProtParam tienen una puntuación menor a 40 se considera como un péptido estable y un valor por encima de 40 predice que puede ser inestable.

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

AllerTOP v.2 (Dimitrov et al., 2014) utiliza varios modelos de predicción utilizando prototipos estadísticos y predictores de aprendizaje automático, no utiliza valores de referencia y arroja resultados de forma binaria, es decir clasifica los péptidos como alergénicos o no alergénicos. En esta prueba los 10 péptidos son clasificados como no alergénicos. Esta propiedad se tuvo en cuenta en las modificaciones de los péptidos ya que puede encontrar resultados contradictorios a los originales y no cumplirían con los buenos estándares de bioseguridad. De igual manera Guryanova y Ovchinnikova (2022) afirman que, al analizar los efectos de los AMPs en humanos, se debe tener en cuenta que algunos de ellos poseen propiedades alergénicas, esto no debe pasarse por alto ya

que se debe tener en cuenta el enfoque de su uso médico. Un ejemplo de ello son los resultados encontrados por Arora et al., (2020), quienes realizaron ensayos con 19 clases de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Estas proteínas son defensinas expresadas ante el estrés biótico y abiótico de las plantas, que tienen una capacidad alergénica potencial en humanos. Para el desarrollo de su investigación, estos autores obtuvieron secuencias de este tipo de la plataforma UniProt, además, utilizaron 4 diferentes herramientas bioinformáticas que ayudaron a predecir si las proteínas PR pertenecientes a 11 familias diferentes de plantas tienen potencial alergénico, entre cuales aplicaron la herramienta AllerTOP, donde se predijo que solo dos de las proteínas propuestas son probablemente considerados como alergénicos, esta capacidad de filtrar péptidos potencialmente alergénicos es especialmente valiosa ya que desempeña un papel crucial en el campo del diseño de péptidos y desarrollo de fármacos.

4.7 Evaluación de similitud en APD3

En el desarrollo de esta prueba se pudo determinar el porcentaje de similitud con diferentes AMPs reportados en la base de datos APD3(Wang et al., 2016). En este estudio se estimó que los péptidos no tengan una similitud mayor del 70%, lo que significa que los péptidos encontrados con un porcentaje menor son diferentes a los previamente reportados en la literatura. Este criterio se estableció con el fin de que al realizar las modificaciones pertinentes se mejoren las propiedades fisicoquímicas con un menor grado de similitud a algún péptido reportado o ya estudiado. El valor de similitud más alto fue del péptido MrP9, con un 52.94%, el cual se tuvo en cuenta al realizar las respectivas modificaciones ya que probablemente aumente el valor de predicción (Tabla 9); también se pudo conocer la actividad biológica de los péptidos similares donde se encontró que además de tener relación antimicrobiana con diferentes microorganismos los péptidos con similitud a BfP1, AbP3, FpP7 y MrP9 pueden ser considerados como anticancerígenos, el más parecido a AmP4 como antifúngico y con actividad anti *Candida* y finalmente, el péptido más parecido a BsP5 tiene capacidad antiviral, antifúngica, anti *Candida* y antiparasitaria.

Tabla 9: Porcentaje de similitud de los péptidos de este estudio con péptidos bioactivos contenidos en la plataforma en APD3

Péptido	Secuencia	% de similitud (APD3)	Similitud con el péptido	APD3 ID	Actividad
BfP1	GGIFKKT FALLKKI	43.75%	INLKALAALAKKIL	<u>AP00201</u>	Anti-Gram+ y Gram-, anticancerígeno
OvP2	LVLKCLKKLIKQLPN A	50%	GFVALLKKLPLILKHLPL	<u>AP02881</u>	Anti-Gram+ y Gram-
AbP3	GLKRALTLFKWI	46.67%	INLKALAALAKKIL	<u>AP00201</u>	Anti-Gram+ y Gram-, anticancerígeno
AmP4	LRLFKGSIKAFIK	47.06%	LRLKSIVSYAKKVL	<u>AP02542</u>	Anti-Gram+ y Gram-, antifúngico, contra <i>Candida</i>
BsP5	FSKAFGWVKKIF	38.46%	FLSGIVGMLGKLF	<u>AP00898</u>	Anti-Gram+ y Gram-, antiviral, antifúngico, contra <i>Candida</i> , antiparasitario, hemolítico
BsP6	IGKRIKKYIVWLV	42.86%	ILGKIWEGIKSLF	<u>AP00430</u>	Anti-Gram+ y Gram-, hemolítico
FpP7	LKKLSAAFKKLVA	50%	LKLKSIVSWAKKVL	<u>AP00200</u>	Anti-Gram+ y Gram-, hemolítico, anticancerígeno
CsP8	IGGRSVKWLKKLIVT A	43.48%	GLVGKLVKGGKLIH VANG	<u>AP03558</u>	Anti-Gram+ y Gram-

MrP9	VPKVLGLLKKVFAKR	52.94%	VNWKKVLGKIIKVAK	<u>AP01465</u>	Anti-Gram+ y Gram-. anticancerígeno
MrP10	LKKFGKALFKPLI	46.15%	KKLLKWLKLL	<u>AP00143</u>	Anti-Gram+ y Gram-

4.8 Predicción de la actividad antimicrobiana

Los péptidos se sometieron a una probable predicción antimicrobiana con la plataforma DBAASP v3 (Pirtskhalava et al., 2021) donde se utilizó la metodología realizada con el algoritmo de Machine Learning descrito por Vishnepolsky et al., (2022) que está basado en propiedades computarizadas para secuencias de AMPs y características de genomas calculadas para una cepa microbiana objetivo, con la aplicación de algoritmos de aprendizaje automático para clasificar los AMPs. Aquí se evaluó la probabilidad de que los péptidos tuvieran actividad contra especies microbianas como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Como anteriormente se mencionó el alcance de esta plataforma nos permitió evaluar estas cepas bacterianas disponibles en la versión actual. Esta herramienta define como péptidos activos aquellos en los que se predice una concentración mínima inhibitoria menor a 25 µg/ml y como péptidos no activos los que reportan una MIC > 100 µg/ml. En este estudio se encontró que ocho péptidos fueron activos contra el 100% de las cepas evaluadas y los péptidos BfP1 y OvP2 son activos con 3 de las 4 cepas evaluadas (Tabla 10).

Con relación a lo anterior Kim et al., (2020) reportaron un nuevo AMPs híbrido selectivo para *P. aeruginosa*. El péptido PA2-GNU7, quien exhibió un alto grado de especificidad contra este microorganismo a través de la unión a la porina OprF de la membrana externa y eliminó rápida y selectivamente las células; de modo similar, Maturana et al., (2020) evaluaron el péptido P6.2 quien exhibió un valor de MIC de 12,72 µM contra las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, mostrando una amplia actividad antibacteriana; de la misma manera Al-Khdhairawi et al., (2023) utilizaron

métodos similares de inteligencia artificial como PAAS-DBAAS y ToxinPred, además, emplearon otras aplicaciones como dPABBS, y HemoPred para evaluar la actividad biológica potencial de 249 péptidos, y predijeron un total de 18 péptidos activos contra *K. pneumoniae* entre los cuales ocho se consideraron como no tóxicos y no hemolíticos según los resultados expuestos por las herramientas mencionadas.

Tabla 10: Predicción de la actividad antimicrobiana de los 10 péptidos seleccionados en la plataforma DBAASP v3, utilizando el método Machine Learning.

Péptido	Secuencia	<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	GGIFKKTFFALLKKI	0.58	Activo	0.56	No Activo	0,68	Activo	0.59	Activo
OvP2	LVLKLLKLLIKQLP NA	0.66	Activo	0.91	Activo	0.5	Activo	0.63	No Activo
AbP3	GLKRALTLFKWI	0.64	Activo	0.58	Activo	0.85	Activo	0.75	Activo
AmP4	LRLFKGSIAFIK	0.72	Activo	0.74	Activo	0.57	Activo	0.63	Activo
BsP5	FSKAFGWVKKIF	0.67	Activo	0.78	Activo	0.62	Activo	0.73	Activo
BsP6	IGKRIKKYIVWLIV	0.57	Activo	0.55	Activo	0.77	Activo	0.58	Activo
FpP7	LKKLSAAFKKLVA	0,69	Activo	0,63	Activo	0.76	Activo	0.5	Activo
CsP8	IGGRSVKWLKKLIV TA	0.59	Activo	0.55	Activo	0.61	Activo	0.59	Activo
MrP9	VPKVLGLLKKVFA KR	0.59	Activo	0.74	Activo	0.52	Activo	0.55	Activo
MrP10	LKKFGKALFKPLI	0.5	Activo	0.51	Activo	0.61	Activo	0.51	Activo

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

El valor predictivo que genera la actividad antimicrobiana con el método Machine Learning en DBAASP v3 se valora en función de la capacidad para realizar predicciones precisas en comparación con los datos experimentales, esto se deriva de acuerdo a la precisión con valores entre 0 y 1 que describen la capacidad de la herramienta para generar resultados correctos, en este

caso, los modelos predictivos de la herramienta se han desarrollado basándose en el análisis comparativo de varios algoritmos de aprendizaje automático y las propiedades fisicoquímicas de las secuencias peptídicas para predecir el potencial antimicrobiano. En la tabla 10 se puede evidenciar que los 10 péptidos tienen un valor predictivo igual o superior a 0.5, tanto para péptidos activos como para no activos, lo que quiere decir que entre más elevado sea el valor predictivo más precisa es la prueba, ya que aquí se determina que tan cercanas son las predicciones de la herramienta a los resultados reales o conocidos.

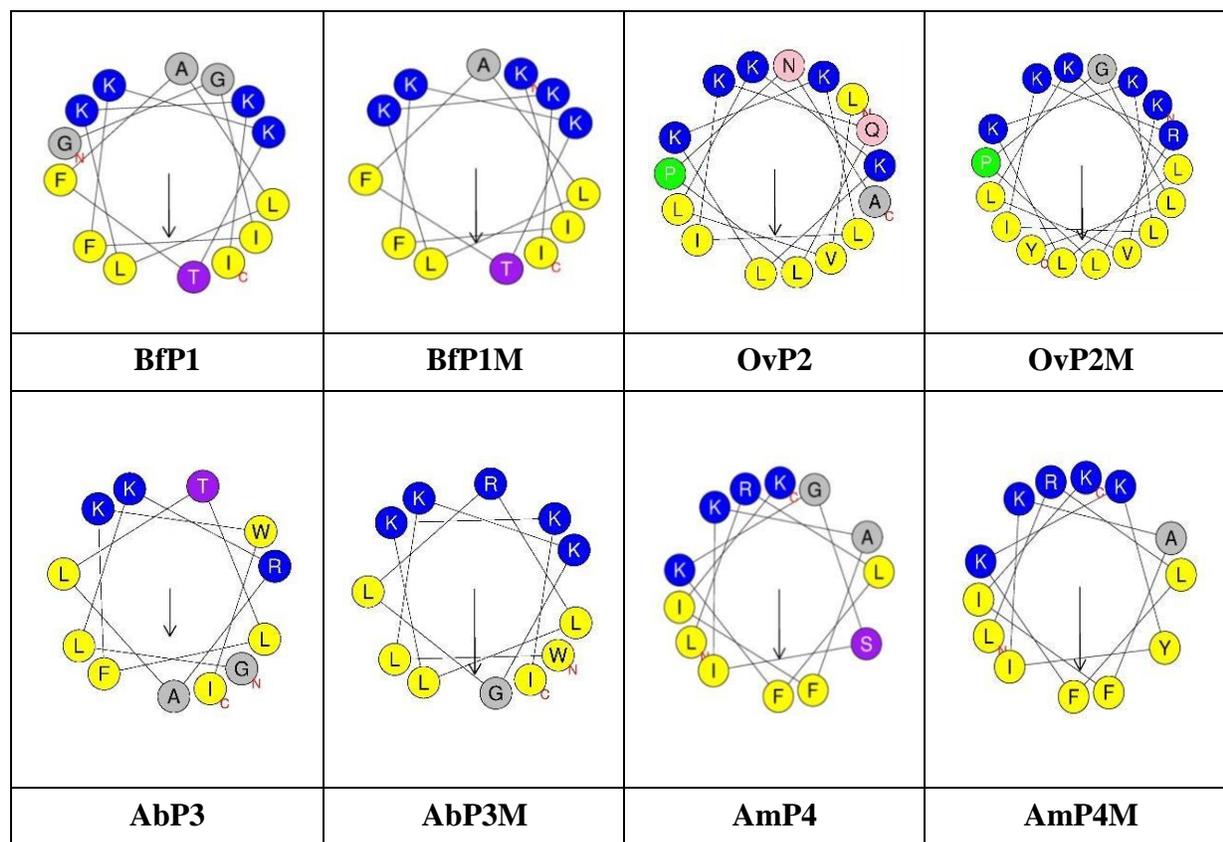
4.9 Modificaciones de los péptidos

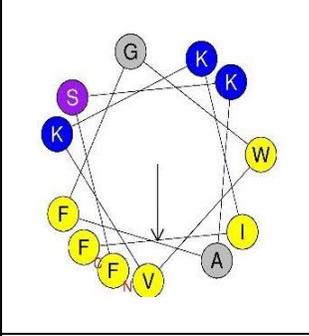
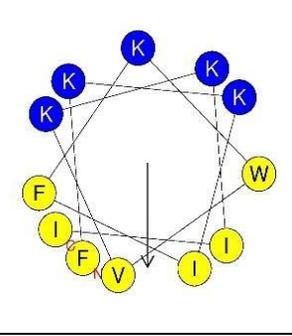
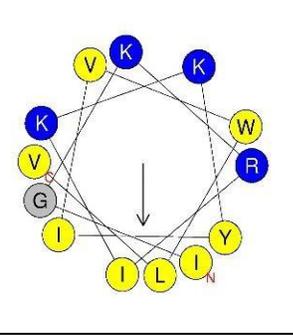
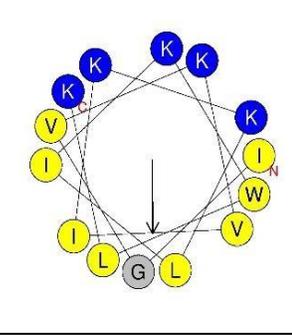
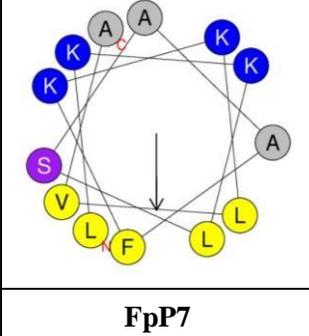
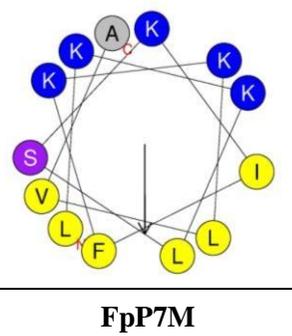
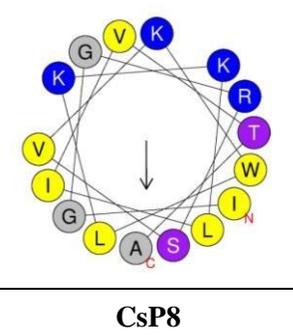
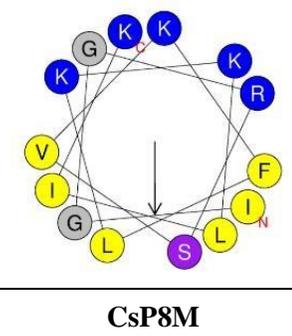
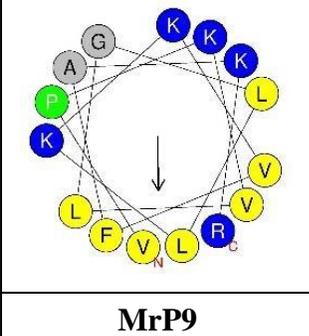
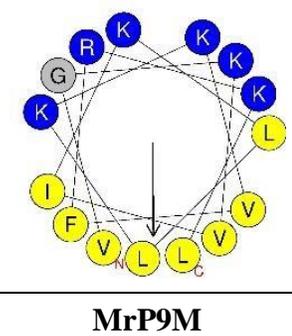
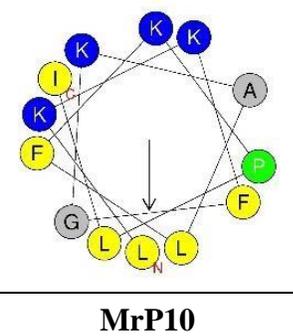
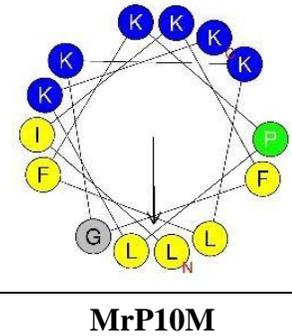
La modificación de los 10 péptidos seleccionados se realizó teniendo en cuenta sus propiedades fisicoquímicas como carga, longitud, porcentaje de hidrofobicidad, índice de Boman, punto isoeléctrico y rueda helicoidal que se puede visualizar y analizar en los programas TYPE-PEPTIDE (Tamayo et al., 2018) y HeliQuest (Gautier et al., 2008); además se tuvo en cuenta los parámetros iniciales predichos, en especial la probabilidad de unión a membranas con la herramienta AMPHIPASEEK (Sapay et al., 2006) y la probabilidad de causar hemólisis usando las diferentes herramientas aplicadas.

Como primer paso, se visualizaron y analizaron las ruedas helicoidales de cada péptido con el programa HeliQuest (Gautier et al., 2008), (figura 5). 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. Cada color representa el tipo de aminoácido, por ejemplo, el azul representa a los aminoácidos catiónicos y el amarillo los hidrofóbicos, quienes son los que principalmente dividen las caras del círculo, los aminoácidos que se encuentren en rosado son neutros polares con cadena lateral amídica, los morados pertenecen a los neutros polares con cadena lateral hidroxílica y los grises son aminoácidos con cadenas laterales alifáticas no ramificadas, finalmente, la flecha indica el momento hidrofóbico (μH), que dependiendo de la hidrofobicidad y posición de la cadena lateral a lo largo del eje de la hélice se verá afectada por su longitud y dirección. En este primer análisis se realiza un mapa que conduce a la primera

apreciación de los péptidos, identificando los posibles aminoácidos que podrían ser sustituidos, eliminados o reemplazados con el fin de generar una correcta formación de las dos caras del péptido (figura 5). Rončević et al., (2019) afirman que una de las propiedades clave relacionadas con la actividad biológica de cualquier secuencia de AMPs 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 AMPs activos. Para que pueda ver 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. La anfipaticidad ayuda a la actividad de los péptidos helicoidales, ya que les permite insertar sus caras hidrofóbicas en la bicapa de la membrana, este es un paso esencial que ayuda a la desestabilización de la membrana. La anfipaticidad se debe ajustar correctamente para lograr un equilibrio óptimo entre la potencia antibacteriana y la toxicidad hacia las células eucarióticas.

Figura 5: Rueda helicoidal de los péptidos originales y modificados obtenida con HeliQuest.



			
BsP5	BsP5M	BsP6	BsP6M
			
FpP7	FpP7M	CsP8	CsP8M
			
MrP9	MrP9M	MrP10	MrP10M

En este trabajo se tuvo en cuenta la distribución de cada aminoácido utilizando la herramienta TYPE-PEPTIDE (Tamayo et al., 2018), en esta herramienta se puede configurar el péptido inicial evaluando las dos caras y la posición de cada aminoácido, de esta manera se puede eliminar, agregar e incluso reformular el péptido, además cuenta con la opción de visualización estructural en 3D, quien a su vez proporciona las propiedades fisicoquímicas de cada uno de los cambios realizados, de acuerdo a esto se evalúa y certifica que las modificaciones realizadas no tengan un efecto desfavorable en cuanto a estructura y sus propiedades con respecto al péptido original.

El objetivo principal de las modificaciones se enfocó en las características fisicoquímicas del péptido y su efecto no hemolítico, puesto que estas dos características son importantes para un

péptido antimicrobiano selectivo; por otro lado, al realizar este tipo de cambios no siempre se puede mejorar las condiciones iniciales del péptido, más bien se debe tener en cuenta que se requiere estabilizar estos parámetros para que sus condiciones no fueran adversas en ensayos de otro tipo (Tablas 11 y 12).

Tabla 11: Características 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 FALLK K I	43.75%	14	4	11.3	50	-0.33
BfP1M	K IFKKT F FALL K KI	53.85%	13	5	11.4	53.85	0.22
OvP2	LVL K L L K L IK L IQLP N A	50%	16	5	11.4	50	0.28
OvP2M	K VL L L L K L IK R L P GL Y	52.94%	17	6	11.4	47.06	0.20
AbP3	G L K R A L T L F K W I	46.67%	12	3	12	58.33	0.07
AbP3M	W L K K G L R L L K K I	53.33%	12	5	12.1	50	0.77
AmP4	LRL F K G S I K A F I K	47.06%	13	4	12	53.85	0.51
AmP4M	LRL F K K Y I K A F I K	43.75%	13	5	11.3	53.85	0.75
BsP5	F S K A F G W V K K I F	38.46%	13	5	12.1	53.85	0.92
BsP5M	F K K I F K W V K K I I	50%	12	5	11.4	58.33	0.06
BsP6	I G K R I K K Y I V W L V	42.86%	13	4	11.2	53.85	0.05
BsP6M	I G V K V I K L I K W L K	47.06%	14	5	11.4	57.14	-0.59
FpP7	L K K L S A A F K L V A	50%	13	4	11.3	61.54	-0.12
FpP7M	L K K L S K I F K L V A	53.85%	13	5	11.4	53.85	0.2
CsP8	I G G R S V K W L K L I V T A	43.48%	16	4	12	50	0.24
CsP8M	I G G R S V K F L K K L I K	47.06%	14	5	12.1	42.86	0.85
MrP9	V P K V L G L L K K V F A K R	52.94%	15	5	12.1	53.33	0.30
MrP9M	V G K V I K L L K K V F R K L	50%	15	6	12.1	53.33	0.46
MrP10	L K K F G K A L F K P L I	46.15%	13	4	11.3	53.85	-0.48
MrP10M	L I K F G K K L F K P L K K	53.33%	14	6	11.5	42.86	0.48

*pI= Punto isoeléctrico

En la tabla 11 se relacionan todas las modificaciones (letras en color rojo) que se realizaron a cada péptido de la siguiente manera:

En primer lugar, en el péptido 1 (BfP1) se eliminó la glicina 1 y se sustituyó la glicina 2 por una lisina, aminoácido de carga positiva que ayudó a equilibrar las propiedades anfipáticas del péptido y una estructura helicoidal definida, la adopción de esta estructura activa se ve favorecida por la

presencia de residuos estabilizadores de hélice distribuidos a lo largo de la secuencia como L, A y K (Rončević et al., 2019).

En el péptido 2 (OvP2) se pasó la lisina de la posición 5 a la posición 1 y la leucina de la posición 1 se pasó a la posición 5, a continuación, la glutamina de la posición 12 se eliminó y fue sustituida por arginina, de igual modo la asparagina 15 y la alanina 16, se sustituyeron por glicina y leucina, respectivamente. Además, para que las condiciones fisicoquímicas se mantuvieran fue necesario adicionar tirosina al final del péptido ayudando a estabilizar su estructura teniendo una distribución hidrofóbica más definida (Figura 5). El agrupamiento de residuos hidrofóbicos en un lado de la hélice, permite la inserción en la bicapa de la membrana (Rončević et al., 2019).

A continuación, en el péptido 3 (AbP3) se cambió la glicina de la posición 1 a la posición 5 y el triptófano 11 a la posición 1, posteriormente la arginina 4 se llevó a la posición 7, eliminando la treonina, y en la posición 4 se ubicó una lisina y en la 5 una alanina, a continuación, la fenilalanina 9 se eliminó y se colocó en su lugar una leucina, finalmente en la posición 11 se colocó una lisina, cambios que le dieron una mejor apariencia a la estructura helicoidal. Los aminoácidos catiónicos lisina/arginina suministran una carga positiva para certificar la acumulación en las superficies de las células microbianas polianiónicas y la interacción con la superficie aniónica de la membrana citoplasmática y el triptófano (W) es importante para la formación de estructuras anfipáticas helicoidales (Han et al., 2021).

En el péptido 4 (AmP4) la glicina 6 y la serina 7 se sustituyen por lisina y tirosina respectivamente, ayudando a mantener las propiedades fisicoquímicas del péptido original.

En el péptido 5 (BsP5) se hace una leve modificación, se elimina la serina 2, la alanina 4 y la glicina 6 y se sustituyen por lisina, isoleucina y por otra lisina, respectivamente, esto ayudo a mejorar la estructura helicoidal del péptido y conservar sus propiedades fisicoquímicas, se experimentó realizando otro tipo de modificaciones, pero no fueron favorables sus propiedades.

Posteriormente, en el péptido 6 (BsP6) se cambia de posición de la valina 10 a la posición 3, luego la lisina 3 pasa a la posición 4 eliminando la arginina de esta misma lugar, la isoleucina 5 cambia a la posición 6 y se sustituye quedando una valina en el puesto 5, posteriormente la lisina 6 se transfiere al puesto 8 sustituyendo a la tirosina, a continuación la lisina 12 se cambia a la posición

9 y en las posiciones 10 y 11 se integra una isoleucina y una lisina, el triptófano 11 pasa a la posición 12 y la leucina 12 a la 13 eliminando la tirosina de esta misma posición, finalmente se integra una lisina en la posición 14. La isoleucina generalmente demuestra un potencial de formación de láminas β , en tanto la leucina tiene una fuerte inclinación a formar hélices α (Ciurac et al., 2019), por lo tanto, todos estos cambios ayudaron a encontrar una mejor formación de la estructura del péptido y sus propiedades fisicoquímicas.

En el péptido 7 (FpP7) se realizaron sustituciones de las alaninas 6 y 7, y se reemplazaron con lisina e isoleucina respectivamente, con estas modificaciones se mejoraron la estructura y los parámetros fisicoquímicos del péptido.

En el péptido 8 (CsP8) se sustituyó el triptófano de la posición 8 por fenilalanina, favoreciendo así la estructura helicoidal, a continuación, se eliminaron treonina y alanina de las posiciones 15 y 16 mejorando, las características fisicoquímicas del péptido y finalmente se sustituye la valina de la posición 13 por lisina.

En las modificaciones del péptido 9 (MrP9), la leucina 5 se transfiere a la posición 15 donde se encuentra una lisina quien se pasa a la posición 13, además en la posición 5 se adiciona isoleucina, finalmente se sustituye la glicina 6 por lisina, dándole un mejor aspecto a las dos caras de la rueda helicoidal y mejorando en algunos aspectos las características fisicoquímicas.

Finalmente, en el péptido 10 (MrP10) la lisina 2 se pasa a la posición 1 y la isoleucina que se encuentra en esta posición se traslada a la posición 2, además la alanina de la posición 7 se sustituye por lisina y se amplía el péptido al final de la cadena con una lisina, fortaleciendo la hélice y sus características.

Como resultado final de las modificaciones de este estudio se logró mantener 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 entre el 50% y 80%, 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, permite la inserción en la bicapa de la membrana objetivo (Rončević et al., 2019).

En relación con lo anterior, Madrazo y Campos (2022) reportaron el proceso de mejora y optimización del péptido CVLKKYA, los autores realizaron una serie de sustituciones manteniendo el fragmento LKKY en su posición original. En el informe, se menciona que el 57,14% de la secuencia completa se mantuvo intacto después de las modificaciones. En otro experimento se realizaron sustituciones en los péptidos KKLLKN y KLLKKN, reemplazando el residuo N por I en la posición final de ambas secuencias. Este proceso permitió conservar el 83,3% de la composición original del péptido. El estudio identificó que el aminoácido más prevalente en estas secuencias modificadas fue K, seguido de L. En contraste, C, V, A y N de las secuencias originales fueron reemplazados por K, lo que proporcionó contrapartes catiónicas y también hidrofóbicas a L y a I.

Tabla 12: Determinación de la probabilidad como antimicrobianos en diferentes plataformas de inteligencia artificial de los péptidos modificados.

Péptido	AMPS canner	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

En la tabla 12 se puede observar que las modificaciones realizadas en la secuencia de los péptidos, en la mayoría de los casos, mantienen una predicción de actividad superior a 0.95 en la mayoría de los predictores, estos valores de predicción pueden verse afectados debido al proceso de modificación de los péptidos, por lo cual se debe realizar un trabajo mancomunado con las demás plataformas de predicción y así poder obtener los mejores resultados, es importante tener en cuenta los parámetros establecidos entre los rangos adecuados para que un péptido sea considerado antimicrobiano y así la predicción no tenga mucha variabilidad.

Entre los resultados más relevantes están OvP2M, AbP3M, BsP6M, CsP8M y MrP10M donde se pudo superar valores de predicción de 0.98 reportados para el péptido original, siendo este valor predictivo el óptimo en este estudio. En los otros péptidos también se obtuvieron valores superiores y algunos predictores disminuyeron el umbral óptimo de 0.98, pero no menores a 0.95, es el caso de los péptidos BfP1M, OvP2M, Amp4M, BsP5M, FpP7M y MrP9M, aun así, siguen siendo fuertes candidatos para ser considerados como AMPs.

A continuación, se realizó el análisis de predicción de la capacidad hemolítica, toxicidad y como alérgenos en las mismas plataformas que se utilizó para los péptidos originales se aplicó en los péptidos modificados y se encontró que todos están en el rango establecido para considerarlos como no hemolíticos, no tóxicos y tampoco alergénicos (Tabla 13). Solamente el péptido Amp4M tuvo un valor levemente superior a 0.3 en la plataforma HAPPENN (Timmons y Hewage 2020), pero es un valor permisible para que no sea considerado como hemolítico (Tabla 13).

Para esta prueba, no se utilizó la herramienta AI4AMP (Lin et al., 2021), ya que las actualizaciones más recientes de la plataforma no ofrecían valores de predicción para este tipo de análisis. Normalmente, AI4AMP se usa para predecir ciertas características de péptidos, como su actividad antimicrobiana y capacidad hemolítica. Sin embargo, al no obtener datos específicos de predicción, no era posible utilizarlo como referencia o para validar resultados. Para superar esta limitación, se optó por utilizar otras plataformas empleadas a los péptidos originales que permitieron estimar el potencial hemolítico de los péptidos modificados. Estos enfoques alternativos proporcionaron la información necesaria para el estudio.

Tabla 13: Predicción del potencial hemolítico, de toxicidad y predicción de alergenicidad de los péptidos modificados.

Péptido	Secuencia	HAPPEN	HEMOPI-3	TOXIN PRED	AllerTop
BfP1M	KIFKKTFFALLKKI	0.051	0.52	-1.44	No alergénico
OvP2M	KVLKLLKLIKRLPGLY	0.204	0.57	-1.19	No alergénico
AbP3M	WLKKGLRLLKKI	0.130	0.57	-1.49	No alergénico
AmP4M	LRLFKKYIKAFIK	0.334	0.63	-1.06	No alergénico
BsP5M	FKKIFKWVKKII	0.243	0.42	-0.98	No alergénico
BsP6M	IGVKVIKLIKWLK	0.159	0.73	-0.98	No alergénico
FpP7M	LKKLSKIFKKLVA	0.007	0.54	-1.40	No alergénico
CsP8M	IGGRSVKFLKLIK	0.006	0.76	-0.54	No alergénico
MrP9M	VGKVIKLLKKVFRKL	0.065	0.54	-1.28	No alergénico
MrP10M	LIKFGKKLFPKPKK	0.021	0.66	-1.17	No alergénico

A continuación, en la tabla 14 se muestran los resultados del análisis de los péptidos modificados en AMPHIPASEEK (Sapay et al., 2006) donde se determina la capacidad de unión a membranas. Se obtuvo valores máximos positivos en todos los péptidos; además, en la mayoría superan el valor de referencia anteriormente mencionado donde se describe que si los valores son iguales o superiores a 0.5 se considera que tiene una mayor probabilidad de anclaje a la membrana objetivo, destacando el péptido BsP5M con un valor de 1.223 en uno de los aminoácidos de toda la cadena peptídica y con un menor valor de predicción está el péptido CsP8M quien obtuvo un puntaje de 0.386, pero a su vez con un mejor resultado comparado con el péptido original quien obtuvo un puntaje máximo de 0.175, no obstante son buenos resultados para esta característica, demostrando una mayor probabilidad de anclaje. Por otro lado, en los valores mínimos se encontró que los péptidos en su mayoría son positivos con excepción de OvP2M donde uno de sus componentes obtuvo un valor de -0.295 quien tendrá una menor capacidad de unión a la membrana; en general, todos los péptidos modificados tuvieron una respuesta favorable para esta característica. En cuanto a AbP3M tuvo una mejoría ya que en su pronóstico obtuvo un valor máximo de 0.813 y un valor

mínimo de 0.122 con respecto al original quien consiguió valores de 0.296 y 0.084, respectivamente, lo mismo sucedió con la mayoría de péptidos modificados donde se puede verificar que las modificaciones ayudaron a mejorar esta característica (tablas 8 y 14).

Los resultados del índice de inestabilidad evaluados en ProtParam (Gasteiger et al., 2005) concuerdan con los péptidos originales, ya que todos los péptidos son estables, únicamente CsP8M obtuvo el índice más alto con un valor de 29.24, no obstante, sigue siendo una predicción aceptable para esta propiedad. Después de obtener los resultados óptimos para los péptidos modificados se representaron nuevamente en la plataforma HeliQuest (Gautier et al., 2008), donde se comprobó que la representación helicoidal de cada péptido, mejora de manera significativa las caras hidrofílicas e hidrofóbicas (figura 5).

Tabla 14: Capacidad de unión a membranas e índice de inestabilidad de los péptidos modificados.

Péptido	Secuencia	AMPHIPASEEK		ProtParam
		Valor máximo	Valor mínimo	Índice de inestabilidad
BfP1M	KIFKKTFFALLKKI	0.583	0.035	-12.43
OvP2M	KVLKLLKLIKRLPGLY	0.711	-0.295	9.95
AbP3M	WLKKGLRLLKKI	0.813	0.122	7.20
AmP4M	LRLFKKYIKAFIK	0.857	0.544	-0.58
BsP5M	FKKIFKWVKKII	1.223	0.685	-39.51
BsP6M	IGVKVIKLIKWLK	0.726	0.403	-14.28
FpP7M	LKKLSKIFKKLVA	0.617	0.245	-28.45
CsP8M	IGGRSVKFLKKLIK	0.386	0.244	29.24
MrP9M	VGKVIKLLKKVFRKL	0.792	0.350	-35.95
MrP10M	LIKFGKCLKFKPLKK	0.521	0.231	-31.09

Tabla 15: Predicción de la actividad antimicrobiana de los 10 péptidos modificados utilizando el método Machine Learning de la plataforma DBAASP v3.

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
BfP1M	0.78	Activo	0.7	Activo	0.83	Activo	0.64	Activo
OvP2M	0.87	Activo	0.9	Activo	0.63	Activo	0.56	Activo
AbP3M	0.77	Activo	0.78	Activo	0.87	Activo	0.52	Activo
AmP4M	0.65	Activo	0.72	Activo	0.54	Activo	0.6	Activo
BsP5M	0.81	Activo	0.96	Activo	0.78	Activo	0.62	Activo
BsP6M	0.53	Activo	0.81	Activo	0.55	Activo	0.67	No Activo
FpP7M	0.79	Activo	0.93	Activo	0.85	Activo	0.53	No Activo
CsP8M	0,61	Activo	0.81	Activo	0.63	Activo	0.51	No Activo
MrP9M	0.61	Activo	0.9	Activo	0.67	Activo	0.58	No Activo
MrP10M	0.58	Activo	0.83	Activo	0.53	Activo	0.65	No Activo

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

Anteriormente, 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 propensión a ser activos sobre todas las cepas bacterianas en estudio, en cambio hubo un efecto opuesto en los péptidos BsP6M, FpP7M, CsP8M, MrP9M y MrP10M quienes no son activos frente a la cepa *S. aureus* ATCC 25923 (Tabla15), que en principio era susceptible con los péptidos originales, no obstante siguen siendo péptidos con un alto valor antimicrobiano.

4.10 Estructura tridimensional de los péptidos originales y modificados

Se determinó la estructura 3D de cada uno de los péptidos con el programa AlphaFold2 (Mirdita et al., 2022), este programa se establece en colaboración con el modelo ColabFold, que ofrece una predicción de manera rápida de proteínas y complejos de proteínas. El pronóstico es 40 a 60 veces más rápido al combinarlo con la búsqueda de homología de MMseqs2, de esta manera permiten la predicción de cerca de 1000 estructuras por día en un servidor con una unidad de procesamiento gráfico (Mirdita et al., 2022). En la figura 6 se puede observar que los péptidos modificados tienen una estructura alfa-hélice, la distribución de los aminoácidos a lo largo de la secuencia es primordial para que la hélice este bien establecida, por lo que se pueden favorecer las interacciones péptido-membrana de los patógenos objetivos. Ciufac et al., (2019) indican que cuando los péptidos adoptan una conformación de hélice anfipática, este tiene un rol importante en el proceso de interacción con las membranas ya que puede influir en la localización en las mismas, así como en la estructura del poro. Por lo tanto, la selectividad de los péptidos es el resultado de una delicada interacción entre estos parámetros y la modificación de uno de ellos puede dar lugar a ajustes compensatorios de los demás.

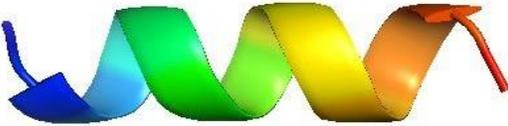
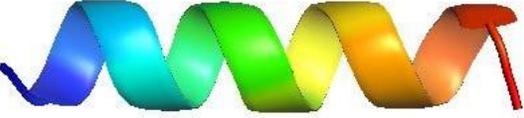
Los resultados generados por AlphaFold2 (Mirdita et al., 2022) se procesaron y visualizaron con el software PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System). Todos los péptidos tienen estructuras de hélice, un poco suelta en los extremos N-terminal y C-terminal, específicamente se encuentran más pronunciadas en los péptidos OvP2M, AmP4, BsP5, BsP6, BsP6M, CsP8, CsP8M, MrP10 y MrP10M, esta circunstancia se puede presentar debido a la interacción que tienen los aminoácidos colindantes quienes limitan la conformación helicoidal dando este aspecto en la visualización en 3D o debido a que el programa AlphaFold 2 no puede modelar con seguridad esta parte de la estructura.

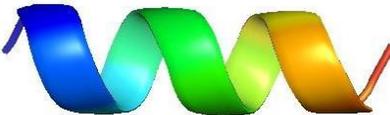
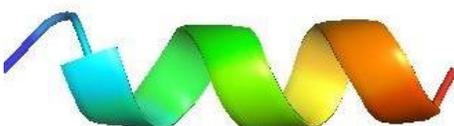
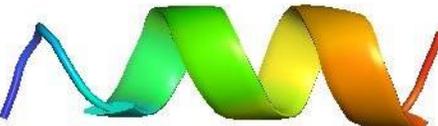
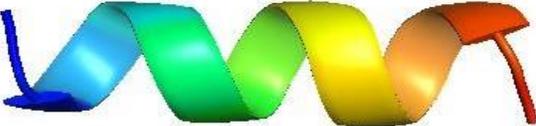
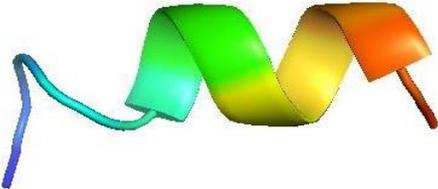
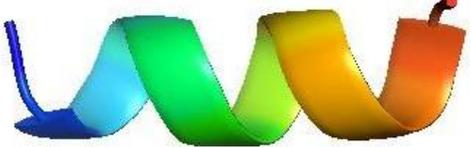
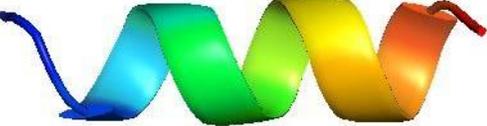
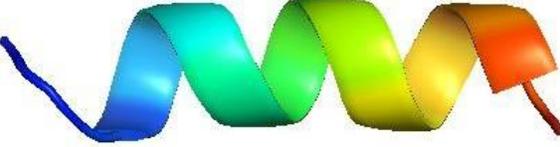
Pace y Scholtz (1998) aseguran que algunos aminoácidos se encuentran con más frecuencia en las hélices α que otros; esta tendencia se conoce como propensión a la hélice. Según estos autores, las propensiones de hélice de aminoácidos son diferentes. Los péptidos OvP2M, AmP4, BsP5, BsP6, BsP6M, CsP8, CsP8M, MrP10 y MrP10M en sus extremos poseen aminoácidos con propensión

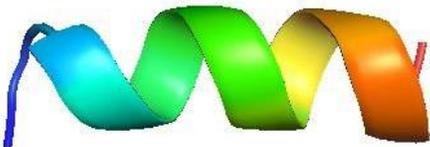
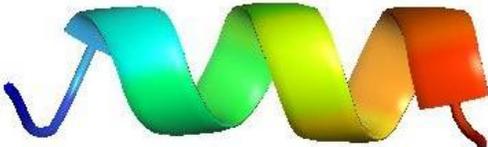
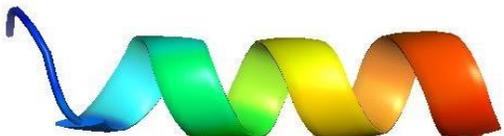
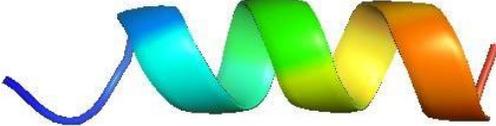
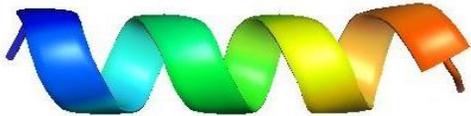
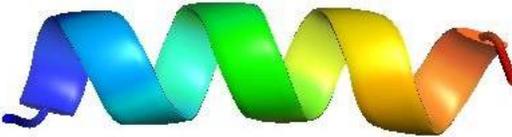
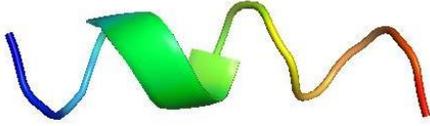
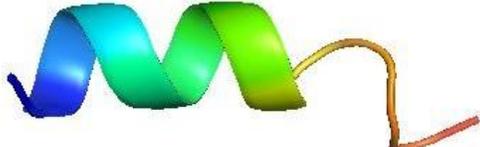
media o baja a formar hélice α , lo que puede ser una explicación a este tipo de efecto, con las modificaciones realizadas en algunos casos se ha mejorado esta estructura, no obstante al realizar otro tipo de cambios se verían afectadas sus características como antimicrobianos, en el caso de los péptidos AmP4M, BsP5M y BsP6M tuvieron mejorías con respecto al péptido original, así como MrP10M quien se vio con mayor progreso estructural, probablemente las modificaciones que se le realizaron a cada uno ayudaron a mejorar la predicción de los péptidos debido a que AlphaFold 2 probablemente encontró patrones estructurales más precisos a partir de su conocimiento interno mejorando su predicción; además, estos cambios eventualmente ayudaron a mejorar las interacciones de los aminoácidos que componen el péptido optimizando sus características fisicoquímicas (Figura 6).

En conclusión, los cambios que se hicieron a los péptidos originales a lo largo de la cadena afectaron de forma positiva, ya que favorecieron la estructura de hélice, permitiendo un plegamiento más compacto y una conformación tridimensional en espiral más definida para la mayoría de los péptidos modificados (figura 6).

Figura 6: Estructura 3D de los péptidos originales y modificados obtenidas con AlphaFold2.

	
BfP1	BfP1M
GGIFKKTFFALLKKI	KIFKKTFFALLKKI
	
OvP2	OvP2M

LVLKCLKKLIKQLPNA	KVLKLLKLIKRLPGLY
	
AbP3	AbP3M
GLKRALTLFKWI	WLKKGLRLLKKI
	
AmP4	AmP4M
LRLFKGSIKAFIK	LRLFKKYIKAFIK
	
BsP5	BsP5M
FSKAFGWVKKIF	FKKIFKWVKKII
	
BsP6	BsP6M
IGKRIKKYIVWLV	IGVKVIKLIKWLK

	
FpP7	FpP7M
LKKLSAAFKKLVA	LKKLSKIFKKLVA
	
CsP8	CsP8M
IGGRSVKWLKKLIVTA	IGGRSVKFLKKLIIK
	
MrP9	MrP9M
VPKVLGLLKKVFAKR	VGKVIKLLKKVFRKL
	
MrP10	MrP10M
LKKFGKALFKPLI	LIKFGKCLKFKPLKK

4.11 Propiedades adicionales de los péptidos originales y modificados

Además de las características y predicciones de los péptidos encontrados, fue preciso considerar varios aspectos para que los AMPs de este estudio sean considerados un fármaco peptídico potencial y así poder evaluarlo de forma *in vitro* y para uso experimental o terapéutico. Esto incluye la predicción de su actividad de penetración de células eucariotas con CellPPD (Gautam et al., 2013), como también la penetración en las células y su eficiencia de absorción con la herramienta MLCPP 2.0 (Manavalan y Patra 2022), así como la posibilidad de ser antifúngico, anticancerígeno y antiviral, para lo cual se utilizaron las plataformas en línea, Antifp (Agrawal et al., 2018), AntiCP 2.0 (Agrawal et al., 2021) y AVPPred (Thakur et al., 2012), respectivamente.

La mayoría de plataformas mencionadas emplean el algoritmo de aprendizaje automático Support Vector Machine (SVM) que utiliza características de la secuencia, la alineación, la composición de aminoácidos y sus propiedades fisicoquímicas. Los valores obtenidos en estas plataformas son constantes, la clasificación de una u otra característica depende del umbral al cual sea sometido el péptido; solamente AVPPred (Thakur et al., 2012) en sus predicciones cambia el valor de SVM dependiendo de la composición del péptido. Por otro lado, MLCPP 2.0 (Manavalan y Patra 2022) utiliza el método machine-learning (ML) que se enfoca en la fusión de diferentes clasificadores permitiendo la integración de información para construir un modelo de predicción más fuerte tanto para la predicción de penetración y su eficiencia de absorción en las células.

Tabla 16: Predicción de la actividad antifúngica (Antifp), anticancerígena (AntiCP) y la capacidad de penetración celular (CellPPD) en células eucariotas de los péptidos originales y modificados.

Péptido	CellPPD	Antifp	AntiCP
BfP1	0,20	-0,90	0,80
BfP1M	0,46	-0,25	0,87
OvP2	0,25	-0,17	0,48
OvP2M	0,02	-0,39	0,61
AbP3	0,25	-0,66	0,60
AbP3M	0,52	0,24	0,42
AmP4	-0,31	-0,38	0,67
AmP4M	-0,1	-0,42	0,76

BsP5	-0,06	-0,17	0,73
BsP5M	0,12	0,08	0,87
BsP6	-0,30	-0,71	0,37
BsP6M	0,10	-0,08	0,36
FpP7	-0,12	-0,49	0,67
FpP7M	-0,06	-0,42	0,68
CsP8	-0,17	-0,34	0,52
CsP8M	0,05	-0,04	0,71
MrP9	-0,12	-0,47	0,70
MrP9M	0,12	-0,63	0,46
MrP10	0,12	-0,82	0,72
MrP10M	0,34	0,18	0,74

Umbral con punto de corte utilizados para todas las plataformas están entre 0.7 y 1, los resultados son arrojados por la máquina de inteligencia SVM, valores menores a estos parámetros corresponden a una predicción baja, los resultados mayores o iguales corresponde a un pronóstico de actividad más alto.

Tabla 17: Predicción de la penetración celular (CPP) y de eficiencia de absorción de los péptidos originales y modificados con la herramienta MLCPP 2.0

Péptido	Clase	Probabilidad	Eficiencia de absorción	Probabilidad
BfP1	No CPP	0,12	-	-
BfP1M	CPP	0,89	Alto	0,96
OvP2	CPP	0,90	Alto	0,94
OvP2M	CPP	0,96	Alto	0,85
AbP3	CPP	0,96	Bajo	0,11
AbP3M	CPP	0,91	Alto	0,99
AmP4	No CPP	0,21	-	-
AmP4M	CPP	0,81	Bajo	0,23
BsP5	CPP	0,92	Bajo	0,07
BsP5M	CPP	0,76	Bajo	0,41
BsP6	No CPP	0,47	-	-
BsP6M	No CPP	0,27	-	-
FpP7	CPP	0,95	Bajo	0,49
FpP7M	CPP	0,78	Alto	0,93
CsP8	CPP	0,75	Alto	0,80
CsP8M	CPP	0,64	Bajo	0,16
MrP9	CPP	0,75	Alto	0,99
MrP9M	No CPP	0,48	-	-
MrP10	CPP	0,74	Alto	1,00
MrP10M	CPP	0,93	Alto	1,00

Cuando se especifica que se aceptan valores dentro de un rango determinado, se está indicando que esos valores cumplen con ciertas condiciones o criterios establecidos para el experimento o análisis. En el caso de las herramientas Antifp, AntiCP 2.0 y AVPpred, para este estudio el rango aceptado está entre 0.7 y 1.0. Esto significa que cualquier resultado dentro de este intervalo es considerado óptimo o adecuado para el propósito del estudio, no obstante, el usuario es quien decide este umbral según sus necesidades.

Por otro lado, un valor menor a 0.7 o negativo podría indicar una ausencia de resultados o una respuesta opuesta a la esperada. En este contexto, el servidor establece una puntuación basada en el algoritmo SVM y un estado de predicción que clasifica como "CPP" o "no CPP", según el umbral de corte elegido por el usuario. Para obtener resultados más confiables, se sugiere seleccionar un umbral más alto. Esto se basa en la recomendación de Gautam et al. (2013), quien señala que aumentar el valor del umbral incrementa la confiabilidad de los resultados, reduciendo la probabilidad de falsos positivos.

Con relación a lo anterior en la plataforma CellPPD (Gautam et al., 2013), la cual permitió estimar la capacidad de penetración celular de los péptidos originales y los modificados, quien estima esta facultad para células eucariotas. Los resultados indican que los péptidos originales no tienen capacidad de penetración celular con umbrales entre 0.7 y 1. (Tabla 16). Es el mismo caso para los péptidos modificados, donde el mayor puntaje es de 0.52 y como se mencionó anteriormente el umbral no cumple con los rangos establecidos, en resumen, ningún péptido tendría esta capacidad de penetración en células eucariotas.

En comparación con los resultados generados por MLCPP 2.0 (Manavalan y Patra 2022) quien también predice si el péptido es "CPP" o "no CPP" Esta predicción no se realiza en base a células eucariotas ni tampoco utiliza umbrales para su predicción sino más bien este procedimiento lo realiza en un contexto general con rangos entre 0 a 1, siendo este el último más alto. Además, predice una característica adicional que es la eficiencia de absorción. De acuerdo a esto se encontró que la mayoría de péptidos originales predice que tienen una alta probabilidad de penetración celular con excepción de los péptidos BfP1, AmP4, BsP6, Sin embargo, en comparación con los homólogos modificados BfP1M y AmP4M tienen la característica de CPP con una probabilidad

más alta en la eficiencia de absorción para el primero y una más baja en el segundo y BsP6M obtiene el mismo resultado que el original (Tabla 17).

En este orden de ideas. El péptido BsP6 y su versión modificada mantienen el mismo pronóstico en las pruebas, mientras que el péptido original MrP9, inicialmente clasificado como CPP con alta eficiencia de absorción, se vuelve no CPP después de ser modificado. Por otro lado, OvP2, AbP3, BsP5, FpP7, CsP8 y MrP10, junto con sus versiones modificadas, mantienen su clasificación como CPP y su eficiencia de absorción, aunque sus resultados pueden variar en cuanto a las predicciones, con algunos mostrando puntajes más altos que otros (Tabla 17).

Como resultado, en el pronóstico para evaluar las características como antifúngicos se utilizó Antifp (Agrawal et al., 2018). De acuerdo a esto se determinó que los péptidos originales y modificados ninguno es considerado como antifúngico en el umbral entre 0.7 y 1.0. Como se mencionó anteriormente el usuario es quien determina el umbral de predicción, sin embargo, el resultado de SVM no varía en cualquiera de ellos, por ejemplo, si se considerara estimar un umbral menor como por ejemplo valores entre 0 y 1, los péptidos modificados AbP3M, BsP5M y MrP10M serían considerados como antifúngicos (tabla 16).

Los resultados obtenidos en la plataforma AntiCP 2.0 (Agrawal et al., 2021) permitieron evaluar diferentes puntos de corte o umbrales, con mayor especificidad para el modelo 1, que se basa en la composición de dipéptidos a partir del conjunto de datos de ACP/AMP. Según la tabla 16, el péptido BfP1 tiene un puntaje de 0.80 en el modelo SVM, clasificándolo como anticancerígeno. Con relación a los péptidos modificados, el péptido BfP1M incrementó su puntaje a 0.87, al igual que BsP5M, también con el mismo puntaje. Esto sugiere un aumento en la efectividad del modelo tras los cambios realizados. Otros péptidos con puntajes SVM superiores a 0.70, que también se consideran anticancerígenos, incluyen Amp4M, BsP5, CsP8M, MrP9, MrP10 y MrP10M, con puntajes de 0.76, 0.73, 0.71, 0.70, 0.72 y 0.74, respectivamente.

Dentro de este orden de ideas, en la evaluación de los péptidos con características antivirales en la plataforma AVPpred (Thakur et al., 2012), quien utilizan varias características de la secuencia de péptidos con los algoritmos utilizados y los modelos propuestos por esta herramienta, se encuentra el método de búsqueda de motivos donde se utilizan los motivos conservados en AVP usando la estrategia MEME/MAST, donde MEME se usa para descubrir motivos y MAST se usa para buscar

estos motivos en péptidos. La predicción correcta depende de sus valores determinados en una variable denominada E. Si con un valor E estipulado, MAST busca cualquier motivo, entonces se predice que este péptido será AVP y, si no se encuentra, se predice que no será AVP (Thakur et al., 2012).

En segundo lugar, se encuentra el método de alineación, donde está implementado el algoritmo BLASTP para la predicción de AVP, en el cual existen dos bases de datos; una antiviral que tiene 544 péptidos y la otra no antiviral que tiene 407. Inmediatamente, ambas bases de datos se prepararon en formato legible BLAST usando 'formatdb'. De modo similar, se encuentra el modelo de composición de aminoácidos donde se utiliza la estructura de 20 aminoácidos naturales de diferentes péptidos la cual está calculada mediante una ecuación. Finalmente se encuentra el método que utiliza propiedades fisicoquímicas, aquí se utilizan las 25 de mejor rendimiento seleccionadas para desarrollar el modelo AVPphysico (Thakur et al., 2012).

Todos los modelos utilizan la técnica de aprendizaje automático Support Vector Machine, en la tabla 18 se muestra el valor numérico de la puntuación SVM para los modelos de composición de aminoácidos y el modelo por propiedades fisicoquímicas, donde 100 es el valor superior y 0 es el mínimo; en cuanto al modelo de búsqueda de motivos y el de alineación arrojan resultados descriptivos, además, al final se categorizan en general los péptidos en la última de las columnas del resultado de predicción de AVPpred, donde los define por cantidad de predicciones positivas y negativas.

Esta plataforma evalúa todos los algoritmos de forma grupal para obtener una predicción general. Con base en esta evaluación, si dos o más algoritmos muestran un resultado positivo, el péptido, según el umbral elegido por el usuario, se considera antiviral. Sin embargo, si solo uno de los algoritmos produce un resultado positivo, el péptido se clasifica como no antiviral.

En relación a lo anterior, la predicción en este experimento depende del umbral elegido. Para este estudio, se trabajó con una escala del 50% al 100%. Este modelo usa umbrales que representan un porcentaje de especificidad, lo que equivale a valores entre 0.5 y 1.0. Se eligió un umbral menor, como el 50%, para aprovechar la capacidad de la herramienta de evaluar resultados con diferentes algoritmos, permitiendo obtener mayor diversidad de resultados y perspectivas.

De acuerdo con la información recopilada con el umbral del 50%, las predicciones indicaron que los péptidos BfP1, AbP3, AmP4, BsP5 y FpP7 serían considerados como antivirales, ya que cumplieron con dos de los cuatro modelos de predicción. Sin embargo, con un umbral más alto, como el 70%, solo el péptido AmP4 sería clasificado como antiviral (Tabla 18).

En esta predicción utilizando los péptidos modificados, al establecer un umbral del 50%, solo AmP4M y CsP8M fueron considerados antivirales, ya que cumplieron con las condiciones en dos de los cuatro modelos utilizados. Sin embargo, si el umbral se eleva al 70% o más, ninguno de los péptidos analizados cumple con los criterios para ser clasificado como antiviral. Estas diferencias se muestran en la tabla 19.

Tabla 18: Predicción de la actividad antiviral de los péptidos originales con diferentes modelos de la herramienta AVPpred

Péptido	Modelos de predicción				
	Búsqueda de motivos	Alineación de secuencias	Composición de aminoácidos	Propiedades fisicoquímicas	Predicción general
BfP1	No	No-AVP	66.99	71.93	Si
OvP2	No	No-AVP	48.41	66.90	No
AbP3	No	No-AVP	66.46	76.48	Si
AmP4	Si	No-AVP	72.53	78.60	Si
BsP5	No	No-AVP	52.79	74.70	Si
BsP6	No	No-AVP	50.59	49.91	No
FpP7	No	No-AVP	60.42	68.76	Si
CsP8	Si	No-AVP	64.16	43.76	No
MrP9	No	No-AVP	48.67	49.70	No
MrP10	No	No-AVP	49.26	74.90	No

Umbral utilizado para todas las plataformas está entre 50 y 100, valores menores a estos parámetros corresponden a una predicción baja, los resultados mayores o iguales corresponden a un pronóstico más alto.

Tabla 19: Predicción antiviral de los péptidos modificados con diferentes modelos de la herramienta AVPpred

Péptido	Modelos de predicción				
	Búsqueda de motivos	Alineación de secuencias	Composición de aminoácidos	Propiedades fisicoquímicas	Predicción general
BfP1M	No	No-AVP	47.60	78.45	No
OvP2M	No	No-AVP	45.49	40.58	No
AbP3M	No	No-AVP	46.19	73.23	No
AmP4M	No	No-AVP	62.90	82.08	Si
BsP5M	No	No-AVP	44.10	69.17	No
BsP6M	No	No-AVP	47.78	68.58	No
FpP7M	No	No-AVP	48.77	78.15	No
CsP8M	No	No-AVP	67.65	75.14	Si
MrP9M	No	No-AVP	49.54	69.38	No
MrP10M	No	No-AVP	44.67	78.63	No

Umbral utilizado para todas las plataformas están entre 50 y 100, valores menores a estos parámetros corresponden a una predicción baja, los resultados mayores o iguales corresponden a un pronóstico más alto.

En resumen, los resultados sugieren que los péptidos originales y sus homólogos modificados en la mayoría de casos tienen un alto potencial de acción contra ciertas bacterias y su posibilidad de ser anticancerígenos y en algunos casos en la actividad contra virus. Este comportamiento podría ser atribuido a su estructura y características fisicoquímicas, lo que facilita su interacción con este tipo de patógenos. Este potencial podría ser aprovechado para desarrollar nuevos compuestos con propiedades similares. Sin embargo, se recomienda realizar más estudios para confirmar estas predicciones y explorar otros posibles usos para estos péptidos.

Por otro lado, una de las características más interesantes es la longitud de las secuencias, ya que esto les permite una rápida difusión e interacción con las células, de esta manera tienen una respuesta de defensa rápida contra diferentes tipos de patógenos; como se mencionó anteriormente, los péptidos pueden tener una longitud máxima de 50 aminoácidos, pero para su condición óptima se deben considerar péptidos de menor tamaño debido a su complejidad de síntesis, valor económico y facilidad de producción. En cuanto a los péptidos modificados; BfP1M, BsP5M y CsP8M al realizar sus cambios se decidió disminuir su longitud debido a que ayudó a mejorar algunas de sus predicciones como péptidos antimicrobianos y a mantener otras características como el potencial hemolítico, su toxicidad y predicción de alergenicidad bajas. Por el contrario, OvP2M, BsP6M y MrP10M tuvieron el mismo efecto pero incrementando su longitud, en el caso

de los péptidos que no tuvieron modificación en su extensión, pero si estructuralmente, se pudo observar también una mejoría de sus características, no obstante, se tuvo en cuenta que en todas las modificaciones, la carga, el punto isoeléctrico y el porcentaje de hidrofobicidad se mantuvieran entre los rangos mencionados al principio, debido a que son características conservadas para considerarlos como posibles antimicrobianos.

En respuesta a lo anterior las modificaciones han tenido un efecto positivo para el desarrollo de los objetivos propuestos, puesto que, al utilizar el diseño computacional, se lograron desarrollar péptidos antimicrobianos con propiedades específicas, con una mayor selectividad contra ciertos tipos de microorganismos, se pudo optimizar estructuralmente y para la mayoría de péptidos aumento su capacidad de unión a membranas.

Es importante destacar que cada péptido ha mostrado respuestas relevantes con distintas características, lo que permite su evaluación en diferentes ensayos. Para verificar la eficacia de estos compuestos, se podrían evaluar los 20 péptidos antimicrobianos (AMPs) identificados mediante ensayos *in vitro*, observando su rendimiento en experimentos específicos. Sin embargo, sería útil primero considerar su síntesis química evaluando su viabilidad económica y la facilidad para llevar a cabo este proceso.

De acuerdo a lo anterior es preciso destacar sus facultades particulares. Entre los péptidos a evaluar en ensayos *in vitro* con bacterias, podrían incluirse AbP3, AmP4, BsP5, BsP6, FpP7, CsP8, MrP9, MrP10, BfP1M, OvP2M, AbP3M, AmP4M y BsP5M.

Para experimentos que analicen la actividad antiviral, sería conveniente utilizar los péptidos BfP1, AbP3, AmP4, BsP5, FpP7, AmP4M y CsP8M.

Para ensayos que investiguen la actividad anticancerígena, se recomienda trabajar con BfP1, BfP1M, AmP4M, BsP5, BsP5M, CsP8M, MrP9, MrP10 y MrP10M.

Finalmente, de acuerdo a los resultados encontrados los péptidos que se pueden utilizar en diferentes pruebas que tienen una característica particular con amplio espectro encontramos: AmP4, BsP5 y AmP4M.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La metodología propuesta que permitió identificar los AMPs mediante las herramientas *in silico*, fue acorde para su desarrollo, puesto que se tomaron los límites más exigentes para tener una alta probabilidad de éxito, posiblemente este proceso le da una mayor confiabilidad de funcionar en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Esto se debe a que se seleccionaron las herramientas bioinformáticas adecuadas con gran avance tecnológico en el momento de buscar, diseñar y perfeccionar AMPs. Podría decirse que las estrategias computacionales y de inteligencia artificial que conlleva a este objetivo permiten elaborar, modificar y predecir cualquier tipo de péptidos de una manera más ágil, con bajo costo y de mayor rendimiento y confiabilidad.

La identificación de los nuevos AMPs que se obtuvieron de los proteomas estudiados tuvo gran éxito con los lineamientos propuestos en este trabajo; se pudieron obtener AMPs inéditos, con alta probabilidad de ser antimicrobianos, resultando un gran aporte científico para la generación de nuevas alternativas a los antibióticos. Se requirió de un amplio número de proteínas de diferentes organismos para obtener un número limitado de péptidos con ciertas características requeridas para cumplir con el objetivo, sin embargo, los otros péptidos que no se utilizaron pueden tener características promisorias con otras capacidades que se pueden evaluar con diferentes componentes.

La optimización de los nuevos AMPs mostró una mayor efectividad de ciertas características fisicoquímicas en relación con algunos algoritmos, además existe una mejora en la división de las caras polar y no polar de los mismos; no obstante, no se puede obtener una distribución perfecta de las mismas ya que el mínimo cambio puede afectar su capacidad hemolítica, toxicidad, capacidad de unión a la membrana y estabilidad, características importantes deseadas en un AMP, por lo cual, para encontrar afinidad en todas estas características requiere una importante claridad de lo que se quiere obtener de un péptido. Para ello la herramienta TYPE-PEPTIDE es la indicada en este proceso ya que permite visualizar datos específicos e importantes de los péptidos como la carga, punto Isoeléctrico, % de hidrofobicidad, índice de Boman y obtener la gráfica en 3D del

péptido a evaluar, características necesarias que ayudaron a generar una mayor destreza y confiabilidad necesaria para realizar cualquier tipo de modificación.

Al evaluar los AMPs originales y modificados con diferentes características, se identificaron 13 péptidos con potencial para ser antibacterianos, 7 con propiedades antivirales, 8 con posibles efectos anticancerígenos y 3 con un amplio espectro de acción. Estos resultados sugieren que estos péptidos podrían ser una base prometedora para el desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos. La diversidad de características observadas también destaca la versatilidad de los mismos, lo que abre nuevas oportunidades para la investigación y el desarrollo de medicamentos específicos y efectivos, por lo tanto, estos péptidos deberían ser probados en estudios *in vitro* e *in vivo*.

5.2 Recomendaciones

Las herramientas bioinformáticas manejan diferentes algoritmos y métodos que ayudan a la predicción de AMPs con alta especificidad y efectividad basadas en conjuntos de datos validados experimentalmente, no obstante las características de estas herramientas están en constantes actualizaciones, existen nuevos péptidos reportados y mejoras en este tipo de instrumentos *in silico*, por lo que se recomienda disponer de varios servidores que ayuden a corroborar y filtrar las características deseadas en un péptido, con esto se puede llegar a reducir errores y maximizar los objetivos a encontrar.

Para una mayor validación de los péptidos encontrados, se recomienda la continuación de este proyecto en cuanto a la síntesis y validación *in vitro* con microorganismos considerados como patógenos para una comprobación de la capacidad antimicrobiana ya reportada en este estudio, esta estrategia es fundamental para validar la hipótesis planteada al principio. Se sugiere utilizar los péptidos originales y modificados para corroborar cual es la probabilidad de éxito con la metodología de optimización ya realizada, con una perspectiva de llegar a una fase *in vivo*.

A. Anexo. Proteomas de organismos evaluados

ID del proteoma	Nombre del organismo	N° Proteínas del proteoma	Tipo de organismo	N° de péptidos encontrados
UP000015097	<i>Brevibacillus</i> fago Emery	102	Virus	217
UP000240847	<i>Staphylococcus</i> phage phisa	77	Virus	167
UP000157603	<i>Elephant endotheliotropic</i> herpesvirus	120	Virus	445
UP000464957	<i>Vibrio</i> fago VH1_2019	381	Virus	597
UP000319415	<i>Pompano iridovirus</i>	121	Virus	330
UP000144311	<i>Squirrelpox</i> virus	141	Virus	343
UP000204280	<i>Citrobacter</i> phage Merlin	303	Virus	507
UP000221247	<i>Synechococcus</i> fago Bellamy	269	Virus	625
UP000010364	<i>Bacilo</i> fago phiAGATE	204	Virus	303
UP000122533	<i>Murid</i> herpesvirus 1	164	Virus	524

UP000516127	<i>Mycobacterium</i> phage Estes	151	Virus	200
UP000127637	<i>Rat cytomegalovirus</i> (isolate England)	137	Virus	494
UP000202471	<i>Ralstonia</i> phage RSP15	244	Virus	513
UP000289149	<i>Cherax quadricarinatus</i> iridovirus	178	Virus	568
UP000099188	<i>Panine</i> betaherpesvirus 2	169	Virus	410
UP000516392	<i>Xanthomonas</i> phage Xoo-sp14	251	Virus	716
UP000249287	<i>Pandoravirus neocaledonia</i>	1.081	Virus	2.394
UP000006635	<i>Culex nigripalpus</i> nucleopolyhedrovirus (isolate Florida/1997)	109	Virus	262
UP000008028	<i>Sheeppox</i> virus (strain Turkey/TU-V02127)	144	Virus	548
UP000203507	<i>Ranid</i> herpesvirus 3	186	Virus	779
UP000202709	<i>Mollivirus sibericum</i>	514	Virus	1.313
UP000008991	<i>Human</i> cytomegalovirus (strain AD169)	190	Virus	458
UP000014924	<i>Adoxophyes honmai</i> entomopoxvirus 'L'	243	Virus	471
UP000202420	<i>Acanthocystis turfacea</i> chlorella virus 1	860	Virus	1.979
UP000014934	<i>Choristoneura biennis</i> entomopoxvirus	311	Virus	605
UP000274850	<i>Cedratvirus lausannensis</i>	643	Virus	1.355

UP000000344	<i>Vaccinia virus</i> (strain Western Reserve)	217	Virus	621
UP000203826	<i>Chrysochromulina ericina virus</i>	512	Virus	1.262
UP000203865	<i>Noumeavirus</i>	452	Virus	1.010
UP000236316	<i>Orpheovirus IHUMI-LCC2</i>	1.199	Virus	2.354
UP000002060	<i>Variola virus</i> (isolate Human/India/Ind3/1967)	198	Virus	614
UP000000863	<i>Emiliania huxleyi virus</i> 86 (isolate United Kingdom/English Channel/1999)	472	Virus	1.122
UP000318527	<i>Alteromonadaceae</i> bacterium	4.947	Bacteria	22.402
UP000295807	<i>Anseongella ginsenosidimutans</i>	3.575	Bacteria	19.933
UP000076023	<i>Terrimicrobium sacchariphilum</i>	4.168	Bacteria	15.305
UP000003019	<i>Neisseria shayeganii</i> 871	2.530	Bacteria	7.816
UP000318416	<i>Kitasatospora atroaurantiaca</i>	6.749	Bacteria	21.838
UP000187464	<i>Proteiniphilum saccharofermentans</i>	3.381	Bacteria	14.596
UP000059935	<i>Flavobacterium</i> sp. TAB 87	3.323	Bacteria	20.446
UP000035237	<i>Mycobacterium</i> sp. EPa45	5.595	Bacteria	15.463
UP000315195	<i>Herbaspirillum</i> sp. SJZ107	5.733	Bacteria	28.399
UP000031521	<i>Celeribacter indicus</i>	4.665	Bacteria	12.550

UP000287239	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	2.859	Bacteria	15.814
UP000018312	<i>Eubacterium</i> sp. CAG:603	2.287	Bacteria	8.055
UP000321933	<i>Parahalaea aestuarii</i>	3.815	Bacteria	12.596
UP000001572	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	4.467	Bacteria	15.904
UP000253175	<i>Blastococcus</i> sp. TF02A-30	3.930	Bacteria	9.753
UP000324678	<i>Agromyces intestinalis</i>	3.349	Bacteria	9.561
UP000001218	<i>Parabacteroides johnsonii</i> CL02T12C29	3.736	Bacteria	15.801
UP000199418	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	4.267	Bacteria	15.070
UP000007517	<i>Blastococcus saxobsidens</i> (strain DD2)	4.791	Bacteria	9.219
UP000295573	<i>Kribbella</i> sp. VKM Ac-2541	7.760	Bacteria	27.788
UP000003627	<i>Vibrio</i> sp. (strain N418)	4.028	Bacteria	13.928
UP000254889	<i>Pseudolabrys taiwanensis</i>	5.199	Bacteria	24.769
UP000018080	<i>Microbacterium</i> sp. TS-1	3.155	Bacteria	6.826
UP000192840	<i>Lentzea albidocapillata</i>	8.155	Bacteria	23.407
UP000053531	<i>Thiomicrospira</i> sp. WB1	2.043	Bacteria	6.535
UP000001570	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	4.260	Bacteria	16.765

UP000001417	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	5.240	Bacteria	18.663
UP000325032	<i>Bacillus safensis</i>	3.746	Bacteria	18.284
UP000271374	<i>Bacillus yapensis</i>	4.414	Bacteria	21.134
UP000016800	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	14.792	Hongo	71.666
UP000015241	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	13.806	Hongo	52.044
UP000017559	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	17.976	Hongo	72.088
UP000016934	<i>Cochliobolus sativus</i>	12.174	Hongo	53.267

B. Anexo: Resultados de péptidos encontrados con PepMultiFinder 2.0. Se destaca la secuencia, organismo, proteína de origen y posición en la proteína

N°	Secuencia	Organismo	Origen	Ubicación
P1	KFLKKLINLKKVYIH G	<i>Adoxophyes honmai entomopoxvirus 'L'</i>	tr R4ZFY4 R4ZFY4_9POXV Leucine rich repeat gene family OS=Adoxophyes honmai entomopoxvirus 'L' OX=1293540 GN=AHEV_007 PE=4 SV=1	318-333
P2	GIFKKTFFALLKKI	<i>Brevibacillus fago Emery</i>	tr S5MBW5 S5MBW5_9CAUD Probable tape measure protein OS=Brevibacillus phage Emery OX=1296660 GN=EMERY_16 PE=3 SV=1	666-678
P3	GGIFKKTFFALLKKI	<i>Brevibacillus fago Emery</i>	tr S5MBW5 S5MBW5_9CAUD Probable tape measure protein OS=Brevibacillus phage Emery OX=1296660 GN=EMERY_16 PE=3 SV=1	665-678
P4	GIFKKTFFALLKKIP	<i>Brevibacillus fago Emery</i>	tr S5MBW5 S5MBW5_9CAUD Probable tape measure protein OS=Brevibacillus phage Emery OX=1296660 GN=EMERY_16 PE=3 SV=1	666-679
P5	FGGIFKKTFFALLKKIP	<i>Brevibacillus fago Emery</i>	tr S5MBW5 S5MBW5_9CAUD Probable tape measure protein OS=Brevibacillus phage Emery OX=1296660 GN=EMERY_16 PE=3 SV=1	664-679
P6	IYFKKPKAKLLKFL N	<i>Ranid herpesvirus 3</i>	tr A0A1X9T572 A0A1X9T572_9VIRU Glucosyltransferase-si motif protein OS=Ranid herpesvirus 3 OX=1987509 PE=4 SV=1	291-306
P7	FNAVKKKLGWHL	<i>Synechococcus fago Bellamy</i>	tr A0A222YX41 A0A222YX41_9CAUD Methyltransferase OS=Synechococcus phage Bellamy OX=2023996 GN=226 PE=4 SV=1	240-252
P8	AVKKKLGWHLITA	<i>Synechococcus fago Bellamy</i>	tr A0A222YX41 A0A222YX41_9CAUD Methyltransferase OS=Synechococcus phage Bellamy OX=2023996 GN=226 PE=4 SV=1	242-255
P9	GGLVIKKLSLIKK	<i>Orpheovirus IHUMI-LCC2</i>	tr A0A2I2L3C8 A0A2I2L3C8_9PHYC F-box domain-containing protein OS=Orpheovirus IHUMI-LCC2 OX=2023057 GN=ORPV_75 PE=4 SV=1	77-89
P10	ILVLKKLKKLIKQ	<i>Orpheovirus IHUMI-LCC2</i>	tr A0A2I2L3E5 A0A2I2L3E5_9PHYC NLI interacting factor-like phosphatase OS=Orpheovirus IHUMI-LCC2 OX=2023057 GN=ORPV_133 PE=4 SV=1	93-105

P11	ILVLKLLKLLIKQLP	<i>Orpheovirus</i> IHUMI-LCC2	tr A0A2I2L3E5 A0A2I2L3E5_9PHYC NLI interacting factor-like phosphatase OS=Orpheovirus IHUMI-LCC2 OX=2023057 GN=ORPV_133 PE=4 SV=1	93-107
P12	LVLKLLKLLIKQLPN	<i>Orpheovirus</i> IHUMI-LCC2	tr A0A2I2L3E5 A0A2I2L3E5_9PHYC NLI interacting factor-like phosphatase OS=Orpheovirus IHUMI-LCC2 OX=2023057 GN=ORPV_133 PE=4 SV=1	94-108
P13	LVLKLLKLLIKQLPN A	<i>Orpheovirus</i> IHUMI-LCC2	tr A0A2I2L3E5 A0A2I2L3E5_9PHYC NLI interacting factor-like phosphatase OS=Orpheovirus IHUMI-LCC2 OX=2023057 GN=ORPV_133 PE=4 SV=1	94-109
P14	FKKIGLVKVRVGTAI S	<i>Orpheovirus</i> IHUMI-LCC2	tr A0A2I2L317 A0A2I2L317_9PHYC Uncharacterized protein OS=Orpheovirus IHUMI-LCC2 OX=2023057 GN=ORPV_3 PE=4 SV=1	291-306
P15	FYKLGKKINAKLHFL	<i>Orpheovirus</i> IHUMI-LCC2	tr A0A2I2L4X9 A0A2I2L4X9_9PHYC Uncharacterized protein OS=Orpheovirus IHUMI-LCC2 OX=2023057 GN=ORPV_680 PE=4 SV=1	31-45
P16	LGAIKKGAAKVASW LG	<i>Pandoravirus</i> <i>neocaledonia</i>	tr A0A2U7UE36 A0A2U7UE36_9VIRU F-box domain containing protein OS=Pandoravirus neocaledonia OX=2107708 GN=pneo_cds_1065 PE=4 SV=1	434-449
P17	VTWFIKGGWKKILA	<i>Xanthomonas</i> phage Xoo-sp14	tr A0A7H0XA71 A0A7H0XA71_9CAUD Uncharacterized protein OS=Xanthomonas phage Xoo-sp14 OX=2769337 GN=Xoosp14_59 PE=4 SV=1	15-28
P18	LWLKAIGKAGYKKV AV	<i>Parabacteroides</i> <i>johnsonii</i> CL02T12C29	tr K5Z8W9 K5Z8W9_9BACT Uncharacterized protein OS=Parabacteroides johnsonii CL02T12C29 OX=999419 GN=HMPREF1077_02707 PE=4 SV=1	108-123
P19	LKKIVYKLRIVGK	<i>Parabacteroides</i> <i>johnsonii</i> CL02T12C29	tr K5YU77 K5YU77_9BACT Uncharacterized protein OS=Parabacteroides johnsonii CL02T12C29 OX=999419 GN=HMPREF1077_03220 PE=3 SV=1	103-116
P20	ALFGVLKLLKWWSLF RK	<i>Parabacteroides</i> <i>johnsonii</i> CL02T12C29	tr K5Z8M9 K5Z8M9_9BACT Glyco_trans_2-like domain-containing protein OS=Parabacteroides johnsonii CL02T12C29 OX=999419 GN=HMPREF1077_02838 PE=4 SV=1	225-240
P21	LPNILFAVKKKGLKK	<i>Parabacteroides</i> <i>johnsonii</i> CL02T12C29	tr K5ZJ71 K5ZJ71_9BACT HTH APSES-type domain-containing protein OS=Parabacteroides johnsonii CL02T12C29 OX=999419 GN=HMPREF1077_01568 PE=4 SV=1	17-31
P22	LPNILFAVKKKGLKK F	<i>Parabacteroides</i> <i>johnsonii</i> CL02T12C29	tr K5ZJ71 K5ZJ71_9BACT HTH APSES-type domain-containing protein OS=Parabacteroides johnsonii CL02T12C29 OX=999419 GN=HMPREF1077_01568 PE=4 SV=1	17-32
P23	GLILKFMAWRKLL FK	<i>Parabacteroides</i> <i>johnsonii</i> CL02T12C29	tr K5ZVU7 K5ZVU7_9BACT Uncharacterized protein OS=Parabacteroides johnsonii CL02T12C29 OX=999419 GN=HMPREF1077_02665 PE=4 SV=1	3-18
P24	IGKNLKKALLYFK	<i>Parabacteroides</i> <i>johnsonii</i> CL02T12C29	tr K5YFP6 K5YFP6_9BACT Uncharacterized protein OS=Parabacteroides johnsonii CL02T12C29 OX=999419 GN=HMPREF1077_01163 PE=4 SV=1	385-397
P25	LRLKIKPLLKLL	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q81I02 Q81I02_BACCR von Willebrand factor type A domain protein OS=Bacillus cereus (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_0624 PE=4 SV=1	610-622
P26	LKIKPLLKLLKLL	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q81I02 Q81I02_BACCR von Willebrand factor type A domain protein OS=Bacillus cereus (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_0624 PE=4 SV=1	612-624

P27	LLLKLLKGYAKRF	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q818N7 Q818N7_BACCR Transcriptional regulator, TetR family OS= <i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_4212 PE=4 SV=1	81-93
P28	FLLHKLLKLLGSKG AK	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q81DX0 Q81DX0_BACCR Uncharacterized protein OS= <i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_2226 PE=4 SV=1	124-139
P29	GIALFWLLKRPLKKL	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q812K0 Q812K0_BACCR Hypothetical Cytosolic Protein OS= <i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_5122 PE=4 SV=1	185-199
P30	ILKKWLAHYAKGLI	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q817E8 Q817E8_BACCR DNA polymerase III subunit alpha OS= <i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_4605 PE=3 SV=1	108-121
P31	GILKKWLAHYAKGL I	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q817E8 Q817E8_BACCR DNA polymerase III subunit alpha OS= <i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_4605 PE=3 SV=1	107-121
P32	GILKKWLAHYAKGL IA	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q817E8 Q817E8_BACCR DNA polymerase III subunit alpha OS= <i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_4605 PE=3 SV=1	107-122
P33	IVHSVGLGKLVVWK	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q813X8 Q813X8_BACCR Hypothetical Cytosolic Protein OS= <i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_0913 PE=4 SV=1	101-113
P34	GVIGKIPLSFVKKVR	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q81C51 Q81C51_BACCR Uncharacterized protein OS= <i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_2930 PE=4 SV=1	156-170
P35	LLKLPLGGKVKVAK L	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q817J3 Q817J3_BACCR DNA-directed DNA polymerase OS= <i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_4553 PE=4 SV=1	93-107
P36	IWKRVLGKVKVGI	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q81DB8 Q81DB8_BACCR Peptide synthetase OS= <i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_2452 PE=3 SV=1	570-582
P37	ILTTIWKRVLGVKK	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q81DB8 Q81DB8_BACCR Peptide synthetase OS= <i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_2452 PE=3 SV=1	566-579
P38	LLKALIALIKKRTH	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q81H81 Q81H81_BACCR Type II restriction-modification system restriction subunit OS= <i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_0940 PE=4 SV=1	245-258
P39	IWSIAKLWNKLLKK	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC	tr Q818N4 Q818N4_BACCR Uncharacterized protein OS= <i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC	65-78

		14579)	15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_4215 PE=4 SV=1	
P40	LSRIIPFIFKGAFKK	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q81EF7 Q81EF7_BACCR Oxidoreductase OS=Bacillus cereus (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_2022 PE=4 SV=1	169-183
P41	LKHIAPVVLKRLFKK I	<i>Bacillus cereus</i> (strain ATCC 14579)	tr Q81FA5 Q81FA5_BACCR Uncharacterized protein OS=Bacillus cereus (strain ATCC 14579 / DSM 31 / CCUG 7414 / JCM 2152 / NBRC 15305 / NCIMB 9373 / NCTC 2599 / NRRL B-3711) OX=226900 GN=BC_1689 PE=4 SV=1	81-96
P42	VLTVGVKAWKFKKL	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	sp P24811 YQXH_BACSU Uncharacterized protein YqxH OS=Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308 GN=yqxH PE=3 SV=1	38-51
P43	LKNVIVQIKKSLKKF	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	sp P40738 YXXE_BACSU Uncharacterized protein YxxE OS=Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308 GN=yxxE PE=4 SV=1	86-100
P44	WLKNVIVQIKKSLK KF	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	sp P40738 YXXE_BACSU Uncharacterized protein YxxE OS=Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308 GN=yxxE PE=4 SV=1	85-100
P45	LFLKAWKLPKGVKIK	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	sp P42977 CCA_BACSU CCA-adding enzyme OS=Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308 GN=cca PE=3 SV=2	268-281
P46	APLFLKAWKLPKGV IK	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	sp P42977 CCA_BACSU CCA-adding enzyme OS=Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308 GN=cca PE=3 SV=2	266-281
P47	IFPLIAKKGVLKRA	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	sp P17620 RIBBA_BACSU Riboflavin biosynthesis protein RibBA OS=Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308 GN=ribBA PE=3 SV=1	125-139
P48	LLVSGVSKKIKKWI	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	sp P40769 YHFN_BACSU Uncharacterized metalloprotease YhfN OS=Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308 GN=yhfN PE=3 SV=2	79-92
P49	LIKGAVPGPKKGVV	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	sp A6TWI2 RL3_ALKMQ 50S ribosomal protein L3 OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=rplC PE=3 SV=1	187-200
P50	ALKLLRKKIINLFHK	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TRI6 A6TRI6_ALKMQ Adenylosuccinate lyase OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_2652 PE=3 SV=1	120-134
P51	GIVILVKKHGGKIIK	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TV32 A6TV32_ALKMQ Uncharacterized protein OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_3963 PE=4 SV=1	45-59
P52	IVILVKKHGGKIIKG A	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TV32 A6TV32_ALKMQ Uncharacterized protein OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_3963 PE=4 SV=1	46-61
P53	ILVKKHGGKIIKGAI N	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TV32 A6TV32_ALKMQ Uncharacterized protein OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_3963 PE=4 SV=1	48-63
P54	LVKKHGGKIIKGAIN V	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TV32 A6TV32_ALKMQ Uncharacterized protein OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_3963 PE=4 SV=1	49-64
P55	LRLFKGSIKAFIK	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TKW0 A6TKW0_ALKMQ Radical SAM domain protein OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_0601 PE=4 SV=1	434-446
P56	VKVWLTKGLKKFAI	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TV47 A6TV47_ALKMQ Peptidase M23B OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_3980 PE=4 SV=1	92-105

P57	FFLKKRVGKLITA	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TT47 A6TT47_ALKMQ Stage 0 sporulation protein A homolog OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_3227 PE=4 SV=1	27-39
P58	IKKALLSLKKNWS	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TNY1 A6TNY1_ALKMQ Uncharacterized protein OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_1723 PE=4 SV=1	14-27
P59	FNIKKIGKYASLK	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TNC9 A6TNC9_ALKMQ Uncharacterized protein OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_1503 PE=4 SV=1	239-252
P60	LLVRKFASKIYKVLAK	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TV66 A6TV66_ALKMQ Uncharacterized protein OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_4002 PE=4 SV=1	173-188
P61	LVRKFASKIYKVLAKA	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TV66 A6TV66_ALKMQ Uncharacterized protein OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_4002 PE=4 SV=1	174-189
P62	VIKLSKAIFRKIK	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TM88 A6TM88_ALKMQ Copper-exporting P-type ATPase OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_1094 PE=3 SV=1	758-770
P63	IGLYLGLGKIKKKV	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	tr A6TKG3 A6TKG3_ALKMQ VanZ family protein OS=Alkaliphilus metalliredigens (strain QYMF) OX=293826 GN=Amet_0453 PE=4 SV=1	141-154
P64	FGLSGKKKIISKIL	<i>Vibrio</i> sp. (strain N418)	tr F9RB97 F9RB97_VIBSN Uncharacterized protein OS=Vibrio sp. (strain N418) OX=701176 GN=VIBRN418_15458 PE=4 SV=1	51-64
P65	GVLKIVKVYLAVKR R	<i>Vibrio</i> sp. (strain N418)	tr F9RCA3 F9RCA3_VIBSN DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Vibrio sp. (strain N418) OX=701176 GN=rpoB PE=3 SV=1	1045-1059
P66	ISILLVHLKKGHLLK K	<i>Vibrio</i> sp. (strain N418)	tr F9RD45 F9RD45_VIBSN tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme MnmG OS=Vibrio sp. (strain N418) OX=701176 GN=mmnG PE=3 SV=1	612-627
P67	NLKKILPAKKIVLLK K	<i>Flavobacterium</i> sp. TAB 87	tr A0A0X7BBS7 A0A0X7BBS7_9FLAO Uncharacterized protein OS=Flavobacterium sp. TAB 87 OX=1729581 GN=AP058_01427 PE=4 SV=1	117-132
P68	LHKVSLFKLLKLL	<i>Flavobacterium</i> sp. TAB 87	tr A0A0X7BDL8 A0A0X7BDL8_9FLAO Putative siderophore transport system ATP-binding protein YusV OS=Flavobacterium sp. TAB 87 OX=1729581 GN=yusV PE=4 SV=1	178-190
P69	GKLLLKGKGFVHSFL K	<i>Flavobacterium</i> sp. TAB 87	tr A0A105TS18 A0A105TS18_9FLAO Uncharacterized protein OS=Flavobacterium sp. TAB 87 OX=1729581 GN=AP058_01941 PE=4 SV=1	103-117
P70	GSLALFKKLIAMFAK H	<i>Flavobacterium</i> sp. TAB 87	tr A0A105TQS2 A0A105TQS2_9FLAO Aminotransferase OS=Flavobacterium sp. TAB 87 OX=1729581 GN=dapL PE=3 SV=1	183-198
P71	LVRFLKKVKLPWL	<i>Flavobacterium</i> sp. TAB 87	tr A0A0X7BEV4 A0A0X7BEV4_9FLAO Uncharacterized protein OS=Flavobacterium sp. TAB 87 OX=1729581 GN=AP058_00694 PE=4 SV=1	18-30
P72	LLAFFKALFYKKRKI	<i>Flavobacterium</i> sp. TAB 87	tr A0A0X7BEM3 A0A0X7BEM3_9FLAO Mycofactocin system glycosyltransferase OS=Flavobacterium sp. TAB 87 OX=1729581 GN=AP058_00504 PE=4 SV=1	204-218
P73	IAKGKIGTAFTIVRK L	<i>Flavobacterium</i> sp. TAB 87	tr A0A105TR10 A0A105TR10_9FLAO NTE family protein RssA OS=Flavobacterium sp. TAB 87 OX=1729581 GN=rssA PE=4 SV=1	636-651

P74	LLVKVSFWLKKK	<i>Flavobacterium</i> sp. TAB 87	tr A0A0X7B816 A0A0X7B816_9FLAO Arsenical-resistance protein OS=Flavobacterium sp. TAB 87 OX=1729581 GN=AP058_02687 PE=3 SV=1	328-339
P75	FKRILKKVISYL	<i>Flavobacterium</i> sp. TAB 87	tr A0A0X7BFM2 A0A0X7BFM2_9FLAO Methyltransferase, FkbM family OS=Flavobacterium sp. TAB 87 OX=1729581 GN=AP058_00487 PE=4 SV=1	3-14
P76	FKRILKKVISYLIP	<i>Flavobacterium</i> sp. TAB 87	tr A0A0X7BFM2 A0A0X7BFM2_9FLAO Methyltransferase, FkbM family OS=Flavobacterium sp. TAB 87 OX=1729581 GN=AP058_00487 PE=4 SV=1	3-16
P77	IVKKYKAIGKGL	<i>Pseudolabrys taiwanensis</i>	tr A0A346A1S5 A0A346A1S5_9HYPH Glutamate synthase large subunit OS=Pseudolabrys taiwanensis OX=331696 GN=DW352_22935 PE=3 SV=1	748-760
P78	KLNLIPKLVKKW	<i>Pseudolabrys taiwanensis</i>	tr A0A345ZSM3 A0A345ZSM3_9HYPH ABC transporter substrate-binding protein OS=Pseudolabrys taiwanensis OX=331696 GN=DW352_04930 PE=3 SV=1	76-87
P79	VKKFPRLAKLI	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A431W677 A0A431W677_9BACI Alpha/beta hydrolase OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=EKG37_11850 PE=4 SV=1	137-148
P80	VKKFPRLAKLIS	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A431W677 A0A431W677_9BACI Alpha/beta hydrolase OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=EKG37_11850 PE=4 SV=1	137-149
P81	LIGLVYAWKKKVLK	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A431WC85 A0A431WC85_9BACI NADH-quinone oxidoreductase subunit A OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=nuoA PE=3 SV=1	109-122
P82	LIGLVYAWKKKVLK W	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A431WC85 A0A431WC85_9BACI NADH-quinone oxidoreductase subunit A OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=nuoA PE=3 SV=1	109-123
P83	LIGLVYAWKKKVLK WI	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A431WC85 A0A431WC85_9BACI NADH-quinone oxidoreductase subunit A OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=nuoA PE=3 SV=1	109-124
P84	IKKQIPKIKFLF	<i>Bacillus yapensis</i>	>tr A0A431W3S0 A0A431W3S0_9BACI Uncharacterized protein OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=EKG37_14180 PE=4 SV=1	151-163
P85	LKLIAKNITKKIK	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A431VV79 A0A431VV79_9BACI Chaperone protein HtpG OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=htpG PE=3 SV=1	350-362
P86	VFGKKMSLFKKII	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A431WIX5 A0A431WIX5_9BACI Nodulation protein NfeD OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=EKG37_05435 PE=4 SV=1	332-344
P87	VKVFGKKMSLFKKII	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A431WIX5 A0A431WIX5_9BACI Nodulation protein NfeD OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=EKG37_05435 PE=4 SV=1	330-344
P88	GFYGLAKKLIKV	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A431W2D0 A0A431W2D0_9BACI EamA family transporter RarD OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=rarD PE=3 SV=1	166-177
P89	FGFYGLAKKLIK	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A431W2D0 A0A431W2D0_9BACI EamA family transporter RarD OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=rarD PE=3 SV=1	165-176
P90	LLGKKQIFLSFFKKI	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A3S0K632 A0A3S0K632_9BACI Undecaprenyl/decaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyl 1-phosphate transferase OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=EKG37_02255 PE=4 SV=1	333-347
P91	LGKKQIFLSFFKKIL	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A3S0K632 A0A3S0K632_9BACI Undecaprenyl/decaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyl 1-phosphate transferase OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=EKG37_02255 PE=4 SV=1	334-348
P92	GLLGGKKQIFLSFFKKI	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A3S0K632 A0A3S0K632_9BACI Undecaprenyl/decaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyl 1-phosphate transferase OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=EKG37_02255 PE=4 SV=1	332-347

P93	FIKKILKALLKK	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A3S0INL8 A0A3S0INL8_9BACI XRE family transcriptional regulator OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=EKG37_17420 PE=4 SV=1	29-40
P94	AIKKFIKKILKALLK	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A3S0INP3 A0A3S0INP3_9BACI Uncharacterized protein OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=EKG37_17665 PE=4 SV=1	25-39
P95	IKKILKALLKKL	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A3S0INL8 A0A3S0INL8_9BACI XRE family transcriptional regulator OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=EKG37_17420 PE=4 SV=1	30-41
P96	IPLLVWAWRKLLKK	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A3S0IMP3 A0A3S0IMP3_9BACI Cytochrome ubiquinol oxidase subunit I OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=EKG37_04320 PE=3 SV=1	336-349
P97	IWQLLAPKLGKLFK	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A431WLK3 A0A431WLK3_9BACI 6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=EKG37_00995 PE=3 SV=1	240-253
P98	WQLLAPKLGKLFKI	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A431WLK3 A0A431WLK3_9BACI 6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=EKG37_00995 PE=3 SV=1	241-254
P99	IWKLLNQPVLKKV	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A3S0IH06 A0A3S0IH06_9BACI Cytochrome c oxidase assembly factor CtaG OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=ctaG PE=4 SV=1	102-115
P100	WIWKLLNQPVLKK VF	<i>Bacillus yapensis</i>	tr A0A3S0IH06 A0A3S0IH06_9BACI Cytochrome c oxidase assembly factor CtaG OS=Bacillus yapensis OX=2492960 GN=ctaG PE=4 SV=1	101-116
P101	VLLSHLLKKLPK	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	tr A0A429ZTN9 A0A429ZTN9_9ENTE PTS fructose transporter subunit IIC OS=Vagococcus salmoninarum OX=2739 GN=CBF35_03530 PE=4 SV=1	237-248
P102	LIGKLQPIWKAF	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	tr A0A429ZN84 A0A429ZN84_9ENTE Carbohydrate kinase OS=Vagococcus salmoninarum OX=2739 GN=CBF35_08105 PE=3 SV=1	487-498
P103	GWKKALHIVKITV	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	tr A0A429ZNE1 A0A429ZNE1_9ENTE Alpha/beta hydrolase OS=Vagococcus salmoninarum OX=2739 GN=CBF35_08510 PE=4 SV=1	8-20
P104	VIGKFKFLVPK KING K	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	tr A0A429ZM10 A0A429ZM10_9ENTE GH18 domain-containing protein OS=Vagococcus salmoninarum OX=2739 GN=CBF35_09410 PE=4 SV=1	378-393
P105	VNKILPKKALKA	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	tr A0A429ZVZ6 A0A429ZVZ6_9ENTE PTS galactitol transporter subunit IIC OS=Vagococcus salmoninarum OX=2739 GN=CBF35_00945 PE=4 SV=1	434-445
P106	VPLFFLAWKKISKKF	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	tr A0A429ZBE4 A0A429ZBE4_9ENTE DUF2179 domain-containing protein OS=Vagococcus salmoninarum OX=2739 GN=CBF35_14855 PE=4 SV=1	75-89
P107	FFLAWKKISKKFTIF	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	tr A0A429ZBE4 A0A429ZBE4_9ENTE DUF2179 domain-containing protein OS=Vagococcus salmoninarum OX=2739 GN=CBF35_14855 PE=4 SV=1	78-92
P108	IAGFLSRWILIKK	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	tr A0A429ZVG6 A0A429ZVG6_9ENTE Arsenical-resistance protein OS=Vagococcus salmoninarum OX=2739 GN=CBF35_00280 PE=3 SV=1	201-214
P109	FGKKALRVISVGFK	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	tr A0A429ZGJ2 A0A429ZGJ2_9ENTE Magnesium-transporting ATPase OS=Vagococcus salmoninarum OX=2739 GN=CBF35_12800 PE=4 SV=1	471-484

P110	FLAWKWRKLIWL	<i>Kribbella</i> sp. VKM Ac-2541	tr A0A4R2IQA0 A0A4R2IQA0_9ACTN Uncharacterized protein DUF2784 OS= <i>Kribbella</i> sp. VKM Ac-2541 OX=2512217 GN=EV646_107233 PE=4 SV=1	26-37
P111	LKIALPKRWAKLLF	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i> <i>s</i>	tr A0A4R3KQ17 A0A4R3KQ17_9SPHI Uncharacterized protein DUF2752 OS= <i>Anseongella ginsenosidimutans</i> OX=496056 GN=EDD80_10787 PE=4 SV=1	5-18
P112	LKKKLAKLFLPI	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i> <i>s</i>	tr A0A4R3KUL2 A0A4R3KUL2_9SPHI C-terminal processing protease CtpA/Prc OS= <i>Anseongella ginsenosidimutans</i> OX=496056 GN=EDD80_102300 PE=4 SV=1	72-83
P113	LIAWKLLRKKLGF	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i> <i>s</i>	tr A0A4R3KUN1 A0A4R3KUN1_9SPHI Putative AlkP superfamily pyrophosphatase or phosphodiesterase OS= <i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutans</i> OX=496056 GN=EDD80_103239 PE=4 SV=1	386-398
P114	GLKKGLKAYWAFV L	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i> <i>s</i>	tr A0A4R3KMM6 A0A4R3KMM6_9SPHI Glycosyltransferase involved in cell wall biosynthesis OS= <i>Anseongella ginsenosidimutans</i> OX=496056 GN=EDD80_11114 PE=4 SV=1	149-162
P115	GFVYIIKKGALKW	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i> <i>s</i>	tr A0A4R3KUR9 A0A4R3KUR9_9SPHI NADH-quinone oxidoreductase subunit A OS= <i>Anseongella ginsenosidimutans</i> OX=496056 GN=nuoA PE=3 SV=1	110-122
P116	AKIALFKTLAKGIRG	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i> <i>s</i>	tr A0A4R3KQZ0 A0A4R3KQZ0_9SPHI 8-amino-7-oxononanoate synthase OS= <i>Anseongella ginsenosidimutans</i> OX=496056 GN=EDD80_105166 PE=3 SV=1	294-308
P117	ISGVFKWLIRLKGKA	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i> <i>s</i>	tr A0A4R3KNB3 A0A4R3KNB3_9SPHI N-carbamoyl-L-amino-acid hydrolase OS= <i>Anseongella ginsenosidimutans</i> OX=496056 GN=EDD80_11235 PE=3 SV=1	243-257
P118	ALKKAWWLFKAI	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i> <i>s</i>	tr A0A4R3KQS7 A0A4R3KQS7_9SPHI L-proline dehydrogenase OS= <i>Anseongella ginsenosidimutans</i> OX=496056 GN=EDD80_107112 PE=4 SV=1	16-27
P119	GTFKLVNLGKKKAK VV	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i> <i>s</i>	tr A0A4R3KV29 A0A4R3KV29_9SPHI Mannose-6-phosphate isomerase class I OS= <i>Anseongella ginsenosidimutans</i> OX=496056 GN=EDD80_10464 PE=4 SV=1 MFKHLDITLWEQMTMKKETASGMTDQAAPGRKDQTAGMRKT TQPALPLQREKREREGY	601-616
P120	VNLGKKKAKVVKA FVK	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i> <i>s</i>	tr A0A4R3KV29 A0A4R3KV29_9SPHI Mannose-6-phosphate isomerase class I OS= <i>Anseongella ginsenosidimutans</i> OX=496056 GN=EDD80_10464 PE=4 SV=1	606-621
P121	VGANLKKWLKGKL F	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i> <i>s</i>	tr A0A4V2UTK4 A0A4V2UTK4_9SPHI Putative PurR-regulated permease PerM OS= <i>Anseongella ginsenosidimutans</i> OX=496056 GN=EDD80_10719 PE=3 SV=1	194-207
P122	VGANLKKWLKGKL FA	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i> <i>s</i>	tr A0A4V2UTK4 A0A4V2UTK4_9SPHI Putative PurR-regulated permease PerM OS= <i>Anseongella ginsenosidimutans</i> OX=496056 GN=EDD80_10719 PE=3 SV=1	194-208
P123	VLNKVGANLKKWL KGK	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i> <i>s</i>	tr A0A4V2UTK4 A0A4V2UTK4_9SPHI Putative PurR-regulated permease PerM OS= <i>Anseongella ginsenosidimutans</i> OX=496056 GN=EDD80_10719 PE=3 SV=1	190-205
P124	WKVIWTLLKKT	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i> <i>s</i>	tr A0A4V2UT86 A0A4V2UT86_9SPHI Uncharacterized protein OS= <i>Anseongella ginsenosidimutans</i> OX=496056 GN=EDD80_1185 PE=4 SV=1	304-315
P125	VGANLKKWLKGKL F	<i>Anseongella</i> <i>ginsenosidimutan</i>	tr A0A4V2UTK4 A0A4V2UTK4_9SPHI Putative PurR-regulated permease PerM OS= <i>Anseongella ginsenosidimutans</i> OX=496056	194-207

		<i>s</i>	GN=EDD80_10719 PE=3 SV=1	
P126	VGANLKKWLKGKLF FA	<i>Anseongella ginsenosidimutans</i>	tr A0A4V2UTK4 A0A4V2UTK4_9SPHI Putative PurR-regulated permease PerM OS=Anseongella ginsenosidimutans OX=496056 GN=EDD80_10719 PE=3 SV=1	194-208
P127	VLNKVGANLKKWL K GK	<i>Anseongella ginsenosidimutans</i>	tr A0A4V2UTK4 A0A4V2UTK4_9SPHI Putative PurR-regulated permease PerM OS=Anseongella ginsenosidimutans OX=496056 GN=EDD80_10719 PE=3 SV=1	190-205
P128	GWAKKVVLKTAVW	<i>Microbacterium</i> sp. TS-1	tr U2XCE6 U2XCE6_9MICO Putative glycosyl transferase OS=Microbacterium sp. TS-1 OX=1344956 GN=MTS1_03472 PE=4 SV=1	135-147
P129	VLVYFWKKITRIIGR W	<i>Microbacterium</i> sp. TS-1	tr U2XI71 U2XI71_9MICO Undecaprenyl-diphosphatase OS=Microbacterium sp. TS-1 OX=1344956 GN=uppP PE=3 SV=1	56-71
P130	IFLKLKAGLAYKK	<i>Eubacterium</i> sp. CAG:603	tr R5NMZ1 R5NMZ1_9FIRM Leucine--tRNA ligase OS=Eubacterium sp. CAG:603 OX=1262891 GN=leuS PE=3 SV=1	144-157
P131	KFWPKFIKLLVK	<i>Eubacterium</i> sp. CAG:603	tr R5NH98 R5NH98_9FIRM Glyco_trans_2-like domain-containing protein OS=Eubacterium sp. CAG:603 OX=1262891 GN=BN730_00336 PE=4 SV=1	237-249
P132	FRKFWPKFIKLLV	<i>Eubacterium</i> sp. CAG:603	tr R5NH98 R5NH98_9FIRM Glyco_trans_2-like domain-containing protein OS=Eubacterium sp. CAG:603 OX=1262891 GN=BN730_00336 PE=4 SV=1	235-248
P133	KILLKTVWVVLKCK	<i>Eubacterium</i> sp. CAG:603	tr R5P449 R5P449_9FIRM Bac_transf domain-containing protein OS=Eubacterium sp. CAG:603 OX=1262891 GN=BN730_00666 PE=3 SV=1	466-479
P134	WTKKIFAFKAKFF	<i>Eubacterium</i> sp. CAG:603	tr R5P436 R5P436_9FIRM Capsular biosynthesis protein OS=Eubacterium sp. CAG:603 OX=1262891 GN=BN730_00656 PE=4 SV=1	251-264
P135	IKGVKLLKAWLI	<i>Eubacterium</i> sp. CAG:603	tr R5P0S7 R5P0S7_9FIRM HTH gntR-type domain-containing protein OS=Eubacterium sp. CAG:603 OX=1262891 GN=BN730_02214 PE=3 SV=1	451-464
P136	IKGLKSFKIKVY	<i>Eubacterium</i> sp. CAG:603	tr R5P2R3 R5P2R3_9FIRM RNA methyltransferase TrmA family OS=Eubacterium sp. CAG:603 OX=1262891 GN=BN730_00750 PE=3 SV=1	181-193
P137	IKKFPGLKTLWLKVF	<i>Thiomicrospira</i> sp. WB1	tr A0A0X3TAL3 A0A0X3TAL3_9GAMM VWFA domain-containing protein OS=Thiomicrospira sp. WB1 OX=1685380 GN=AVO41_02565 PE=4 SV=1	298-312
P138	AIKKFPGLKTLWLK VF	<i>Thiomicrospira</i> sp. WB1	tr A0A0X3TAL3 A0A0X3TAL3_9GAMM VWFA domain-containing protein OS=Thiomicrospira sp. WB1 OX=1685380 GN=AVO41_02565 PE=4 SV=1	297-312
P139	VPLFKKLAQKFIG	<i>Thiomicrospira</i> sp. WB1	tr A0A0X3T751 A0A0X3T751_9GAMM Uncharacterized protein OS=Thiomicrospira sp. WB1 OX=1685380 GN=AVO41_08485 PE=4 SV=1	477-489
P140	VILGRFVKLFPKGGK	<i>Terrimicrobium sacchariphilum</i>	tr A0A146G3A0 A0A146G3A0_TERSA DNA-3-methyladenine glycosylase II OS=Terrimicrobium sacchariphilum OX=690879 GN=TSACC_2518 PE=4 SV=1	61-74
P141	ILGRFVKLFPKGGK	<i>Terrimicrobium sacchariphilum</i>	tr A0A146G3A0 A0A146G3A0_TERSA DNA-3-methyladenine glycosylase II OS=Terrimicrobium sacchariphilum OX=690879 GN=TSACC_2518 PE=4 SV=1	62-75

P142	ALFGLKKKVRTIF	<i>Terrimicrobium sacchariphilum</i>	tr A0A146GB47 A0A146GB47_TERSA Anti-sigma factor antagonist OS=Terrimicrobium sacchariphilum OX=690879 GN=TSACC_23053 PE=3 SV=1	76-88
P143	FGGKIALFGLKKKV	<i>Terrimicrobium sacchariphilum</i>	tr A0A146GB47 A0A146GB47_TERSA Anti-sigma factor antagonist OS=Terrimicrobium sacchariphilum OX=690879 GN=TSACC_23053 PE=3 SV=1	71-84
P144	IVSKIKKKIYPLL	<i>Proteiniphilum saccharofermentans</i>	tr A0A1R3SX62 A0A1R3SX62_9BACT Thiol reductant ABC exporter OS=Proteiniphilum saccharofermentans OX=1642647 GN=PSM36_0723 PE=4 SV=1	90-102
P145	IFIAVKSGIKKKIK	<i>Proteiniphilum saccharofermentans</i>	tr A0A1R3T7B0 A0A1R3T7B0_9BACT Uncharacterized protein OS=Proteiniphilum saccharofermentans OX=1642647 GN=PSM36_3190 PE=4 SV=1	65-78
P146	VKAIKKWLPGIKA	<i>Proteiniphilum saccharofermentans</i>	tr A0A1R3T9W3 A0A1R3T9W3_9BACT Putative membrane protein OS=Proteiniphilum saccharofermentans OX=1642647 GN=PSM36_3293 PE=4 SV=1	3-16
P147	IHKWLPGIKAFFST	<i>Proteiniphilum saccharofermentans</i>	tr A0A1R3T9W3 A0A1R3T9W3_9BACT Putative membrane protein OS=Proteiniphilum saccharofermentans OX=1642647 GN=PSM36_3293 PE=4 SV=1	6-20
P148	LKKIFFRLGHKIL	<i>Proteiniphilum saccharofermentans</i>	tr A0A1R3T5H3 A0A1R3T5H3_9BACT Putative glycosyl transferases 1 OS=Proteiniphilum saccharofermentans OX=1642647 GN=PSM36_1709 PE=4 SV=1	132-144
P149	FGKPVLPQVFKALAK	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7WMB9 A0A1H7WMB9_9FIRM Uncharacterized protein OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_12946 PE=4 SV=1	53-66
P150	IKKFGKPVLPQVFKAL	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7WMB9 A0A1H7WMB9_9FIRM Uncharacterized protein OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_12946 PE=4 SV=1	50-64
P151	GIKKFGKPVLPQVFKAL	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7WMB9 A0A1H7WMB9_9FIRM Uncharacterized protein OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_12946 PE=4 SV=1	49-64
P152	IKKFGKPVLPQVFKALA	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7WMB9 A0A1H7WMB9_9FIRM Uncharacterized protein OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_12946 PE=4 SV=1	50-65
P153	FLGAGKTTLIKLLK	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7R6I1 A0A1H7R6I1_9FIRM GTPase, G3E family OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_11248 PE=4 SV=1	10-24
P154	INPIKKLGSIFKK	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7TKN3 A0A1H7TKN3_9FIRM O-acetyl-ADP-ribose deacetylase (Regulator of RNase III), contains Macro domain OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_11920 PE=4 SV=1	240-252
P155	INILKFSKKLFGKKF	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7U893 A0A1H7U893_9FIRM Uncharacterized protein OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_12121 PE=4 SV=1	196-210
P156	ILKFSKKLFGKKFSII	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7U893 A0A1H7U893_9FIRM Uncharacterized protein OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_12121 PE=4 SV=1	198-213
P157	AVWLLKTFLKKVK	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7KZR7 A0A1H7KZR7_9FIRM Formate acetyltransferase OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_10471 PE=3 SV=1	575-587

P158	IAVWLLKTFLLKVK K	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7KZR7 A0A1H7KZR7_9FIRM Formate acetyltransferase OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_10471 PE=3 SV=1	574-588
P159	VLKGFWKSFKLNFK	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7RGP1 A0A1H7RGP1_9FIRM Uncharacterized membrane protein YesL OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_11329 PE=4 SV=1	60-73
P160	VISKLIKVGKKF	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7GEZ8 A0A1H7GEZ8_9FIRM Cell shape-determining protein MreB OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=mreB PE=3 SV=1	170-182
P161	GIVISKLIKVGKK	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7GEZ8 A0A1H7GEZ8_9FIRM Cell shape-determining protein MreB OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=mreB PE=3 SV=1	168-181
P162	LKGIVISKLIKVGKK K	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7GEZ8 A0A1H7GEZ8_9FIRM Cell shape-determining protein MreB OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=mreB PE=3 SV=1	166-181
P163	AFQKKLISIILKK	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7NX05 A0A1H7NX05_9FIRM Uncharacterized protein OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_10852 PE=4 SV=1	156-168
P164	VLIKKIKSSLRKVF	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7P8S7 A0A1H7P8S7_9FIRM Histidine kinase OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_108139 PE=4 SV=1	161-174
P165	GAFKKINKKAVIKV	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7PL26 A0A1H7PL26_9FIRM Surface protein OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_10939 PE=4 SV=1	514-527
P166	LVKGAIPGPKKGLV	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7Z3C0 A0A1H7Z3C0_9FIRM 50S ribosomal protein L3 OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=rpL3 PE=3 SV=1	204-217
P167	LIKRLFATVKKLFH	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7UWH8 A0A1H7UWH8_9FIRM Uncharacterized protein OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_12348 PE=4 SV=1	141-154
P168	LIKRLFATVKKLFHG	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7UWH8 A0A1H7UWH8_9FIRM Uncharacterized protein OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_12348 PE=4 SV=1	141-155
P169	ILLKKLHGLILGK GK	<i>Butyrivibrio</i> sp. Ob235	tr A0A1H7PJC7 A0A1H7PJC7_9FIRM Membrane-bound acyltransferase YfiQ, involved in biofilm formation OS=Butyrivibrio sp. ob235 OX=1761780 GN=SAMN04487770_10921 PE=4 SV=1	369-383
P170	VLWKKVLPKLSA	<i>Blastococcus</i> sp. TF02A-30	tr A0A367A4V0 A0A367A4V0_9ACTN DNA topoisomerase 1 OS=Blastococcus sp. TF02A-30 OX=2250580 GN=topA PE=3 SV=1	197-208
P171	GVISKLYKGLQGLV KA	<i>Blastococcus</i> sp. TF02A-30	tr A0A367A7Z4 A0A367A7Z4_9ACTN Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Blastococcus sp. TF02A-30 OX=2250580 GN=lpdA PE=3 SV=1	92-107
P172	ISGVFKWKVKLIGK	<i>Alteromonadaceae</i> <i>e bacterium</i>	tr A0A559QRC5 A0A559QRC5_9ALTE N-carbamoyl-L-amino-acid hydrolase OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_4862 PE=3 SV=1	210-223
P173	ISGVFKWKVKLIGK A	<i>Alteromonadaceae</i> <i>e bacterium</i>	tr A0A559QRC5 A0A559QRC5_9ALTE N-carbamoyl-L-amino-acid hydrolase OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_4862 PE=3 SV=1	210-224
P174	GISGVFKWKVKLIG KA	<i>Alteromonadaceae</i> <i>e bacterium</i>	tr A0A559QRC5 A0A559QRC5_9ALTE N-carbamoyl-L-amino-acid hydrolase OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_4862 PE=3 SV=1	209-224
P175	VNIAIKPVKKKLLK	<i>Alteromonadaceae</i> <i>e bacterium</i>	tr A0A559QTG6 A0A559QTG6_9ALTE Uncharacterized protein OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_0466 PE=4 SV=1	224-236
P176	VNIAIKPVKKKLLKF	<i>Alteromonadaceae</i> <i>e bacterium</i>	tr A0A559QTG6 A0A559QTG6_9ALTE Uncharacterized protein OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320	224-237

			GN=P886_0466 PE=4 SV=1	
P177	VVGKWWAKSASKL	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	tr A0A559QI86 A0A559QI86_9ALTE Small conductance mechanosensitive channel OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_1927 PE=3 SV=1	31-43
P178	GVLKIVKVYLAIKRR	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	tr A0A559QK66 A0A559QK66_9ALTE DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=rpoB PE=3 SV=1	1062-1076
P179	VILKFSWLKRLK	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	tr A0A559QPB5 A0A559QPB5_9ALTE Na ⁺ /proline symporter OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_4118 PE=3 SV=1	588-599
P180	IKFPLLKVASKLIQK	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	tr A0A559QS69 A0A559QS69_9ALTE Putative AlkP superfamily pyrophosphatase or phosphodiesterase OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_0049 PE=4 SV=1	390-404
P181	FWIFLLSKKKKI	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	tr A0A559QUL4 A0A559QUL4_9ALTE Uncharacterized protein OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_0854 PE=4 SV=1	17-28
P182	LLIYLKKRGLLKKA	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	tr A0A559QUX5 A0A559QUX5_9ALTE tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme MnmG OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=mmnG PE=3 SV=1	612-626
P183	IKLTLKKWRL	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	tr A0A559QSE5 A0A559QSE5_9ALTE Uncharacterized protein OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_0048 PE=4 SV=1	176-187
P184	LFALVKGAFKPIRK	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	tr A0A559QR07 A0A559QR07_9ALTE Polyketide synthase PksN OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_4743 PE=3 SV=1	1061-1074
P185	FALVKGAFKPIRKL	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	tr A0A559QR07 A0A559QR07_9ALTE Polyketide synthase PksN OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_4743 PE=3 SV=1	1062-1075
P186	GLKRALTLFKWI	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	tr A0A559QL59 A0A559QL59_9ALTE Chemotaxis protein MotA OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_2991 PE=3 SV=1	55-66
P187	LKRALTLFKWIFK	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	tr A0A559QL59 A0A559QL59_9ALTE Chemotaxis protein MotA OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_2991 PE=3 SV=1	56-68
P188	LGKIIFSRACKFV	<i>Alteromonadaceae bacterium</i>	tr A0A559QMG4 A0A559QMG4_9ALTE Diguanylate cyclase (GGDEF)-like protein OS=Alteromonadaceae bacterium 2753L.S.0a.02 OX=1403320 GN=P886_3456 PE=4 SV=1	104-116
P189	WLKPTVLRLLKGL	<i>Celeribacter indicus</i>	tr A0A0B5DM39 A0A0B5DM39_9RHOB Lipopolysaccharide biosynthesis protein-like protein OS=Celeribacter indicus OX=1208324 GN=P73_0013 PE=4 SV=1	304-316
P190	WVGLKLGKRTAVL	<i>Celeribacter indicus</i>	tr A0A0B5DZX8 A0A0B5DZX8_9RHOB Uncharacterized protein OS=Celeribacter indicus OX=1208324 GN=P73_3859 PE=4 SV=1	389-401
P191	IKGFVASVKKPANL K	<i>Celeribacter indicus</i>	tr A0A0B5EBE5 A0A0B5EBE5_9RHOB ATP-binding region ATPase domain protein OS=Celeribacter indicus OX=1208324 GN=P73_4807 PE=4 SV=1	60-74
P192	IFFGKLKLPVIKKT	<i>Herbaspirillum</i> sp. SJZ107	tr A0A542LNR5 A0A542LNR5_9BURK DNA polymerase I OS=Herbaspirillum sp. SJZ107 OX=2572881 GN=polA PE=3 SV=1	589-602

P193	GLFLGWVSKKVSVK	<i>Kitasatospora atroaurantiaca</i>	tr A0A561EJP8 A0A561EJP8_9ACTN Amino acid ABC transporter membrane protein 1 (PAAT family) OS=Kitasatospora atroaurantiaca OX=285545 GN=FB465_0744 PE=3 SV=1	207-220
P194	LIPGLGKKKLAKLA A	<i>Kitasatospora atroaurantiaca</i>	tr A0A561EVJ1 A0A561EVJ1_9ACTN Site-specific recombinase XerD OS=Kitasatospora atroaurantiaca OX=285545 GN=FB465_4746 PE=4 SV=1	111-125
P195	AFGVARKLKKTAVL VK	<i>Kitasatospora atroaurantiaca</i>	tr A0A561EWL9 A0A561EWL9_9ACTN 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase OS=Kitasatospora atroaurantiaca OX=285545 GN=FB465_5150 PE=4 SV=1	503-518
P196	LLSVKKWVLRKV	<i>Parahalaea aestuarii</i>	tr A0A5C8ZNI7 A0A5C8ZNI7_9GAMM Phytanoyl-CoA dioxygenase family protein OS=Parahalaea aestuarii OX=1852021 GN=FVW59_15745 PE=4 SV=1	208-219
P197	GVLKIVKVYLAIKRR	<i>Parahalaea aestuarii</i>	tr A0A5C9A3K2 A0A5C9A3K2_9GAMM DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Parahalaea aestuarii OX=1852021 GN=rpoB PE=3 SV=1	1062-1076
P198	LAKLIKKFLLPPK	<i>Parahalaea aestuarii</i>	tr A0A5C8ZXU7 A0A5C8ZXU7_9GAMM DUF4145 domain-containing protein OS=Parahalaea aestuarii OX=1852021 GN=FVW59_06155 PE=4 SV=1	36-48
P199	IGKRIKKYIVWL	<i>Bacillus safensis</i>	tr A0A1L6ZF08 A0A1L6ZF08_BACIA Sulfur relay protein TusF OS=Bacillus safensis OX=561879 GN=tuaF PE=4 SV=1	8-20
P200	FSKAFGWVKKIF	<i>Bacillus safensis</i>	tr A0A5C0WJ85 A0A5C0WJ85_BACIA SLT domain-containing protein OS=Bacillus safensis OX=561879 GN=yqbo PE=4 SV=1	812-823
P201	FKLAFKAILS RKWF	<i>Bacillus safensis</i>	tr A0A5C0WEP3 A0A5C0WEP3_BACIA Uncharacterized protein OS=Bacillus safensis OX=561879 GN=FX981_00811 PE=4 SV=1	3-16
P202	FFSGLIGRLGKKLTL K	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8EZI1 S8EZI1_FOMPI RNA polymerase II holoenzyme cyclin-like subunit OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1025969 PE=3 SV=1	44-59
P203	FLKGVSIYLLKHL	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8DMV1 S8DMV1_FOMPI Aminopeptidase OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1169421 PE=3 SV=1	437-449
P204	VLTKAALKALS KVK KL	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8E3C1 S8E3C1_FOMPI Uncharacterized protein OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1050772 PE=4 SV=1	301-316
P205	VLRILKGAVKGYLK	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8DSA7 S8DSA7_FOMPI DNA_MISMATCH_REPAIR_2 domain-containing protein OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1170017 PE=3 SV=1	1002-1015
P206	GLLKKLLVWKAKA	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8DLD0 S8DLD0_FOMPI Uncharacterized protein OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1170428 PE=4 SV=1	367-379
P207	LLKLLVWKAKAKL	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8DLD0 S8DLD0_FOMPI Uncharacterized protein OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1170428 PE=4 SV=1	368-381
P208	GLLKKLLVWKAKA KL	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8DLD0 S8DLD0_FOMPI Uncharacterized protein OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1170428 PE=4 SV=1	367-381
P209	VVIKVLKPIAKKK	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8E933 S8E933_FOMPI Protein kinase domain-containing protein OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1023460 PE=3 SV=1	58-70

P210	VIKVLKPIAKKKI	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8E933 S8E933_FOMPI Protein kinase domain-containing protein OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1023460 PE=3 SV=1	59-71
P211	VVIKVLKPIAKKKIK	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8E933 S8E933_FOMPI Protein kinase domain-containing protein OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1023460 PE=3 SV=1	58-72
P212	VAKVLYGLAAKGLK K	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8FKC8 S8FKC8_FOMPI Succinate-semialdehyde dehydrogenase OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1024502 PE=3 SV=1	281-295
P213	VLRILKGAVKGYLK	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8EWV2 S8EWV2_FOMPI DNA mismatch repair protein OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1134950 PE=3 SV=1	1238-1251
P214	LFIKIVKKISKRL	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8DY39 S8DY39_FOMPI RNA cytidine acetyltransferase OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=NAT10 PE=3 SV=1	903-915
P215	IKKKKLAIVLAVTR	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8F6H4 S8F6H4_FOMPI ATP-dependent DNA helicase II subunit 1 OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_73664 PE=3 SV=1	432-445
P216	AVKKGIIKPIVAW	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8F2S2 S8F2S2_FOMPI ATP citrate synthase (Fragment) OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1136654 PE=4 SV=1	383-396
P217	AVKKGIIKPIVAWA	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8F2S2 S8F2S2_FOMPI ATP citrate synthase (Fragment) OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1136654 PE=4 SV=1	383-397
P218	FLPLLKGVAKKI	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8F6H1 S8F6H1_FOMPI Uncharacterized protein (Fragment) OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1105453 PE=4 SV=1	127-139
P219	AFLPLLKGVAKKI	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8F6H1 S8F6H1_FOMPI Uncharacterized protein (Fragment) OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1105453 PE=4 SV=1	126-139
P220	WLGALVKKFAKPHV L	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8FSW9 S8FSW9_FOMPI Uncharacterized protein OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1021981 PE=4 SV=1	189-203
P221	IKKFGTALSVIKKF	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8F808 S8F808_FOMPI Uncharacterized protein OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1127882 PE=4 SV=1	119-132
P222	LKKLSAAFKKLVA	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8EFM0 S8EFM0_FOMPI Phosphoacetylglucosamine mutase OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_1141107 PE=3 SV=1	192-204
P223	VIKRFVLHAKKTAF	<i>Fomitopsis pinicola</i> (strain FP-58527)	tr S8F9M0 S8F9M0_FOMPI Uncharacterized protein (Fragment) OS=Fomitopsis pinicola (strain FP-58527) OX=743788 GN=FOMPIDRAFT_59111 PE=4 SV=1	13-26
P224	FLKKIISLRGAKA	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0E2V0 S0E2V0_GIBF5 Related to KAP122 Member of the karyopherin-beta family, nuclear import OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_07939 PE=3 SV=1	966-978
P225	VIVRLFVFKRYLK	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0EKU2 S0EKU2_GIBF5 Probable potassium transporter TRK-1 OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_07939 PE=3 SV=1	52-64

		CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	6831) OX=1279085 GN=FFUJ_11478 PE=3 SV=1	
P226	GVQIIHKILSKLRV V	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	sp S0EN43 BEA1_GIBF5 Beauvericin nonribosomal cyclodepsipeptide synthetase BEA1 OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=BEA1 PE=2 SV=1	1176-1191
P227	LLWTVKLTIKRKL	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0E654 S0E654_GIBF5 Related to integral membrane protein PTH11 OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_06113 PE=4 SV=1	194-206
P228	IGWIGQILLKPLKK	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0DW40 S0DW40_GIBF5 Uncharacterized protein OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_02553 PE=4 SV=1	60-73
P229	IIWGKKFRVLTKI	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0ELJ0 S0ELJ0_GIBF5 Related to HOL1, putative substrate-H+ antiporter OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_10065 PE=4 SV=1	516-528
P230	IIWGKKFRVLTKIA	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0ELJ0 S0ELJ0_GIBF5 Related to HOL1, putative substrate-H+ antiporter OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_10065 PE=4 SV=1	516-529
P231	WVRKLIKKKALAIL	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0DHQ7 S0DHQ7_GIBF5 Uncharacterized protein OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_02015 PE=4 SV=1	438-451
P232	GLWVRKLIKKKALA I	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0DHQ7 S0DHQ7_GIBF5 Uncharacterized protein OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_02015 PE=4 SV=1	436-450
P233	WVRKLIKKKALAILT A	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0DHQ7 S0DHQ7_GIBF5 Uncharacterized protein OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_02015 PE=4 SV=1	438-453
P234	IKVFPAGLHKAVLK K	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0ELG0 S0ELG0_GIBF5 SET domain-containing protein OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_11479 PE=4 SV=1	431-445
P235	AIKVFPAGLHKAVL KK	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI	tr S0ELG0 S0ELG0_GIBF5 SET domain-containing protein OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_11479 PE=4 SV=1	430-445

		58289 / NRRL A-6831)		
P236	VKGKKIALLGHAKI GL	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0DKK8 S0DKK8_GIBF5 Beta-glucosidase OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_00469 PE=3 SV=1	332-347
P237	ILRHIPVVLKKLQ	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0DK14 S0DK14_GIBF5 Kinase OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_01872 PE=3 SV=1	1302-1315
P238	FRKVIVPLKVVQA	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0EDJ6 S0EDJ6_GIBF5 Related to thermostable alkaline protease OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_12837 PE=4 SV=1	403-416
P239	GAISKLLRLYKKLW NL	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0DP78 S0DP78_GIBF5 NIT-4 pathway-specific regulatory protein nit-4 OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_04567 PE=4 SV=1	571-586
P240	IVRKGLKKVALLGT KI	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0EHQ8 S0EHQ8_GIBF5 Uncharacterized protein OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_10372 PE=3 SV=1	112-127
P241	WKLLGWKVTAIFK	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0EBK7 S0EBK7_GIBF5 Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_12130 PE=4 SV=1	411-423
P242	FIKKVASIVSKVKG	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0EH56 S0EH56_GIBF5 Arabinogalactan endo-beta-1,4-galactanase OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_08188 PE=3 SV=1	292-306
P243	VIWFKLTGKKVKL	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0DZT4 S0DZT4_GIBF5 Probable MNN10-subunit of mannosyltransferase complex OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_02981 PE=3 SV=1	440-452
P244	VLIFKKYWRRIG	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0E6K0 S0E6K0_GIBF5 Related to GIT1-Glycerophosphoinositol transporter also able to mediate low-affinity phosphate trans OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_06421 PE=3 SV=1	263-276
P245	VGIWKFVQKLSARV LK	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0EJI6 S0EJI6_GIBF5 Related to RING finger domain protein OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_09880 PE=4 SV=1	287-302

		6831)		
P246	VAKKALKALNGVIK KW	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0DRN3 S0DRN3_GIBF5 Fungal_trans domain-containing protein OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_02169 PE=4 SV=1	577-592
P247	LVKKLARFSKLGKV L	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0DJ00 S0DJ00_GIBF5 Uncharacterized protein OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_01275 PE=4 SV=1	153-167
P248	LWGGLKLLKLLSKIY	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0EG26 S0EG26_GIBF5 Uncharacterized protein OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_09214 PE=4 SV=1	181-194
P249	WGGLKLLKLLSKIYSL	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0EG26 S0EG26_GIBF5 Uncharacterized protein OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_09214 PE=4 SV=1	182-196
P250	FNWLKGGKGVKHILK V	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0ELX4 S0ELX4_GIBF5 Related to microbial serine proteinase OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_09914 PE=4 SV=1	497-511
P251	FNWLKGGKGVKHIL	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0ELX4 S0ELX4_GIBF5 Related to microbial serine proteinase OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_09914 PE=4 SV=1	497-509
P252	VFFNWLKGGKGVKHI LK	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0ELX4 S0ELX4_GIBF5 Related to microbial serine proteinase OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_09914 PE=4 SV=1	495-510
P253	FFNWLKGGKGVKHIL KV	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0ELX4 S0ELX4_GIBF5 Related to microbial serine proteinase OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_09914 PE=4 SV=1	496-511
P254	WKGLKAGIKAINRV	<i>Gibberella fujikuroi</i> (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831)	tr S0E2M5 S0E2M5_GIBF5 Uncharacterized protein OS=Gibberella fujikuroi (strain CBS 195.34 / IMI 58289 / NRRL A-6831) OX=1279085 GN=FFUJ_13111 PE=4 SV=1	110-123
P255	VKGLYLKRLKLLK	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2R418 M2R418_COCSN Peptidase_M16_C domain-containing protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_28381 PE=4 SV=1	714-727

P256	LVKGLYLKRIKLLK T	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2R418 M2R418_COCSN Peptidase_M16_C domain-containing protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_28381 PE=4 SV=1	713-728
P257	IGGRSVKWLKLLIV	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2R619 M2R619_COCSN Nitrate reductase OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_28067 PE=3 SV=1	276-289
P258	IGGRSVKWLKLLIVT A	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2R619 M2R619_COCSN Nitrate reductase OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_28067 PE=3 SV=1	276-291
P259	WKILSHALKKIIS	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2SZZ6 M2SZZ6_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_219901 PE=4 SV=1	520-532
P260	VFPWKILSHALKKI	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2SZZ6 M2SZZ6_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_219901 PE=4 SV=1	517-530
P261	FPWKILSHALKKII	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2SZZ6 M2SZZ6_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_219901 PE=4 SV=1	518-531
P262	FPWKILSHALKKIIS	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2SZZ6 M2SZZ6_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_219901 PE=4 SV=1	518-532
P263	GKLIKFVLRKLN SVG K	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2R4Z2 M2R4Z2_COCSN Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=PRT1 PE=3 SV=1	56-71
P264	GCLKIVKLLITYL	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2RZC3 M2RZC3_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_29628 PE=4 SV=1	146-158
P265	WSIFLVKLGVKKK	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2SSP7 M2SSP7_COCSN Uncharacterized protein (Fragment) OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_76096 PE=4 SV=1	31-43
P266	VVLRWKLLGAKV KSL	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2RGC9 M2RGC9_COCSN Uncharacterized protein (Fragment) OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_86099 PE=4 SV=1	41-56
P267	IGKLLGGTLLKGKKI	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2SRS4 M2SRS4_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_116238 PE=3 SV=1	231-245
P268	AIGKLLGGTLLKGK KI	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2SRS4 M2SRS4_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_116238 PE=3 SV=1	230-245
P269	LVKVFWLKALRKLK	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2SP28 M2SP28_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_155188 PE=4 SV=1	44-57
P270	LLKLLVKVLKGYG G	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2TM08 M2TM08_COCSN AAA domain-containing protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_177425 PE=4 SV=1	142-156
P271	LKLLVKVLKGYG V	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2TM08 M2TM08_COCSN AAA domain-containing protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_177425 PE=4 SV=1	143-157

P272	LARWLGAFKSLLVK K	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2REP1 M2REP1_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_36563 PE=4 SV=1	399-413
P273	IRKLRLLLKYITKA A	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2SRX8 M2SRX8_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_36379 PE=4 SV=1	37-52
P274	FLRATLVKAAKKI	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2SP20 M2SP20_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_185866 PE=4 SV=1	1059-1071
P275	VRLGIRLLYKGLKA	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2SS51 M2SS51_COCSN Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme 2 OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=PSD2 PE=3 SV=1	761-774
P276	ALRKKLWLAIKKV I	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2RLY3 M2RLY3_COCSN Pep3_Vps18 domain-containing protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_157992 PE=3 SV=1	765-779
P277	ALRKKLWLAIKKV IS	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2RLY3 M2RLY3_COCSN Pep3_Vps18 domain-containing protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_157992 PE=3 SV=1	765-780
P278	GLRAALFKAVGKVF KG	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2SQJ8 M2SQJ8_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_102162 PE=3 SV=1	164-179
P279	AIPRVFKALKALK	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2T0P9 M2T0P9_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_358756 PE=3 SV=1	242-254
P280	VKRIVAPWIKLAK	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2SK97 M2SK97_COCSN Glycoside hydrolase family 3 protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_94688 PE=3 SV=1	377-389
P281	VLKLVKYIKKLRGT V	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2T8L9 M2T8L9_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_35628 PE=4 SV=1	3-17
P282	ILKLPSLFGKGAKKI	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2SWY3 M2SWY3_COCSN Uncharacterized protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_183394 PE=3 SV=1	125-139
P283	ISLKSLVKRLLWK	<i>Cochliobolus sativus</i>	tr M2TEG5 M2TEG5_COCSN MFS domain-containing protein OS=Cochliobolus sativus (strain ND90Pr / ATCC 201652) OX=665912 GN=COCSADRAFT_82258 PE=4 SV=1	232-244
P284	LAKYLLKLRGV	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XYA3 V2XYA3_MONRO Uncharacterized protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_10160 PE=4 SV=1	270-282
P285	IKLAKYLLKLRGV	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XYA3 V2XYA3_MONRO Uncharacterized protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_10160 PE=4 SV=1	268-282
P286	IKLAKYLLKLRGV S	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XYA3 V2XYA3_MONRO Uncharacterized protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_10160 PE=4 SV=1	268-283
P287	FTFLKKNLKKKVI	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XXF7 V2XXF7_MONRO RNA helicase OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_197 PE=3 SV=1	256-268

P288	LLFTFLKKNLKKKV	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XXF7 V2XXF7_MONRO RNA helicase OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_197 PE=3 SV=1	254-267
P289	AILFKIFTKPWKLKFS	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XDA9 V2XDA9_MONRO Nonsense-mediated mrna decay factor OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_6369 PE=4 SV=1	735-750
P290	IQSLLKWIRKVL	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XTG6 V2XTG6_MONRO Uncharacterized protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_12442 PE=4 SV=1	292-304
P291	GIQSLLKWIRKVLHL	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XTG6 V2XTG6_MONRO Uncharacterized protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_12442 PE=4 SV=1	291-306
P292	WWKGLKRYLILVIH	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XUR9 V2XUR9_MONRO Uncharacterized protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_17527 PE=4 SV=1	187-200
P293	LKKFGKALFKPLI	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XHF1 V2XHF1_MONRO Aminopeptidase OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_4705 PE=3 SV=1	653-665
P294	LVGKIKAYVVKHLK	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XG08 V2XG08_MONRO Glycoside hydrolase family 1 protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_16039 PE=3 SV=1	528-541
P295	VGLLKKLAKRLLSQI	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2WS57 V2WS57_MONRO Nwd2 OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_8598 PE=4 SV=1	1023-1037
P296	VGLLKKLAKRLLSQIS	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2WS57 V2WS57_MONRO Nwd2 OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_8598 PE=4 SV=1	1023-1038
P297	ISRVKLLQLIIGK	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XS56 V2XS56_MONRO CxC4 domain-containing protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_15500 PE=4 SV=1	192-205
P298	ISRVKLLQLIIGKW	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XS56 V2XS56_MONRO CxC4 domain-containing protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_15500 PE=4 SV=1	192-206
P299	IGLVVKVKKIRIPIK	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2YU54 V2YU54_MONRO Uncharacterized protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_13809 PE=4 SV=1	193-207
P300	IQKLFGIFPRILGKG	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XYI2 V2XYI2_MONRO Atp binding protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_17580 PE=3 SV=1	183-197
P301	LLKLLKLLAKLAKV	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2WJC7 V2WJC7_MONRO Uncharacterized protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_15857 PE=4 SV=1	92-106
P302	AIWILVKIFKKK K	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2WIH1 V2WIH1_MONRO Uncharacterized protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_9757 PE=4 SV=1	344-356
P303	AVRKRVIKLLKAFYL	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XEK2 V2XEK2_MONRO Sister chromatid cohesion protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_2890 PE=3 SV=1	1231-1245

P304	FLKVLGSFRKLS KGL	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2WDX7 V2WDX7_MONRO DNA mismatch repair protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_15708 PE=3 SV=1	743-757
P305	WKIILGFHPKLV K	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2W7L4 V2W7L4_MONRO Uncharacterized protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_12285 PE=4 SV=1	69-81
P306	IFVLLRKHLKKG F	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2WW07 V2WW07_MONRO Mfs multidrug transporter OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_623 PE=4 SV=1	203-215
P307	NVGKLIKSWLA KKWL	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XD55 V2XD55_MONRO Uncharacterized protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_4078 PE=4 SV=1	54-68
P308	VPKVLGLLKKVF AKR	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2WPM3 V2WPM3_MONRO Ras gtpase-activating protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_17122 PE=4 SV=1	756-770
P309	VIKRFILHAKKT AF	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2X7T6 V2X7T6_MONRO Rnase I inhibitor-type atp binding cassette protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_3165 PE=4 SV=1	505-518
P310	VIKGSWKIFSKGI	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XRU0 V2XRU0_MONRO Uncharacterized protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_6975 PE=4 SV=1	712-724
P311	VLGRVSALVKK FVKK	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2X2H2 V2X2H2_MONRO Poly(A) polymerase OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_3328 PE=3 SV=1	52-66
P312	LGRVSALVKKF VKKV	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2X2H2 V2X2H2_MONRO Poly(A) polymerase OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_3328 PE=3 SV=1	53-67
P313	LGRVSALVKKF VKKVG	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2X2H2 V2X2H2_MONRO Poly(A) polymerase OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_3328 PE=3 SV=1	53-68
P314	WLTNAGKKILG KRVL	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2XV22 V2XV22_MONRO Xanthine phosphoribosyltransferase 1 OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_6918 PE=4 SV=1	91-105
P315	LAWKLTLVHKK LA	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2X8K1 V2X8K1_MONRO Putative monooxygenase OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_7855 PE=4 SV=1	329-341
P316	INKLGGLVGKFK PIK	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2YS88 V2YS88_MONRO Actin cytoskeleton organization protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_8001 PE=3 SV=1	840-854
P317	VPKAIKKVYIRL L	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2WL38 V2WL38_MONRO Amino acid transporter OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_1971 PE=4 SV=1	265-277
P318	IGKGPARGWKL V	<i>Moniliophthora roreri</i> (strain MCA 2997)	tr V2WH10 V2WH10_MONRO Ribonuclease H-like protein OS=Moniliophthora roreri (strain MCA 2997) OX=1381753 GN=Moror_9153 PE=4 SV=1	384-396

Bibliografía

- Agrawal, P., Bhagat, D., Mahalwal, M., Sharma, N., & Raghava, G. P. (2021). AntiCP 2.0: an updated model for predicting anticancer peptides. *Briefings in Bioinformatics*, 22(3), bbaa153. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa153>
- Agrawal, P., Bhalla, S., Chaudhary, K., Kumar, R., Sharma, M., & Raghava, G. P. S. (2018). *In silico* approach for prediction of antifungal peptides. *Frontiers in Microbiology*, 9, 323. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00323>
- 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.combiolchem>
- 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>
- Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos. *Revista Hospital Italiano. Buenos Aires*, 29(2), 102-11.

- Benfield, A. H., & Henriques, S. T. (2020). Mode-of-action of antimicrobial peptides: Membrane disruption vs. intracellular mechanisms. *Frontiers in Medical Technology*, 2, 610997. <https://doi.org/10.3389/fmedt.2020.610997>
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E., Johnston, M., Barton, H., & Wright, G. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*, 7(4), e34953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034953>
- Bignone, P. A., Krupa, R. A., West, M. D., & Larocca, D. (2016). Selection of phage display peptides targeting human pluripotent stem cell-derived progenitor cell lines. *Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells: Methods and Protocols*, 269-283. https://doi.org/10.1007/7651_2014_144
- Bisso, A. (2018). Resistencia a los antimicrobianos. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*. 31(2), 50-59. <https://doi.org/10.36393/spmi.v31i2.32>
- Boman, H. G. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of internal medicine*, 254(3), 197-215. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x>
- Branch JW, Orduz S, Ceballos AM, Mera CA, Orrego A. PepMultiFinder 2.0. 2022. 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.
- Brogden, K. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>

- Cabello, E., Núñez, M., & Torres, V. (2016). Actividad biológica de proteínas y péptidos. En Rivas., C. Oranday., M. & Verde. M. (Eds.), *Investigación en Plantas de Importancia Médica*. (pp. 313-350). OmniaScience.
- Cardillo, A., Martínez, M., Romero, S., Cascone, O., Camperi, S., & Giudicessi, S. (2018). Péptidos antimicrobianos de plantas. *Revista Farmacéutica*, 160(1), 28-46.
https://www.researchgate.net/publication/324596881_Peptidos_antimicrobianos_de_plantas
- 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, (1), 22843. <https://doi.org/10.1038/srep22843>
- Chávez, V. (2020). La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23, 1-11.
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202>
- Chu-Kung, A., Nguyen, R., Bozzelli, K., & Tirrell, M. (2010). Chain length dependence of antimicrobial peptide-fatty acid conjugate activity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 345(2), 160–167.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.11.057>
- 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>

- Contreras, G., Shirdel, I., Braun, M. S., & Wink, M. (2020). Defensins: Transcriptional regulation and function beyond antimicrobial activity. *Developmental and Comparative Immunology*, *104*, 103556. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103556>
- Contreras, R., Escorcia, A. & Velarde, J. (2021). Prevalencia e impacto de resistencias a antimicrobianos en infecciones gastrointestinales: una revisión. *Revista de Gastroenterología de México*, *86*(3), 265-275. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2021.02.003>
- Cuperus, T., Dijk, A., Matthijs, M., Veldhuizen, E., & Haagsman, H. (2016). Protective effect of *in ovo* treatment with the chicken cathelicidin analog D-CATH-2 against avian pathogenic *E. coli*. *Scientific Reports*, *6*(1), 26622. <https://doi.org/10.1038/srep26622>
- D'Costa, V., King, C., Kalan, L., Morar, M., Sung, W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G., Poinar, H., & Wright, G. (2011) Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. *477*(7365), 457-461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- Da Cunha, N. B., Cobacho, N. B., Viana, J. F. C., Lima, L. A., Sampaio, K. B. O., Dohms, S. S. M., Ferreira, A. C. R., de la Fuente-Núñez, C., Costa, F. F., Franco, O. L., & Dias, S. C. (2017). The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discovery Today*, *22*(2), 234-248. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.10.017>
- Da Silva Jr, J. B., Espinal, M., & Ramón-Pardo, P. (2020). Resistencia a los antimicrobianos: tiempo para la acción. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *44*, 1-2. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2020.122>

- 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, G., Mendez, E., Ceballos-, A., & 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>
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., & Rebuffat, S. (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural product reports*, 24(4), 708-734. <https://doi.org/10.1002/chin.200745258>
- Dutta, P., Sahu, R. K., Dey, T., Lahkar, M. D., Manna, P., and Kalita, J. (2019). Beneficial role of insect-derived bioactive components against inflammation and its associated complications (colitis and arthritis) and cancer. *Chem. Biol. Interact.* 313:108824. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108824>
- 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>
- Espinosa, I., Báez, M., Hernández, R., López, Y., Lobo, E., & Corona, B. (2019). Resistencia antimicrobiana en bacterias de origen animal: desafíos para su contención desde el laboratorio. *Revista de Salud Animal*, 41(3), 1-20

- 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/>.
- Gautam, A., Chaudhary, K., Kumar, R., Sharma, A., Kapoor, P., Tyagi, A., & Raghava, G. (2013). *In silico* approaches for designing highly effective cell penetrating peptides. *Journal of Translational Medicine*, *11*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-74>
- 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>
- Greco, I., Molchanova, N., Holmedal, E., Jenssen, H., Hummel, B. D., Watts, J. L., Håkansson, J., Hansen, P. R., & Svenson, J. (2020). Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic *in vivo* toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Scientific Reports*, *10*(1), 13206. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9>
- Guevara, F., Muñoz, L., Navarrete, J., Salazar, L., & Pinilla, G. (2020). Innovaciones en la terapia antimicrobiana. *NOVA*, *18*(34), 9-25. <https://doi.org/10.22490/24629448.3921>
- 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>
- Han, Y., Zhang, M., Lai, R., & Zhang, Z. (2021). Chemical modifications to increase the therapeutic potential of antimicrobial peptides. *Peptides*, 146, 170666. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170666>
- Hancock, R., & Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. *Trends in Microbiology*, 8(9), 402–410. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01823-0](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01823-0)
- Hawkey, P. M. (2015). Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: A product of globalization. *Journal of Hospital Infection*, 89(4), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.01.008>
- Huan Y, Kong Q, Mou H and Yi H (2020) Antimicrobial Peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in Microbiology*, 11, 582779. <https://doi.org/10.3389/fmicb>
- Informe Sector Farmacéutico*. (2024, febrero). Biblioteca Digital Cámara de Comercio de Bogotá. <https://bibliotecadigital.ccb.org.co/items/4af024fd-7871-4c3e-90ff-8c4c95bcf0f5/>
- Ji, S., An, F., Zhang, T., Lou, M., Guo, J., Liu, K., ... & Wu, R. (2023). Antimicrobial peptides: An alternative to traditional antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 265, 116072. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.116072>

- 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>
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J., & Straus, S. (2018). Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
- Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D., & He, Q. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Traslational Research*, 11(7), 3919-3931.
- Letourneau, A. R., & Calderwood, S. B. (2019). Beta-lactam antibiotics: mechanisms of action and resistance and adverse effects. *UptoDate. Waltham (MA): UptoDate*, 1-12.
- Li, J., Koh, J.-J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., and Beuerman, R. W. (2017). Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design. *Frontiers in Neurosciences*. 11, 73. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00073>

- Lima, P., Oliveira, J., Amaral, J., Freitas, C., & Souza, P. (2021). Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. *Life Sciences*, 278, 119647. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119647>
- Lin, T.-T., Yang, L.-Y., Lu, I.-H., Cheng, W.-C., Hsu, Z.-R., Chen, S.-H., & Lin, C.-Y. (2021). AI4AMP: an antimicrobial peptide predictor using physicochemical property-based encoding method and deep learning. *mSystems*, 6(6), e00299-21. <https://doi.org/10.1128/msystems.00299-21>
- López, D., Torres, M., & Prada, C. (2016). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Universidad y Salud*, 18(1), 190-202. <https://doi.org/10.22267/rus.161801.30>
- López, Y., Gamboa, Y., Rodríguez, Y., & Artega, Y. (2022). Resistencia microbiana a los antibióticos: Un problema de salud creciente. *Revista Científica Hallazgos* 21, 7(1), 103-114.
- Luong, H., Thanh, T., & Tran, T. (2020). Antimicrobial peptides – Advances in development of therapeutic applications. *Life Sciences*, 260, 118407. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118407>
- 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>
- Magana, M., Pushpanathan, M., Santos, A., Leanse, L., Fernandez, M., Ioannidis, A., Giulianotti, M., Apidianakis, Y., Bradfute, S., Ferguson, A., Cherkasov, A., Seleem, M., Pinilla, C., de la Fuente, C., Lazaridis, T., Dai, T., Houghten, R., Hancock, R., & Tegos, G. (2020). The value of

- antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(9), e216–e230.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30327-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30327-3)
- Makhlynets, O., & Caputo, G. (2021). Characteristics and therapeutic applications of antimicrobial peptides. *Biophysics Reviews*, 2(1), 011301. <https://doi.org/10.1063/5.0035731>
- Malik, E., Dennison, S. R., Harris, F., & Phoenix, D. A. (2016). pH dependent antimicrobial peptides and proteins, their mechanisms of action and potential as therapeutic agents. *Pharmaceuticals*, 9(4), 67. <https://doi.org/10.3390/ph9040067>
- Manavalan, B., & Patra, M. C. (2022). MLCPP 2.0: an updated cell-penetrating peptides and their uptake efficiency predictor. *Journal of Molecular Biology*, 434(11), 167604.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167604>
- Martínez, M. (2020). *Nuevos péptidos antimicrobianos como estrategia frente al problema de la resistencia a los antibióticos, evaluación in vitro e in vivo. Análisis de un mecanismo de protección mediado por NDM-1 en Galleria mellonella*. [Tesis doctoral, Universidad Nacional de Quilmes]. Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2583>
- Maturana, P., Gonçalves, S., Martínez, 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>

- Medina, P., & Fernández, F. (2014). Observaciones sobre los mecanismos de defensa de los insectos. *Acta Zoológica Lilloana*, 58(1), 17-43.
- Mejía, E., Benítez, J., & Ortiz, M. (2020). Péptidos antimicrobianos, una alternativa para el combate de la resistencia bacteriana. *Acta Biológica Colombiana*, 2(2), 294–302. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n2.77407>
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2018). *Plan Nacional de Respuesta a la Resistencia a los Antimicrobianos*. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/MET/plan-respuesta-resistencia-antimicrobianos.pdf>.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, 19(6), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Mishra, B., & Wang, G. (2012). The importance of amino acid composition in natural AMPs: an evolutionary, structural, and functional perspective. *Frontiers in Immunology*, 3, 221. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00221>
- Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P., & Davidson, D. J. (2020). Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(5), 311-332. doi.org/10.1038/s41573-019-0058-8

- 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>
- Mulani, M., Kamble, E., Kumkar, S., Tawre, M., & Pardesi, K. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb>
- Muñoz, G., Sánchez, L., & Estrada-Tapia, G. (2020). Péptidos de defensa: una alternativa natural para el control de patógenos de plantas y humanos. *Cicy*, *93*, 88–93.
- Nastro, M. (2019). What can we do to prevent multidrug-resistance? *Revista Argentina de Microbiología*, *51*(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.02.001>
- Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current applications of bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, *2020*, 4374891. <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>
- Opal, S. M., & Pop-Vicas, A. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (pp. 235-251). WB Saunders. <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-06839-3.00019-9>
- Organización Panamericana de la Salud. (2019). *Tratamiento de las enfermedades infecciosas 2020-2022*. (8° ed). Autoedición. <https://doi.org/10.37774/9789275321003>

- Organización Panamericana de la Salud. (2021). La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial. Recuperado de: <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>
- Orozco, S., & Arango, J. (2016) Aplicación de la inteligencia artificial en la bioinformática, avances, definiciones y herramientas. *UGCiencia*, 22(1), 159-171. <https://doi.org/10.18634/ugcj.22v.1i.494>
- Ortiz, C. (2019). Diseño, síntesis, caracterización y evaluación in vitro de la actividad de los péptidos antimicrobianos contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43(169), 614-627. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.864>
- Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2012). Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(2), 143-171. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423>
- 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.
- Penesyan, A., Gillings, M., & Paulsen, I. T. (2015). Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*, 20(4), 5286-5298. <https://doi.org/10.3390/molecules20045286>
- Perron, G., Whyte, L., Turnbaugh, P., Goordial, J., Hanage, W., Dantas, G., & Michael, D. (2015). Functional characterization of bacteria isolated from ancient Arctic soil exposes diverse resistance

- mechanisms to modern antibiotics. *PLoS One*, *10*(3), e0069533.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069533>
- 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>
- Phuong, P. T., Oliver, S., He, J., Wong, E. H., Mathers, R. T., & Boyer, C. (2020). Effect of hydrophobic groups on antimicrobial and hemolytic activity: Developing a predictive tool for ternary antimicrobial polymers. *Biomacromolecules*, *21*(12), 5241-5255.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01320>
- Pirtskhalava, M., Amstrong, A. A., Grigolava, M., Chubinidze, 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>
- Quiñones, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". *Revista Cubana de Medicina Tropical*, *69*(3), 1-17.
- Quintero, V. (2021). La próxima pandemia: Bacterias multirresistentes a antibióticos. *Alianzas y Tendencias BUAP*, *6*(21), 1–7.
- Radusky, L. (2017). Herramientas bioinformáticas para el análisis estructural de proteínas a escala genómica. [Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires].

- Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R., & Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México*, 48, 62-71.
<https://doi.org/10.1590/s0036-36342006000100010>
- Rodríguez, E., & Méndez, D. (2021). Aspectos generales relacionados con los antibióticos y plaguicidas. En E. Rodríguez, D. Méndez, Marrugo, A y Márquez, J. (Eds.), *Perspectiva analítica y proteómica de residuos de antimicrobianos y plaguicidas en alimentos de origen animal* (19-58). Editorial Universitaria.
- Rončević, T., Puizina, J., & Tossi, A. (2019). Antimicrobial peptides as anti-infective agents in pre-post-antibiotic era?. *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, Guerneur 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>
- Schmidt, C. (2017). Living in a microbial world. *Nature Biotechnology*, 35, 401-403.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3868>

- Scocchi, M., Mardirossian, M., Runti, G., & Benincasa, M. (2017). Non-membranolytic mechanisms of action of antimicrobial peptides—novel therapeutic opportunities. *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design, and Novel Therapeutic Strategies*. CABI, Oxfordshire, 149-160. <https://doi.org/10.1079/9781786390394.0149>
- Segev-Zarko, L. A., Mangoni, M. L., & Shai, Y. (2017). Antimicrobial peptides: multiple mechanisms against a variety of targets. *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies*. UK: CAB International, 119-127. <https://doi.org/10.1079/9781786390394.0119>
- Semreen, M., Gamal, M., Abdin, S., Alkhazraji, H., Kamal, L., Hammad, S., Awady, F., Waleed, D., & Kourbaj, L. (2018). Recent updates of marine antimicrobial peptides. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(3), 396-409. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.01.001>
- Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3), 402-419.
- Shelomi, M., Jacobs, C., Vilcinskas, A., and Vogel, H. (2020). The unique antimicrobial peptide repertoire of stick insects. *Developmental and Comparative Immunology*, 103, 103471. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103471>
- Starr, C. G., & Wimley, W. C. (2017). Discovery of novel antimicrobial peptides using combinatorial chemistry and high-throughput screening. *Antimicrobial peptides: Discovery, design and novel therapeutic strategies*, (Ed. 2), 86-100. <https://doi.org/10.1079/9781786390394.0086>

- Tamayo S, Castañeda CA, Orduz S. (2018). Type-Peptide 1.0. Herramientas computacionales pedagógicas para el estudio, diseño y optimización de péptidos antimicrobianas basada en sus propiedades fisicoquímicas. Dirección Nacional de Derechos de Autor. Ministerio del Interior. Registro 13-70-274. Diciembre 5, 2018.
- Téllez, G. y Castaño, J. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55-67. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(10\)70093-x](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(10)70093-x)
- Thakur, N., Qureshi, A., & Kumar, M. (2012). AVPPred: Collection and prediction of highly effective antiviral peptides. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), W199-W204. <https://doi.org/10.1093/nar/gks450>
- 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>
- Tonarelli, G., & Simonetta, A. (2013). Péptidos antimicrobianos de organismos procariotas y eucariotas como agentes terapéuticos y conservantes de alimentos. *Revista FABICIB*, 17, 137-177. <https://doi.org/10.14409/fabicib.v17i0.4316>
- Tornesello, A., Borrelli, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F., & Tornesello, M. (2020). Antimicrobial peptides as anticancer agents: Functional properties and biological activities. *Molecules*, 25(12), 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules25122850>

Torres, MDT, Sothiselvam, S., Lu, TK y de la Fuente-Nunez, C. (2019). Principios de diseño de péptidos para aplicaciones antimicrobianas. *Journal of Molecular Biology*. 431, 3547–3567. doi: 10.1016/j.jmb.2018.12.015

UniProt [Internet]. Available from: <https://www.uniprot.org/>

Vázquez, A., Perdomo-Morales, R., & Montero-Alejo, V. (2018). Natural antimicrobial peptides. *Biotechnologia. Aplicada*, 35, 4101-4107.

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 GuangShun. (2017). Structural insight into the mechanisms of action of antimicrobial peptides and structure-based design. In *Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies* (pp. 169-187). Wallingford UK: Cabi. <https://doi.org/10.1079/9781786390394.0169>

- Wang, G. (2017). Discovery, classification and functional diversity of antimicrobial peptides. *Antimicrobial peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies*. CABI Publishing, 1-19. <https://doi.org/10.1079/9781786390394.0001>
- 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. S., Li, X., & Zasloff, M. (2010). A database view of naturally occurring antimicrobial peptides: nomenclature, classification and amino acid sequence analysis. In *Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies* (pp. 1-21). Wallingford UK: Cabi. <https://doi.org/10.1079/9781845936570.0001>
- Wang, G., Hanke, M.L., Mishra, B., Lushnikova, T., Heim, C.E., *et al.* (2014) Transformation of human cathelicidin LL-37 into selective, stable, and potent antimicrobial compounds. *ACS Chemical Biology* 9(9), 1997–2002. <https://doi.org/10.1021/cb500475y>
- 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>
- Wang, Y., Wang, Q., Wu, A., Hao, Z., & Liu, X. (2017). Isolation of a peptide from Ph.D.-C7C phage display library for detection of Cry1Ab. *Analytical Biochemistry*, 539, 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.03.004>

- 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
- Wuerth, K. C., & Hancock, R. E. (2017). Immunomodulatory activities of cationic host defence peptides and novel therapeutic strategies. *Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies*, (Ed. 2), 238-259. <https://doi.org/10.1079/9781786390394.0238>
- 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>
- Zahedifard, F., Lee, H., No, J. H., Salimi, M., Seyed, N., Asoodeh, A., et al. (2020). Comparative study of different forms of jellein antimicrobial peptide on leishmania parasite. *Experimental Parasitology*. 209:107823. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107823>
- Zhou, C., Kang, J., Wang, X., Wei, W., & Jiang, W. (2015). Phage display screening identifies a novel peptide to suppress ovarian cancer cells in vitro and in vivo in mouse models. *BMC Cancer*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1891-8>