

# Interacción *in silico* de péptidos antimicrobianos de anfibios contra *Klebsiella pneumoniae* KPC y su biopelícula

07-09-2025

Nombres y apellidos del/la estudiante  
UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Firma del tutor/a: \_\_\_\_\_

FO-GDC-138-V.1.0

Página 0 de 10

## Contenido

1	Antecedentes	2-3
2	Planteamiento del problema a investigar	3-4
3	Justificación de la investigación	4
4	Preguntas de investigación	4-5
5	Hipótesis	5
6	Objetivos de la investigación	5
6.1	General	5
6.2	Específicos	5
7	Métodos	6-7
8	Cronograma de actividades	7
9	Presupuesto referencial	7
10	Referencias bibliográficas	8-9

José Pardo<sup>1</sup> & Cristina Quiroga<sup>2</sup>

1. Facultad Ciencias de la Vida, Universidad Regional Amazónica Ikiam, Tena 150102, Ecuador.

2. Grupo de Investigación en bioinformática, Universidad Regional Amazónica Ikiam, Tena 150102, Ecuador.

## 1 Resumen

Las estadísticas de resistencia a los antimicrobianos (RAM) e infecciones bacterianas multirresistentes (MDR) han tenido un crecimiento imponente, destacando a *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas (KPC) –patógeno ESKAPE prioritario para la OMS– por su capacidad de formar biopelículas y sus variados mecanismos de resistencia a los antibióticos. Ante esta preocupación, este estudio propone una estrategia *in silico* que combina péptidos antimicrobianos (AMPs) de origen anfibio con antibióticos de tercera generación (meropenem, ampicilina, ampicilina/Sulbactam), para combatir dichas barreras. Inicialmente, se modelarán blancos moleculares clave: *MrkA* y *fimH*, que regulan la expresión de las fimbrias tipo 3 y tipo 1 en biopelículas; *pgaC* y *pgaD*, enzimas que intervienen en la biosíntesis y transporte de polímeros clave para la formación de la matriz extracelular. Los AMPs se optimizarán mediante predicción estructural (I-tasser). Así mismo, mediante acoplamiento molecular (Autodock Vina) y simulaciones de dinámica molecular (GROMACS), se evaluará la afinidad de unión ( $\Delta G$ ), interacciones con los blancos y penetración en bicapas lipídicas. Se anticipa alta afinidad de AMPs por blancos y estabilidad en simulaciones, corroborando su potencial disruptor de biopelícula. Se espera además una acción sinérgica con los antibióticos, facilitando su interiorización y proponiendo alternativas terapéuticas viables contra infecciones por KPC para mejorar significativamente las opciones de tratamiento y reducir el impacto de la RAM en la salud pública.

**Keywords:** Aztreonam/Sulbactam, Biofilm, Dinámica molecular, Sinergia.

## 2 Antecedentes

*Klebsiella pneumoniae* es un bacilo Gram-negativo encapsulado, catalogado por la OMS como patógeno ESKAPE crítico por su elevada resistencia antimicrobiana y capacidad de formar biopelículas (Gauba & Rahman, 2023). Su envoltura celular, rica en lipopolisacáridos (LPS) y porinas, actúan como barrera primaria contra antimicrobianos (Rocker et al., 2020). Los mecanismo de resistencia en KPC combinan tor (1)  $\beta$ -lactamasas que hidrolizan carbapenémicos (2) modificación de porinas que reducen su permeabilidad y (4) Bombas de eflujo que expulsan quinolonas (KpAcrAB o AcrAB-TolC) (Gauba & Rahman, 2023; Muñoz Guevara, 2024).

Así mismo, otro factor clave de supervivencia y virulencia en *K. pneumoniae* (posiblemente el más peligroso) es la biogénesis de las películas. La matriz de biofilm en KPC, que está compuesta principalmente por PGA (poli- $\beta$ -1,6-N-acetilglucosamina), proteínas y ADN, incrementa 1.000 a 1.500 veces la resistencia antibiótica (de Oliveira & Franco, 2020). Su formación está regulada por una serie de factores moleculares clave, como enzimas implicadas en la biosíntesis y transporte de polisacáridos (*pgaC* y *pgaD*) (Chen et al., 2014; Li & Ni, 2023). La señalización, mediada por c-di-GMP (Zhang et al., 2020), promueve la expresión de adhesinas, componentes clave en la formación inicial del biofilm; entre ellos, fimbrias tipo 1 (*fimH*) y tipo 3 (*MrkA*); actuando como una barrera física que protege a la bacteria del efectos de los antimicrobianos (Li & Ni, 2023; Schroll et al., 2010). Mutaciones en genes como *pgaC* (Chen et al., 2014) y *fimH* (Qin et al., 2022) disminuyen significativamente la capacidad de adhesión y formación de biopelículas.

Frente a este problema, los péptidos antimicrobianos (AMPs) de origen anfibio emergen como una alternativa prometedora, debido a su naturaleza catiónica y anfipática, que les permite interactuar directamente con LPS y membranas bacterianas, provocando disrupción de las mismas sin necesidad de ingresar por canales específicos (de Oliveira et al., 2020). Estos péptidos, al ser naturales, presentan una diversidad estructural notable y un potencial aún poco explorado en estrategias terapéuticas combinadas.

La aplicación de herramientas bioinformáticas como el acoplamiento molecular y las simulaciones de dinámica molecular permite optimizar su diseño y evaluar de manera costo-efectiva su afinidad con blancos moleculares relevantes, ofreciendo información detallada sobre afinidad de unión, estabilidad estructural y comportamiento dinámico de complejos molécula-proteína, sin necesidad de realizar ensayos experimentales. Esto abre la posibilidad de diseñar combinaciones terapéuticas inteligentes, donde un péptido antimicrobiano pueda debilitar la barrera física (biofilm) y permitir la entrada de un antibiótico que por sí solo no sería efectivo debido a los mecanismos de resistencia intrínsecos de la bacteria.

### **3 Planteamiento del problema a investigar (máx. 350 palabras)**

La emergencia global de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas (KPC) representa una crisis terapéutica de magnitud creciente, agravada por dos factores interconectados: 1) la rápida diseminación de mecanismos de resistencia ( $\beta$ -lactamasas KPC, NDM) y la formación de biopelículas que reducen la penetración de antibióticos (de Oliveira & Franco, 2020; Goswami et al., 2023). Aunque las terapias combinadas (ceftazidima/avibactam) muestran inicialmente eficacia,

presentan tasas de fracaso del 40% debido a mutaciones en porinas y sobreexpresión de bombas de eflujo (León & Zurita, 2024).

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) surgieron como alternativa promisorio, a pesar de enfrentar limitaciones no resueltas como corto tiempo de vida medio en sueros humanos (>30 min) y citotoxicidad (Mahlapuu et al., 2020). Aunque los modelos *in silico* abarcan desde el diseño de moléculas mediante el modelado de la estructura química hasta la simulación de su comportamiento en sistemas biológicos complejos, incluyendo la predicción ADMET, estos ignoran variables críticas como mutaciones de los blancos o la sobreexpresión de bombas de eflujo (y su variabilidad) (ej. residuo Asp566 en AcrB) (León & Zurita, 2024). Esta brecha entre predicción computacional y eficacia clínica real exige un rediseño radical de las estrategias antibacterianas, priorizando blancos con relevancia dual en resistencia y virulencia, y combinaciones farmacológicas inmunes a degradación enzimática y que su efecto no se vea limitado por el biofilm (de Oliveira et al., 2020; León & Zurita, 2024; Mahlapuu et al., 2020).

#### **4 Justificación de la investigación**

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se han convertido en una de las principales amenazas globales, con proyecciones imponentes de hasta 10 millones de muertes anuales para 2050, además de repercusiones económicas significativas (O'Neill, 2016). Actualmente, el desarrollo de nuevos antibióticos se ha estancado con solo 12 moléculas en fase clínica para bacterias Gram-negativas prioritarias. Esta situación se agrava con la capacidad de formar biofilms, estructuras altamente protectoras que impiden que los fármacos alcancen sus blancos intracelulares de (Oliveira et al., 2020).

Este proyecto busca explorar, a través de técnicas de dinámica molecular, el potencial sinérgico entre péptidos naturales derivados de anfibios y antibióticos ya existentes. La idea central es que los péptidos actúen como disruptores iniciales del biofilm, para potenciar la entrada farmacológica. Al realizar esta evaluación de manera computacional, se optimizan recursos y se predicen combinaciones con mayor probabilidad de éxito, evitando costos de equipos y reactivos (León & Zurita, 2024).

#### **5 Preguntas de investigación**

¿Qué péptidos antimicrobianos derivados de anfibios presentan mayor afinidad por proteínas clave de la matriz biofilm de *K. pneumoniae*, como *PgaC* y *PgaD*?

¿Es posible predecir, mediante simulación molecular, la capacidad de un péptido para desestructurar la matriz del biofilm?

¿Cómo varía la interacción de un antibiótico con el biofilm antes y después del tratamiento con un péptido antimicrobiano?

¿Qué combinaciones de péptido y antibiótico muestran mayor efecto sinérgico en términos de acceso y unión a blancos moleculares?

## 6 Hipótesis

Los péptidos antimicrobianos de origen anfibio son capaces de interactuar y alterar la arquitectura de la matriz biofilm de *K. pneumoniae* KPC, específicamente a través de su unión con proteínas como *PgaC* y *PgaD*, lo que facilita la posterior penetración y acción de antibióticos convencionales. Esta sinergia puede ser predicha y evaluada mediante modelado y simulaciones moleculares.

## 7 Objetivos de la investigación

### 7.1 General

- Analizar *in silico* la interacción entre péptidos antimicrobianos derivados de anfibios y antibióticos de tercera generación frente a componentes estructurales del biofilm de *Klebsiella pneumoniae* KPC, con énfasis en la identificación de sinergias que favorezcan la penetración del fármaco.

### 7.2 Específicos

- Seleccionar y modelar estructuralmente péptidos antimicrobianos de origen anfibio con potencial acción anti-biofilm.
- Obtener y validar las estructuras tridimensionales de las proteínas *PgaC* y *PgaD*, implicadas en la síntesis del biofilm.
- Realizar estudios de docking molecular para evaluar la afinidad entre péptidos y proteínas blanco.
- Simular dinámicamente los complejos formados entre péptidos y proteínas del biofilm para evaluar su estabilidad y efectos estructurales.
- Evaluar el comportamiento sinérgico de complejos que combinan péptidos antimicrobianos y antibióticos frente a la matriz biofilm.

## 8 Métodos

### 8.1 Selección y modelado de péptidos

- Se utilizarán péptidos generados en el Laboratorio de investigación en Biología Molecular, IKIAM, con resultados prometedores de evaluaciones in vitro sobre actividad antimicrobiana.
- Las estructuras tridimensionales se modelará mediante herramientas como PEP-FOLD3 o AlphaFold2.

## 8.2 Preparación de proteínas blanco

- Se buscarán las estructuras fimH, MrkA, c-di-GMP, PgaC y PgaD en el PDB. De no estar disponibles, se utilizarán métodos de modelado por homología con I-TASSER o Swiss-Model.
- La validación estructural se hará con MolProbity y análisis de Ramachandran.

## 8.3 Docking molecular

- Para la preparación de los ligandos (péptidos): Minimización de energía de AMPs (Avogadro) y asignación de cargas Gasteiger (Openbabel)
- Se utilizará AutoDock Vina para el acoplamiento molecular entre ligandos y blancos (*PgaC*, *PgaD*).
- Se analizarán energías de unión, residuos clave, y posibles mecanismos de bloqueo o desestabilización.

## 8.4 Simulación de dinámica molecular

- Se realizarán simulaciones con GROMACS para analizar la estabilidad de los complejos péptido–proteína, fármaco–proteína y combinación péptido + fármaco.
- Se evaluarán la accesibilidad del antibiótico mediante parámetros como número de contactos hidrofóbicos con el sitio activo, desplazamiento estructural (RMSD), fluctuaciones de distancia proteína-ligando (RMSF), y energía libre de unión (MM-PBDA) comparada con sistemas sin AMP.
- Se aplicará MM-PBSA para estimar la energía libre de unión de los complejos.

## 8.5 Evaluación sinérgica

- Se simularán sistemas ternarios (blanco + AMP + antibiótico) en bicapas lipídicas asimétricas que repliquen la membrana externa KPC (75% LPS, 25% fosfolípidos) para observar si la presencia del péptido modifica la accesibilidad

del antibiótico a su blanco.

- Se compararán los resultados con simulaciones individuales para determinar la presencia de sinergia estructural o funcional.
- Se documentarán interacciones que sugieran un mecanismo de acción combinado que pueda ser explorado en ensayos experimentales posteriores.

## 9 Cronograma de actividades

Cronograma semanal de actividades para evaluar la actividad sinérgica de péptidos + antibióticos + blancos																																																
Actividad/Semana	Julio				Agosto				Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre				Enero				Febrero				Marzo				Abril				Mayo				Junio			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
Revisión bibliográfica	x	x	x	x																																												
Preparación en dinámica molecular					x	x	x	x																																								
Selección y modelado de blancos moleculares									x	x	x	x																																				
Selección y modelado de péptidos antimicrobianos derivados de antibios													x	x	x	x																																
Ejecución de docking molecular.																	x	x	x	x																												
Análisis de resultados del docking (energía, tipo de interacción, mapas de calor, etc.)																					x	x	x	x																								
Simulación de dinámica molecular																									x	x	x	x	x	x	x	x																
Evaluación sinérgica																													x	x	x	x																
Discusión de resultados, conclusiones y redacción del informe																																	x	x	x	x	x	x	x	x								
Preparación de exposición final																																									x	x	x	x				

## 10 Presupuesto referencial

Rubros	Financiamiento IKIAM	Financiamiento efectivo	Total USD
<b>Computadora con requerimientos óptimos para DM</b>	0 \$	0 \$	5000 \$
<b>Licencias de software</b>	0 \$	0 \$	2000 \$
<b>Total</b>			7000 \$

## 11 Referencias bibliográficas

Chen, K., Chiang, M., Wang, M., Ho, H., Lu, M., & Lai, Y. (2014). The role of pgaC in *Klebsiella pneumoniae* virulence and biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*, 77, 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.11.005>

De Oliveira Júnior, N. G., & Franco, O. L. (2020). Promising Strategies for Future Treatment of *Klebsiella Pneumoniae* Biofilms. *Future Microbiology*, 15(1),

63-79. 10.2217/fmb-2019-0180

Gaubá, A., & Rahman, K. M. (2023). Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*, 12(11), 1590. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111590>

Goswami, A. G., Basu, S., Banerjee, T., & Shukla, V. K. (2023). Biofilm and wound healing: from bench to bedside. *European Journal Of Medical Research*, 28(1). <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01121-7>

Iñiguez, D., Zurita, J., Alcocer, I., Ortega, D., Gómez, A. M., & Maldonado, L. (2017). *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC-2: primer reporte en el Ecuador. *Revista De La Facultad De Ciencias Médicas (Quito)*, 37(1-2), 40–43. Recuperado a partir de [https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CIENCIAS\\_MEDICAS/article/view/1087](https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CIENCIAS_MEDICAS/article/view/1087)

Khan, S., Nabi, G., Ullah, M. W., Yousaf, M., Manan, S., Siddique, R., & Hou, H. (2020). \*Therapeutic potential of peptides against COVID-19: Molecular docking and dynamic simulation studies\*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(10), 2990–3002. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1624296>

León, K., & Zurita, B. (2024, 5 abril). Avances en modelos in silico para el descubrimiento rápido de fármacos: transformando la farmacología computacional. *Alfapublicaciones*. Recuperado 30 de junio de 2025, de <https://alfapublicaciones.com/index.php/alfapublicaciones/article/view/485/1307>

Li, Y., & Ni, M. (2023). Regulation of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers In Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1238482>.

Mahlapuu, M., Björn, C., & Ekblom, J. (2020). Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges. *Critical Reviews In Biotechnology*, 40(7), 978-992. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1796576>

Méndez-Samperio, P. (2020). Peptide-based vaccines: Current progress and future challenges. *Journal of Peptide Science*, 26(1), e2865. <https://doi.org/10.1002/psc.2865>

Muñoz Guevara, A. (2024) Infecciones por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC. (Tesis de Grado) Universidad Nacional de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.

FO-GDC-138-V.1.0  
Página 8 de 10

<http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/13027>

- O'Neill, J. (2016). *Tackling Drug-resistant infections globally: Final Report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance*. Wellcome Trust. <https://amr-review.org/Publications.html>
- Qin, J., Wilson, K. A., Sarkar, S., Heras, B., O'Mara, M. L., & Totsika, M. (2022). Conserved FimH mutations in the global Escherichia coli ST131 multi-drug resistant lineage weaken interdomain interactions and alter adhesin function. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 4532–4541. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.08.040>
- Rocker, A., Lacey, J. A., Belousoff, M. J., Wilksch, J. J., Strugnell, R. A., Davies, M. R., & Lithgow, T. (2020). Global Trends in Proteome Remodeling of the Outer Membrane Modulate Antimicrobial Permeability in Klebsiella pneumoniae. *mBio*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00603-20>
- Schroll, C., Barken, K. B., Krogfelt, K. A., & Struve, C. (2010). Role of type 1 and type 3 fimbriae in Klebsiella pneumoniae biofilm formation. *BMC Microbiology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-179>
- Zhang, C., Wang, C., & Xiu, Z. (2020). Regulation of c-di-GMP in Biofilm Formation of Klebsiella pneumoniae in Response to Antibiotics and Probiotic Supernatant in a Chemostat System. *Current Microbiology*, 78(1), 133-143. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02258-y>