

Predicción de péptidos contra proteínas digestivas tipo tripsinas de Aedes y Anopheles

Estudiante
Anderson Elit Arrieta Rodríguez

Director(es)
Carlos Muskus PhD

Codirector(es)
Sergio Orduz PhD
Rodrigo Ochoa PhD

Trabajo de Grado
En la modalidad de *Investigación*

Programa de Biología
Universidad CES
Medellín
Noviembre 2020

Medellín, 12 de Noviembre de 2020.

Señores:

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN

Programa de Biología

Se informa que el estudiante **Anderson Elit Arrieta Rodriguez** identificado con cédula: No. 1128278800 ha concluido de manera satisfactoria su trabajo de grado titulado “**Predicción de péptidos contra proteínas digestivas tipo tripsinas de Aedes y Anopheles**”.

En calidad de **director(es)** del proyecto en mención, y luego de haber revisado con detalle y alto rigor científico y académico el presente documento final, se aprueba este trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de **Biólogo**.



Carlos Muskus
Cédula: 73.099.259
Programa de Estudio y
Control de Enfermedades
Tropicales, PECET,
Universidad de Antioquia,
Medellín, Colombia

Predicción de péptidos contra proteínas digestivas tipo tripsinas de *Aedes* y *Anopheles*

Anderson Elit Arrieta Rodríguez

Resumen

Introducción. El uso de insecticidas para el control de insectos como *Aedes* y *Anopheles* han sido ampliamente usados a nivel mundial, sin embargo, debido a la contaminación del medio ambiente, los efectos secundarios que podrían tener en población humana y el desarrollo de resistencia por parte de los insectos ha hecho que se sigan explorando alternativas sobre todo biológicas para el control de insectos. Bacterias como *Bacillus thuringiensis* han sido evaluadas como alternativa para el control biológico de *Aedes* spp., *Anopheles* spp. y otros insectos, pero debido al alto impacto que tiene estos vectores en la transmisión de agentes patógenos y la existencia de poblaciones de insectos resistentes a esta bacteria la búsqueda de nuevas moléculas con actividad insecticida es de vital importancia. Moléculas tipo péptidos antimicrobianos han sido ampliamente estudiadas como alternativas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades producidas por agentes patógenos.

Métodos. Inicialmente se hizo una búsqueda de péptidos ≤ 10 y 30 aminoácidos (aa), a todos estos péptidos se les hizo tamizaje virtual con el software AutoDock-Vina tomando como receptores proteínas digestivas tipo tripsinas, los péptidos más promisorios fueron analizados implementando Dinámica Molecular usando el software GROMACS.

Resultados. Los péptidos más promisorios fueron péptidos catiónicos y que contenían triptófano en su secuencia. Por dinámica molecular se obtuvo 4 péptidos los cuales se validaron experimentalmente, de estos ninguno mostró actividad larvicida.

Discusión y conclusiones. Dentro de las consideraciones que se debe tener está el considerar el uso de librerías de péptidos más grandes, además del uso o diseño de un software especializado para Docking proteína-peptido ya que los péptidos poseen propiedades que difieren mucho de las de un compuesto.

Palabras clave: péptidos antimicrobianos, Docking Molecular, tamizaje virtual, Dinámica Molecular, tripsinas.

Nota sobre formato del trabajo de grado

El siguiente trabajo se presenta como un artículo científico, formateado de acuerdo a las instrucciones para autores de la revista *Journal of Negative & No Positive Results*, las cuales se pueden consultar vía web en: <https://revistas.proeditio.com/jonnpr/index>.

ORIGINAL

Predicción de péptidos contra proteínas digestivas tipo tripsinas de *Aedes* y *Anopheles*

Prediction of peptides against trypsin-like digestive proteins from *Aedes* and *Anopheles*

Anderson Arrieta^{1,2}, Carlos Muskus¹, Sergio Orduz², Rodrigo Ochoa¹

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia¹

Escuela de Biociencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia²

Palabras claves: péptidos antimicrobianos, Docking Molecular, tamizaje virtual, Dinámica Molecular, tripsinas

Resumen

El uso de insecticidas para el control de insectos como *Aedes* y *Anopheles* han sido ampliamente usados a nivel mundial, sin embargo, debido a la contaminación del medio ambiente, los efectos secundarios que podrían tener en población humana y el desarrollo de resistencia por parte de los insectos ha hecho que se sigan explorando alternativas sobre todo biológicas para el control de insectos. Bacterias como *Bacillus thuringiensis* han sido evaluadas como alternativa para el control biológico de *Aedes* spp., *Anopheles* spp. y otros insectos, pero debido al alto impacto que tiene estos vectores en la transmisión de agentes patógenos y la existencia de poblaciones de insectos resistentes a esta bacteria la búsqueda de nuevas moléculas con actividad insecticida es de vital importancia. Moléculas tipo péptidos antimicrobianos han sido ampliamente estudiadas como alternativas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades producidas por agentes patógenos. Inicialmente se hizo una búsqueda de péptidos ≤ 10 y 30 aminoácidos (aa), a todos estos péptidos se les hizo tamizaje virtual con el software AutoDock-Vina tomando como receptores proteínas digestivas tipo tripsinas. Los péptidos más promisorios fueron péptidos catiónicos y que contenían triptófano en su secuencia. Por dinámica molecular se obtuvo 4 péptidos los cuales se validaron experimentalmente, de estos ninguno mostró actividad larvicida.

Keywords: antimicrobial peptides, Molecular Docking, virtual screening, Molecular Dynamics, trypsins

Abstract

The use of insecticides to control insects such as *Aedes* and *Anopheles* have been widely used worldwide, however, due to environmental pollution, the side effects they could have on the human population and the development of resistance by insects has led to the continuation of exploring especially biological alternatives for the control of insects. Bacteria such as *Bacillus thuringiensis* have been evaluated as an alternative for the biological control of *Aedes* spp., *Anopheles* spp. and other insects, but due to the importance that these vectors have on the transmission of pathogens and the existence of populations of insects resistant to this bacterium, the search for new molecules with insecticidal activity is of vital importance. Antimicrobial peptides have been widely studied as therapeutic alternatives for the treatment of diseases caused by pathogens. Initially a search was made for peptides ≤ 10 and 30 amino acids, virtual screening was made with AutoDock-Vina software taking as receptors trypsin-like digestive proteins. The most promising peptides were cationic peptides that contained tryptophan in their sequence. With molecular dynamics method 4 peptides were chosen, these were validated experimentally, none of these showed insecticidal activity.

Introducción

Los insecticidas para el control de *Aedes*, *Anopheles* y otras especies de insectos han sido ampliamente usados en el mundo, pero el uso excesivo de insecticidas sintéticos ha generado contaminación ambiental y efectos sobre la salud humana, Dentro de las consecuencias del uso masivo y sin control de pesticidas está la generación de poblaciones de insectos resistentes haciendo más difícil el control de éstos. Factores como la contaminación ambiental y el desarrollo de resistencia por parte de los insectos han llevado a la búsqueda de otras alternativas como los biopesticidas(1), sin embargo, el bioinsecticida que más se ha utilizado es la bacteria gram-positiva aislada de suelo *B. thuringiensis*, la cual durante el proceso de esporulación sintetiza proteínas insecticidas denominadas toxinas Cry, de estas toxinas se sabe que tienen efecto sobre el tejido epitelial del intestino de muchos insectos generando poros en la membrana que altera a su vez el tráfico de sustancias provocando hinchamiento y

lisis celular. La alta selectividad de las toxinas Cry y la no demostración de efectos nocivos contra la salud humana han convertido a éstas bacterias en una buena alternativa para el control biológico de insectos como *Aedes* y *Anopheles* aunque ya se han encontrado poblaciones de insectos resistentes a algunas cepas de *B. thuringiensis* (2,3).

Moléculas como los péptidos antimicrobianos han tenido una amplia aplicación, estas moléculas son pequeños polipéptidos que hacen parte del sistema inmune innato de muchos organismos, éstos generalmente son péptidos catiónicos y anfipáticos lo cual hace que tengan la tendencia a unirse a las membranas citoplasmáticas de muchas células bacterianas provocando poros en la membrana y en muchos casos lisis celular. Además se ha reportado que estos tienen actividad contra parásitos y células cancerígenas ya que se pueden unir a la membrana plasmática de éstos, sin embargo se ha reportado que los péptidos antimicrobianos se pueden unir a proteínas implicadas en procesos moleculares como la transcripción, traducción, etc.(4,5).

Dentro de las proteínas intestinales más importantes en insectos están las tripsinas las cuales son el tipo de endopeptidasas más abundantes en el intestino medio de los insectos siendo muy activas en casi todos los estadios de dípteros como *Aedes* y *Anopheles*(6). otras proteínas expresadas en intestino importantes son la anhidrasa carbónica y los canales iónicos que están implicados en la regulación de los gradientes de pH a lo largo del intestino(7). En el presente estudio se pretendió identificar potenciales péptidos antimicrobianos que puedan ser útiles en el control biológico de *Aedes* y *Anopheles* por medio de Docking y Dinámica Molecular tomando como receptores proteínas digestivas tipo tripsinas.

Materiales y métodos

Búsqueda de receptores y péptidos: Inicialmente se buscaron tripsinas de *Aedes* y *Anopheles* con estructura 3D en la base de datos PDB (Protein Data Bank) usando Ontología Génica y literatura. Además, se buscaron en la base de datos Uniprot secuencias de estas proteínas. Péptidos con ID para la base de datos de estructuras tridimensionales PDB y que tuvieran una longitud ≤ 30 aa fueron recuperados de la base de datos de péptidos antimicrobianos APD. Finalmente se recuperaron secuencias de péptidos ≤ 10 aa a partir de APD los cuales se modelaron con el programa I-TASSER.

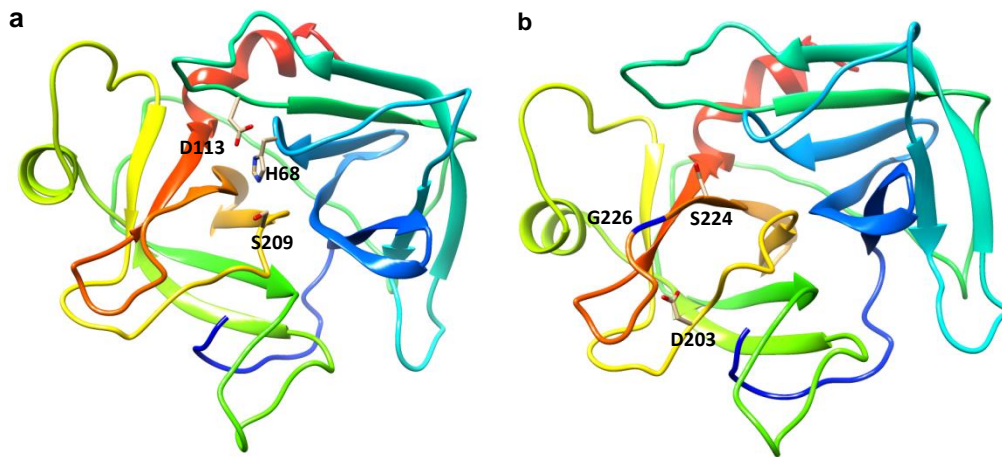


Figura 1. Sitio activo (a) y sitio de unión a sustrato(b) de la tripsina 3A1 de *A. aegypti*

Modelación y validación estructural: La identificación de la plantilla para cada proteína a modelar se hizo empleando BLASTp contra la base de datos PDB, adicionalmente, la estructura primaria de las proteínas recuperadas a partir de Uniprot se modelaron en el servidor Swiss Model. Además se calculó hidrofobicidad y la superficie electrostática de las proteínas modeladas implementando el programa CHIMERA 1.8.

El proceso de validación de los modelos generados se realizó usando tres enfoques: *i)* analizando los ángulos dihédricos de los enlaces peptídicos a partir del test de Ramachandran mediante el programa PROCHECK, *ii)* cálculo del Z-score con el programa prosa WEB y *iii)* por Dinámica Molecular usando el programa GROMACS versión 4.6.3.

Para las simulaciones por dinámica molecular se parametrizaron las condiciones a 0.15 M de NaCl, se usó el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN, se equilibró el solvente con un NVT a 300K y un NPT a un bar con una simulación de 100 ps. Se realizaron simulaciones de 10 ns con un dt de 2 fs para cada proteína con el fin de analizar la estabilidad de la estructura secundaria usando DSSP, además se analizó la dinámica de la estructura a partir del RMSD y RMSF.

Docking Molecular y análisis de la estabilidad del complejo proteína-péptido: La búsqueda del sitio activo para cada proteína se realizó a partir de la literatura, de Uniprot y de la base de datos CDD (de inglés: Conserved Domains Database) (figura 1), la preparación de las moléculas se realizó con el paquete MGLTools 1.5.6, el Docking Molecular se realizó con

el programa AutoDock-Vina versión 1.1.2, además se identificaron los residuos del receptor con los que interactuaba el péptido con el paquete MGLTools 1.5.6.

La estabilidad de los complejos proteína-péptido hallados por Dinámica Molecular se analizaron implementando el paquete GROMACS versión 4.6.3 con los mismos parámetros que se usaron anteriormente excepto que en este caso se hicieron simulaciones de 50 ns, se analizaron el Top20 de los resultados para los péptidos ≤ 30 aa y el Top10 para los péptidos ≤ 10 aa, posteriormente, se analizaron variables como el número de puentes de hidrógeno proteína-péptido y péptido-solvente para observar desprendimiento del péptido del sitio de unión.

Evaluación in vitro

Los péptidos que mostraron más estabilidad implementando Dinámica Molecular se enviaron a sintetizar, para la evaluación in vitro se usaron diez larvas por pozo (Larvas de segundo instar) las cuales se expusieron a cada uno de los 4 péptidos seleccionados en un volumen final de 500 μ L. Cada ensayo se realizó por triplicado y se hicieron dos repeticiones. Se evaluó la concentración máxima de cada péptido.

Resultados

Receptores y péptidos: Para PDB no se encontraron tripsinas pertenecientes a *Aedes* y *Anopheles*. De Uniprot se recuperaron 11 secuencias de las cuales 4 eran de *A. aegypti* y 7 eran de *A. gambiae* (tabla S1). Para los péptidos ≤ 30 aa se recuperaron 52 estructuras de PDB, mientras que de péptidos ≤ 10 aa se recuperaron 30 secuencias.

Validación estructural: Empleando el test de Ramachandran se encontró un bajo porcentaje de residuos en regiones poco favorables (figura 2a y tabla S2) lo cual es consistente con los análisis evolutivos que se han hecho con estas proteínas mostrando un alto nivel de conservación a nivel de secuencia y a nivel estructural(8), para el caso del Z-score se encontró que todas las proteínas tenían una energía que estaba dentro de la distribución promedio (Figuras 2b-c y Tabla S2). Por Dinámica Molecular se observó que la estructura secundaria se mantenía en el tiempo (Figura 4) en la mayoría de proteínas las cuales se equilibraron en un

tiempo relativamente corto después de 1 ns de simulación lo cual se observó a partir del RMSD (Figura 3a). Además se observa en el RMSF que no hay fluctuaciones considerables en la posición de los residuos de la estructura de referencia lo cual es un buen resultado teniendo en cuenta que en este estudio se trabajaron con proteínas globulares que se esperan que sean muy estables en el tiempo (Figura 3b).

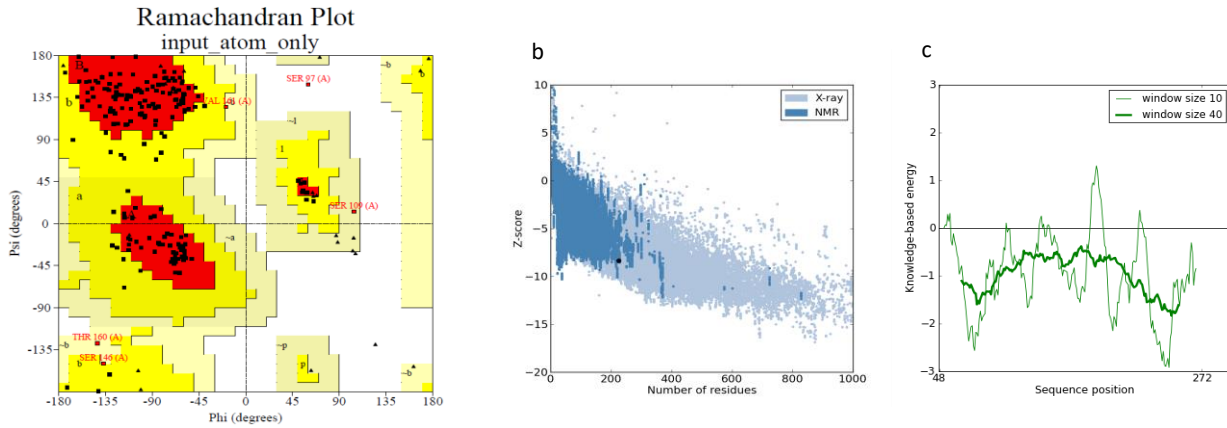


Figura 2. Validación estructural de la tripsina 1 de *Anopheles gambiae* (a) test de ramachandran, (b) y (c) Z-score

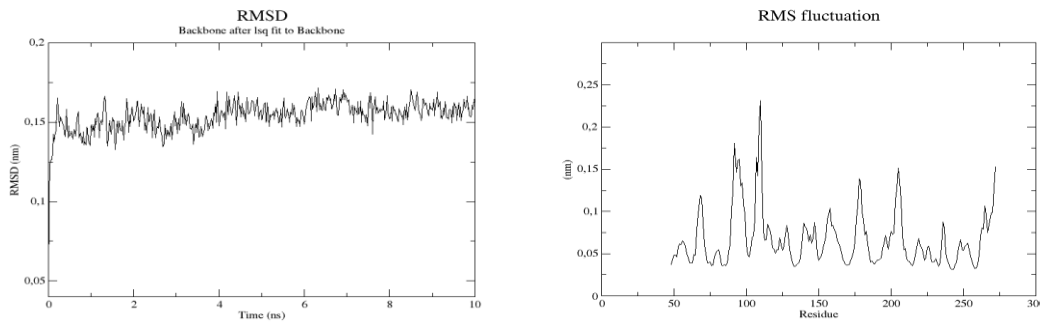


Figura 3. RMSD (a) y RMSF (b) de la tripsina 1 de *Anopheles gambiae*

Secondary structure

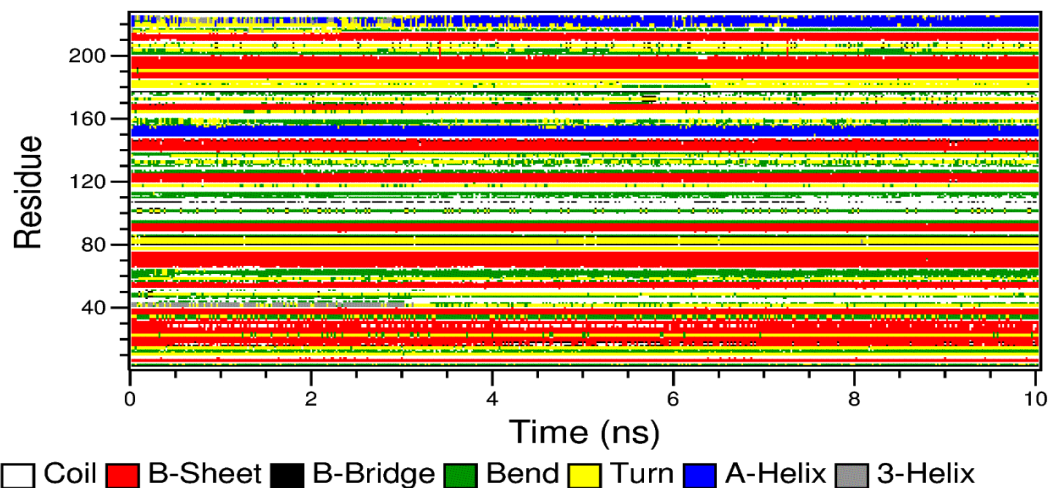


Figura 4. Análisis de la estructura secundaria de la tripsina 1 de *Anopheles gambiae* a partir de dinámica molecular

Docking Molecular: para el grupo de péptidos ≤ 30 aa el mejor complejo fue el péptido 1G** con la tripsina 3 de *A. gambiae* con un valor de energía de interacción de -8.5 (tabla 1), para el grupo de péptidos ≤ 10 aa el péptido más promisorio es el péptido AP01**7 con un valor de energía de interacción de -8.5 kcal/mol (tabla 2) siendo ambos péptidos catiónico, esta característica se evidenció para todos los péptidos promisorios que se hallaron los cuales contenían en sus secuencias aminoácidos básicos, a partir del análisis de la superficie electrostática del sitio activo de las tripsinas modeladas se encontró que esta era aniónica por lo cual es razonable que los péptidos más promisorios sean de carga positiva (Figura 5 y S1). Para los péptidos que se encontraron se reporta una amplia gama de actividades como lo son antibacterianos, antifúngicos, antiparasíticos para un único péptido lo cual muestra la promiscuidad de estas moléculas. Otra cosa que se observó es que un mismo péptido se una a varias tripsinas como es el caso del péptido 1G** que mostro las mejores interacciones con la tripsinas 2, 3, 3A1 y Quimiotripsina larval (tabla 1), estas proteínas al ser de la misma familia y al tener un sitio de unión tan conservado da lugar a que un mismo péptido pueda unirse a varias tripsinas, esto pudo verse en el análisis de la hidrofobicidad y la superficie electrostática donde se observaron los mismos patrones (Figura 5 y S1).

Receptores	Péptidos	Energía de interacción (kcal/mol)
Tripsina 3 (<i>A. gambiae</i>)	1G**	-8.5
Tripsina 3A1 (<i>A. aegypti</i>)	1G**	-8.2
Tripsina 2 (<i>A. gambiae</i>)	1H**	-8.1
Tripsina larval (<i>A. aegypti</i>)	1H**	-8.0
Tripsina 5G1 (<i>A. aegypti</i>)	1S**	-8.0
Tripsina 3A1 (<i>A. aegypti</i>)	1M**	-8.0
Quimiotripsina larval (<i>A. aegypti</i>)	1G**	-7.9
Tripsina 4 (<i>A. gambiae</i>)	1D**	-7.9
Tripsina 2 (<i>A. gambiae</i>)	1M**	-7.9
Tripsina 2 (<i>A. gambiae</i>)	1G**	-7.9

Tabla 1. Top 10 tripsinas-péptidos ≤ 30 aa

Receptores	Péptidos	Energía de interacción (kcal/mol)
Tripsina larval (<i>A. aegypti</i>)	AP01**7	-8.5
Tripsina 5 (<i>A. gambiae</i>)	AP01**7	-8.1
Tripsina 5G1 (<i>A. aegypti</i>)	AP01**4	-8.0
Tripsina 5G1 (<i>A. aegypti</i>)	AP01**2	-8.0
Tripsina 4 (<i>A. gambiae</i>)	AP01**7	-7.9
Tripsina 3 (<i>A. gambiae</i>)	AP01**1	-7.9
Tripsina 5G1 (<i>A. aegypti</i>)	AP01**1	-7.9
Tripsina 4 (<i>A. gambiae</i>)	AP01**1	-7.8
Tripsina 5G1 (<i>A. aegypti</i>)	AP01**7	-7.8
Tripsina 5G1 (<i>A. aegypti</i>)	AP01**6	-7.7

Tabla 2. Top 10 tripsinas-péptidos ≤ 10 aa

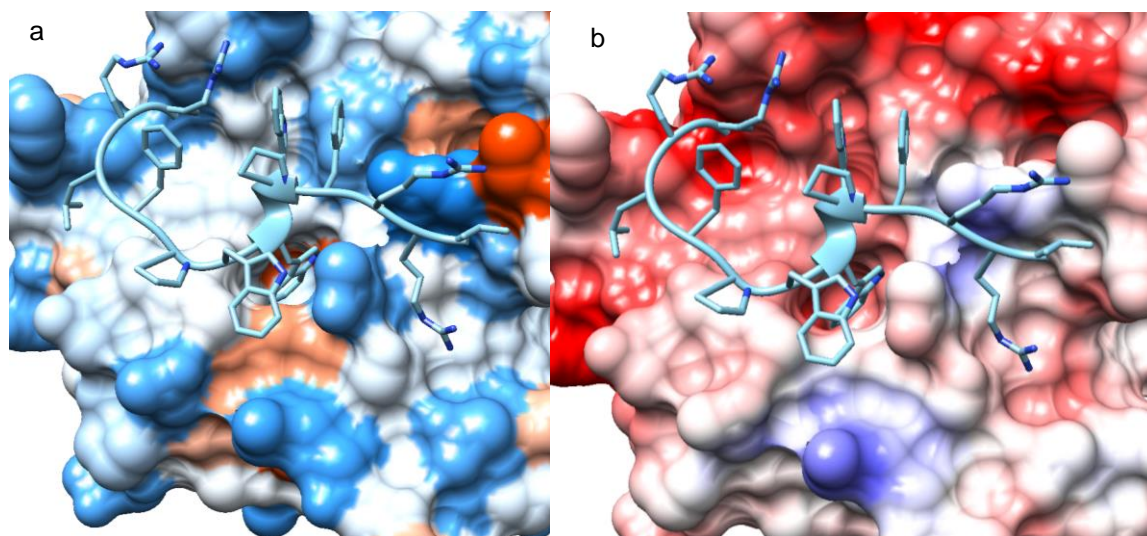


Figura 5. Análisis de hidrofobicidad (a) y potencial electrostático (b) tripsina 7 (*A. gambiae*) - 1D**

El uso de tamizaje virtual es una muy buena aproximación para la predicción de péptidos con una gran gama de actividades, además ya existen un gran número de péptidos identificados depositados en bases de datos a los cuales en su mayoría no se les conoce cuál es su mecanismo de acción a nivel molecular y tampoco se les conoce la actividad (9), Autodock vina aunque es un programa de Docking proteína-peptido al igual que en este trabajo, ha sido utilizado para el diseño y búsqueda de péptidos contra proteínas implicadas en enfermedades producto de agregación (10), así como inhibidores de la proteasa principal (Mpro) la cual está implicada en el mecanismo de infección del COVID-19 (11), además este software también se ha usado para estudiar el mecanismo de interacción antígeno-anticuerpo para el diseño de vacunas basadas en epítopes (12).

El Docking Molecular es una buena aproximación para tratar de predecir las mejores interacciones entre proteínas y ligandos, además de permitir la búsqueda de otras posibles actividades que puedan tener los péptidos siendo una alternativa para el diseño racional de medicamentos de naturaleza peptídica (13). Actualmente hay muchos péptidos aprobados para uso clínico con diversas actividades, algunos ejemplos son la colistina y daptomicina los cuales tienen actividad contra algunas cepas de bacterias gram-negativas (14). Péptidos con actividad insecticida han sido reportados en la literatura como es el caso del péptido BTM-P1 extraído de la protoxina Cry11Bb1 que es una proteína que ha reportado actividad larvicida en mosquitos del género *Aedes* (15).

Análisis de estabilidad de los complejos proteína-péptido: para el grupo de péptidos analizados por Dinámica Molecular no se encontró concordancia con los resultados obtenidos por Docking Molecular, el complejo más estable del grupo de péptidos ≤ 30 aa fue la tripsina 7 (*A. gambiae*) – 1D** que aparece como el onceavo mejor resultado con un valor de energía de interacción de -7.8 kcal/mol (Figura 5 y 6), siendo el RMSD del péptido con respecto al receptor de 0.8 nm estabilizándose después de 10 ns de simulación (figura 7), para los puentes de hidrógeno se observaron que en promedio se forman cinco puentes de hidrógeno entre el péptido y la proteína (figura 8a), para el mapa de estabilidad se encontró un grupo de puentes de hidrógeno que se mantenían estables después de 10 ns (figura 8c), el número de puentes de hidrógeno entre el péptido y el solvente se mantuvieron constantes (figura 8b), para observar desprendimiento se debe observar si hay disminución de puentes de hidrógeno péptido-proteína o aumento de estos entre el péptido con respecto al solvente, del análisis de

las interacciones identificadas en MGLTools 1.5.6 se encontró un puente de hidrógeno con el grupo carbonil del aminoácido D121 (figura 6) y la orientación de un Triptófano hacia el bolsillo de unión a sustrato (figura 5), algunos de los péptidos promisorios tenían en su secuencia triptófanos que se orientaban hacia el sitio de unión a sustrato el cual se observó que se ubicaba en la interface, esto sugiere que este puede funcionar como impedimento estérico para evitar que el sustrato se una a este sitio.

El complejo más estable para el grupo de péptidos ≤ 10 aa fue tripsina el complejo formado entre el peptido AP01**6 y la tripsina 5G1 de *A. aegypti* que aparece como el décimo mejor resultado con un valor de energía de interacción de -7.7 kcal/mol (tabla 2), con un RMSD de 0.2 nm equilibrándose después de 5 ns de simulación (figura S3), los puentes de hidrógeno proteína-péptido y péptido-solvente se mantienen constantes y en el mapa de existencia de puentes de hidrogeno se logran observar varios puentes de hidrógeno que se mantienen en el tiempo (figura S4a-c), el número de puentes de hidrógeno observados en la simulación es de mas o menos 8 lo cual es consistente con lo hallado con el análisis de las interacciones intermoleculares con MGLTools 1.5.6 donde se encontró que este péptido puede formar puentes de hidrógeno con los aminoácidos Y117, T122, D215, S216, Q218, G238 y G240 (figura S2).

La incongruencia de los resultados obtenidos por Docking Molecular con respecto a los encontrados en Dinámica Molecular se puede deber a la poca exhaustividad en el proceso de Docking por lo cual se debe definir que exhaustividad es adecuada para hacer Docking proteína-péptido implementando el programa AutoDock-Vina, puede que debido a que un péptido tiene más enlaces rotables que un ligando promedio este requiera de una exploración conformacional mucho más exhaustiva, aunque es recomendable también explorar la herramienta FlexPepDock que hace parte del paquete Rosetta (16).

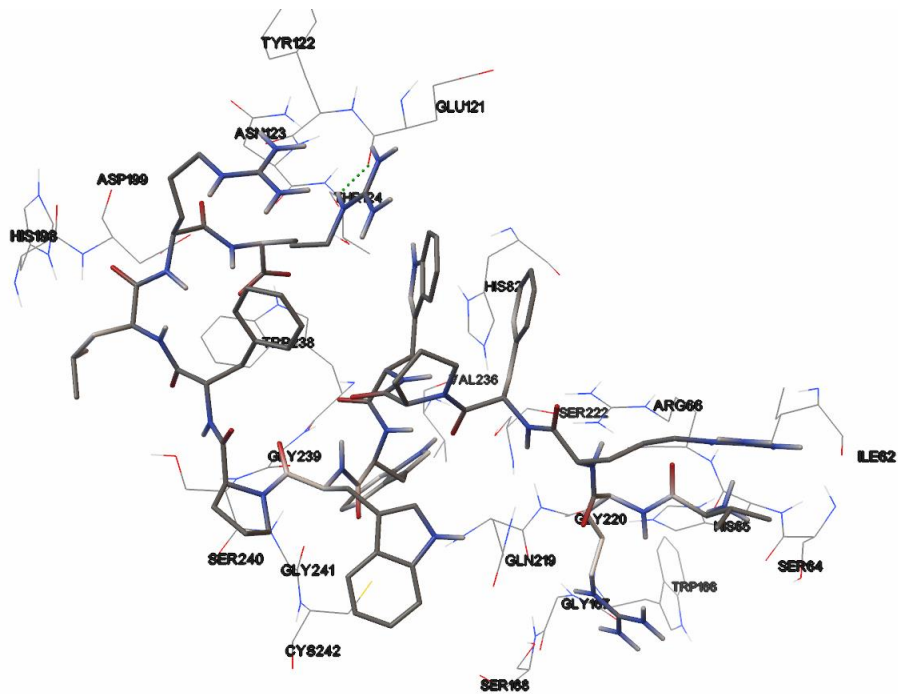


Figura 6. Interacciones intermoleculares entre el péptido 1D** y la tripsina 7 de *A. gambiae*

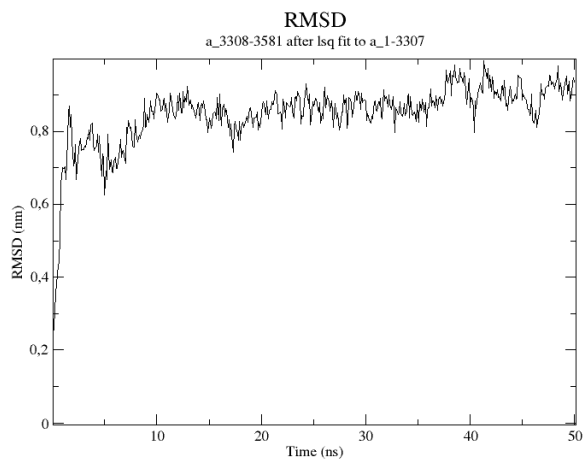


Figura 7. RMSD proteína-peptido tripsina 7 (*A. gambiae*) – 1D**

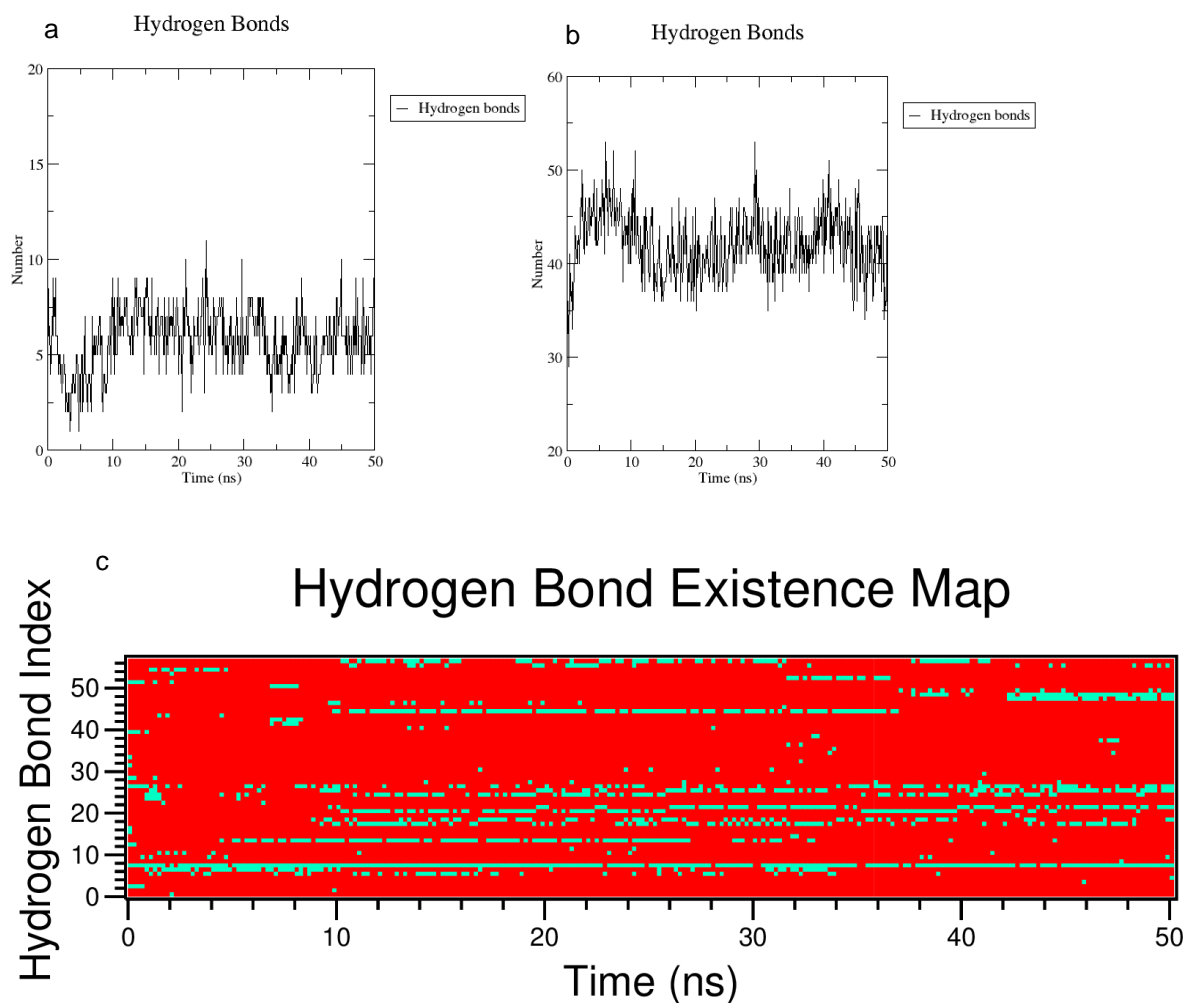


Figura 8. Puentes de Hidrógeno proteína-péptido (a) y péptido-solvente (b) del complejo entre la tripsina 7 de *A. gambiae* y el péptido 1D**, estabilidad puentes de hidrógeno proteína-péptido (c). Azul: presente, Rojo: ausente

Evaluación in vitro: producto del análisis por Dinámica Molecular se obtuvo una lista final de 4 péptidos, Análisis in vitro de la actividad de los péptidos sobre larvas de anofeles mostró que los péptidos no parecen tener acción larvicida contra las larvas de Anofeles a la concentración de estos evaluada. Las causa de la no actividad de los péptidos debe ser investigada dado que no se conoce la estabilidad de los péptidos en el sistema *in vitro* empleado o si pudieron ser degradados por enzimas digestivas presente en los intestinos de las larvas.

TRATAMIENTO	24 HORAS*	48 HORAS*
Tripticina (APD00152)	9,8 ± 0,4	9,8 ± 0,4
Indolicidina (APD00150)	10 ± 0,0	9,6 ± 0,5
PW2 (1M02)	9,8 ± 0,4	9,6 ± 0,5
Microcina (APD1226)	9,5 ± 0,7	8,8 ± 1,1

Tabla 4. Resultados de la evaluación *in vitro* de los péptidos seleccionados contra larvas de Anofeles. *Prom. ± D.S. Número individuos vivos a la concentración máxima evaluada 200 uM a las 24 y 48 horas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A pesar que los péptidos que se seleccionaron no tuvieron actividad larvica, este estudio es un punto de partida para futuras investigaciones en donde toca tener en cuenta una diversidad de aspectos, un aspecto a considerar es el tamaño de la librería de péptidos utilizados, ya que mientras más péptidos se prueben contra un blanco se aumenta la probabilidad de encontrar algún péptido que a la hora de validar experimentalmente funcione, lo cual cada vez es más factible ya que las bases de datos de secuencias de péptidos crece de forma exponencia con el paso del tiempo(17), junto con esto también el poder computacional también esta aumentando lo que permite analizar grandes volúmenes de datos en cada vez menos tiempo.

Debido a la flexibilidad del enlace peptídico se debe de crear estrategias más efectivas para predecir las posibles conformaciones que puede asumir un péptido, aunque ya se han reportado protocolos los cuales se deben implementar en proyectos futuros, de los más recientes está el desarrollado por Nardo *et al.* para la búsqueda de péptidos inhibitorios contra la enzima renina(18).

El uso de Dinámica Molecular para analizar la estabilidad de complejos proteína-péptido o proteína-ligando es una muy buena aproximación para validar los resultados obtenidos por Docking Molecular permitiendo depurar los resultados aun más, además este enfoque permite identificar interacciones críticas en la estabilidad del complejo(19), sin embargo, el estudio de la estructura electrónica de las interacciones (Calculos cuánticos) puede ser un mejor enfoque ya que se puede estudiar de forma más exacta el efecto de interacciones como las de Van Der Waals que median las interacciones hidrofóbicas (fuerzas de London).

Bibliografía

1. Becker N, editor. Mosquitoes and their control. 2nd ed. Heidelberg: Springer; 2010. 577 p.
2. Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications: A century of Bacillus thuringiensis. Plant Biotechnol J. abril de 2011;9(3):283-300.
3. Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. Bacillus thuringiensis Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. Toxins. 11 de diciembre de 2014;6(12):3296-325.
4. Mahlapuu M, Björn C, Ekblom J. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges. Crit Rev Biotechnol. 12 de agosto de 2020;1-15.
5. Seyfi R, Kahaki FA, Ebrahimi T, Montazersaheb S, Eyvazi S, Babaeipour V, et al. Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. Int J Pept Res Ther. septiembre de 2020;26(3):1451-63.
6. Soares TS, Watanabe RMO, Lemos FJA, Tanaka AS. Molecular characterization of genes encoding trypsin-like enzymes from Aedes aegypti larvae and identification of digestive enzymes. Gene. diciembre de 2011;489(2):70-5.

7. D'Silva NM, O'Donnell MJ. Mechanisms of transport of H⁺, Na⁺ and K⁺, across the distal gastric caecum of larval *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol.* febrero de 2020;121:103997.
8. Muhlia-Almazán A, Sánchez-Paz A, García-Carreño FL. Invertebrate trypsin: a review. *J Comp Physiol B.* agosto de 2008;178(6):655-72.
9. Farhadi T, Hashemian SM. Computer-aided design of amino acid-based therapeutics: a review. *Drug Des Devel Ther.* mayo de 2018;Volume 12:1239-54.
10. Jokar S, Erfani M, Bavi O, Khazaei S, Sharifzadeh M, Hajiramezanali M, et al. Design of peptide-based inhibitor agent against amyloid- β aggregation: Molecular docking, synthesis and in vitro evaluation. *Bioorganic Chem.* septiembre de 2020;102:104050.
11. Abde, Benarous K, Yousfi M. Novel Structural Mechanism of Glutathione as a Potential Peptide Inhibitor to the Main Protease (Mpro): Covid-19 Treatment, Molecular Docking and SAR Study [Internet]. 2020 abr [citado 7 de octubre de 2020]. Disponible en: https://chemrxiv.org/articles/Novel_Structural_Mechanism_of_Glutathione_as_a_Potential_Peptide_Inhibitor_to_the_Main_Protease_Mpro_Covid-19_Treatment_Molecular_Docking_and_SAR_Study/12153021
12. Kaushik V. In Silico Identification of Epitope-Based Peptide Vaccine for Nipah Virus. *Int J Pept Res Ther.* junio de 2020;26(2):1147-53.
13. Lee AC-L, Harris JL, Khanna KK, Hong J-H. A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design. *Int J Mol Sci.* 14 de mayo de 2019;20(10):2383.
14. Lewies A, Du Plessis LH, Wentzel JF. Antimicrobial Peptides: the Achilles' Heel of Antibiotic Resistance? *Probiotics Antimicrob Proteins.* junio de 2019;11(2):370-81.
15. Arias M, Orduz S, Lemeshko VV. Potential-dependent permeabilization of plasma membrane by the peptide BTM-P1 derived from the Cry11Bb1 protoxin. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* febrero de 2009;1788(2):532-7.
16. London N, Raveh B, Cohen E, Fathi G, Schueler-Furman O. Rosetta FlexPepDock web server—high resolution modeling of peptide–protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 1 de julio de 2011;39(suppl_2):W249-53.
17. Waghugh FH, Idicula-Thomas S. Collection of antimicrobial peptides database and its derivatives: Applications and beyond. *Protein Sci.* enero de 2020;29(1):36-42.
18. Nardo AE, Añón MC, Quiroga AV. Identification of renin inhibitors peptides from amaranth proteins by docking protocols. *J Funct Foods.* enero de 2020;64:103683.
19. Kilburg D, Gallicchio E. Recent Advances in Computational Models for the Study of Protein–Peptide Interactions. En: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* [Internet]. Elsevier; 2016 [citado 8 de octubre de 2020]. p. 27-57. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876162316300293>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Código	Nombre Proteína	Longitud	Organismo	Plantilla	Nombre proteína	Organismo	%Identidad
P29786	Trypsin 3A1	254	<i>Aedes aegypti</i>	2EEK_A	Tripsin-1	<i>Gadus morhua</i>	41
P29787	Trypsin 5G1	266	<i>Aedes aegypti</i>	1HJ8_A	Trypsin I	<i>Salmo salar</i>	43
P35035	Trypsin-1	274	<i>Anopheles gambiae</i>	2ZPQ_A	Anionic trypsin	<i>Oncorhynchus keta</i>	44
P35036	Trypsin-2	277	<i>Anopheles gambiae</i>	2ZPR_B	Anionic trypsin	<i>Oncorhynchus keta</i>	44
P35037	Trypsin-3	275	<i>Anopheles gambiae</i>	2ZPR_B	Anionic trypsin	<i>Oncorhynchus keta</i>	44
P35037	Trypsin-4	275	<i>Anopheles gambiae</i>	1MBQ_A	Trypsin	<i>Oncorhynchus keta</i>	43
P35039	Trypsin-5	274	<i>Anopheles gambiae</i>	2ZPR_B	Anionic trypsin	<i>Oncorhynchus keta</i>	40
P35040	Trypsin-6	273	<i>Anopheles gambiae</i>	1MBQ_A	Trypsin	<i>Oncorhynchus keta</i>	40
P35041	Trypsin-7	267	<i>Anopheles gambiae</i>	2ZPS_A	Anionic trypsin	<i>Oncorhynchus keta</i>	45
Q8T639	Larval chymotrypsin-like protein	257	<i>Aedes aegypti</i>	2HLC_A	Collagenase	<i>Hypoderma lineatum</i>	42
Q86PL8	Larval late trypsin	257	<i>Aedes aegypti</i>	1EQ9_B	Chymotrypsin-1	<i>Solenopsis invicta</i>	43

Tabla S1. Tripsinas modeladas con sus respectivas plantillas

Uniprot ID	Core (%)	Regiones permitidas (%)	Regiones semi-permitidas (%)	Regiones no-permitidas (%)	Z-score
P29786	81.9	17.0	0.5	0.5	-7.77
P29787	84.0	13.9	1.6	0.5	-8.74
P35035	82.5	14.8	2.1	0.5	-8.35
P35036	82.8	15.1	1.1	1.1	-7.68
P35037	84.3	14.7	0.0	1.0	-8.02
P35038	83.2	15.3	0.5	1.1	-8.48
P35039	84.1	13.2	1.1	1.6	-8.27
P35040	85.0	13.4	1.1	0.5	-7.65
P35041	80.3	16.1	2.1	1.6	-7.6
Q8T639	83.9	15.1	0.5	0.5	-7.45
Q86PL8	86.6	12.4	0.5	0.5	-8.43

Tabla S2. Resultado test de Ramachandran

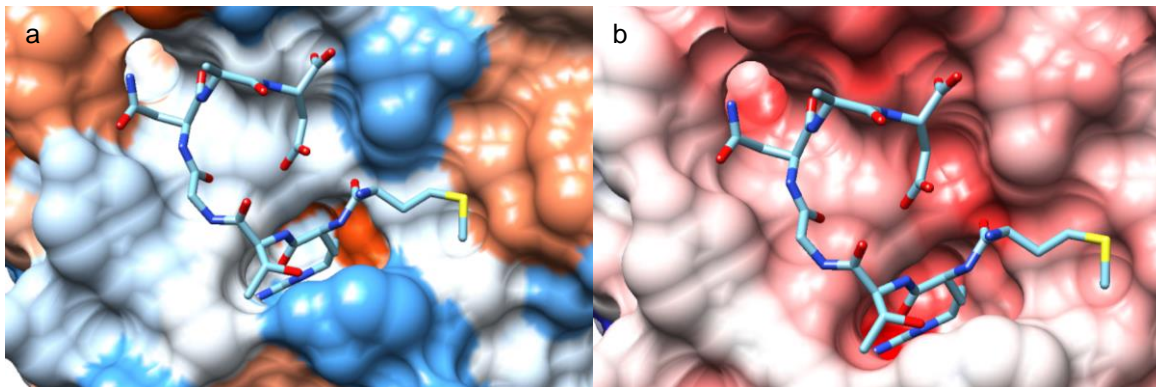


Figura S1. Análisis de hidrofobicidad (a) y potencial electrostático (b) tripsina 5G1 (*A. aegypti*) – AP01**6

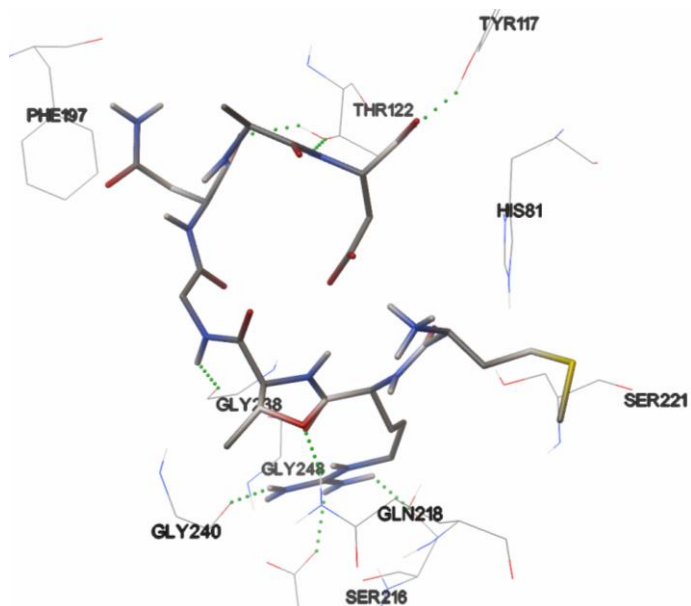


Figura S2. Interacciones intermoleculares entre el péptido AP01**6 y la tripsina 5G1 de *A. aegypti*

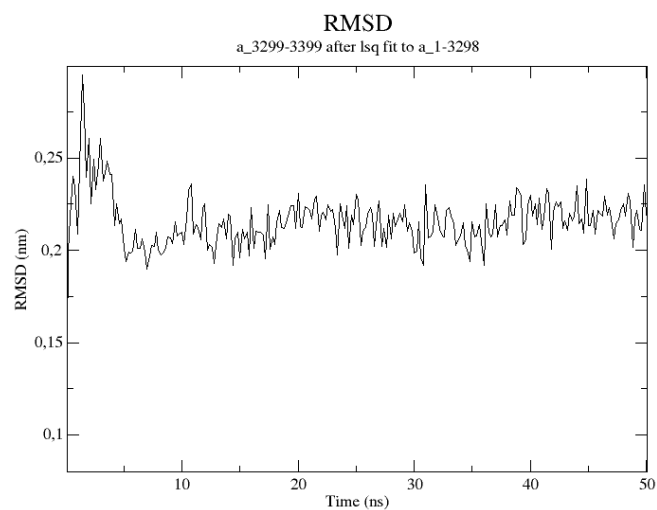
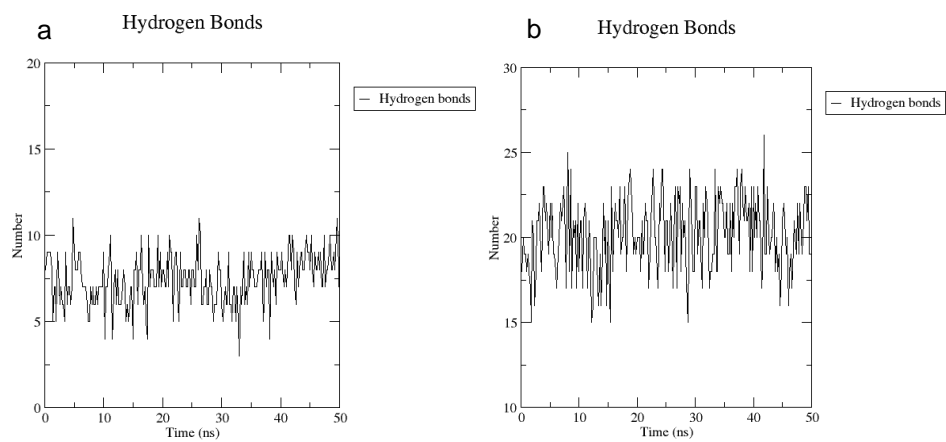


Figura S3. RMSD proteína-péptido tripsina 5G1 (*A. aegypti*) – AP01**6



C

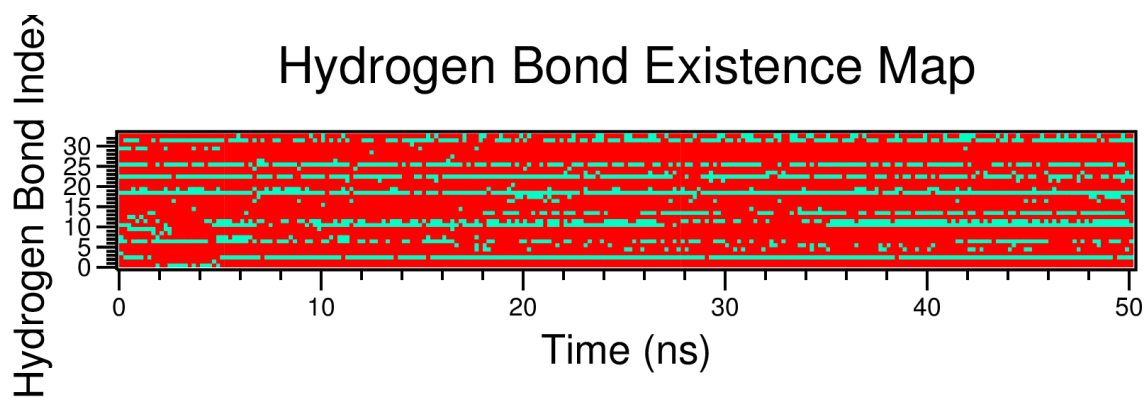


Figura S4. Puentes de Hidrógeno proteína-péptido (a) y péptido-solvente (b) del complejo entre la tripsina 5G1 (*A. aegypti*) – AP01**6, estabilidad puentes de hidrógeno proteína-péptido (c). Azul: presente, Rojo: ausente