



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Interacciones de péptidos antimicrobianos helicoidales cortos con modelos de bicapas lipídicas. Estudios de dinámica molecular.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Mario Omar García Sánchez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ramón Garduño Juárez
[Instituto de Ciencias Físicas, UNAM.](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Laura Domínguez Dueñas
[Facultad de Química, UNAM.](#)

Dra. Georgina Gurrola Briones
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Diciembre 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a los Institutos de Biotecnología y Ciencias Físicas por permitirme aprender dentro de sus aulas y laboratorios que la ciencia es una magnífica labor cuyo motor es la curiosidad. Por especializarme como profesionista y hacerme crecer en lo personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme el apoyo económico (No. de apoyo 482489/ CVU 855831) para realizar mis estudios de Maestría.

Al tiempo de computo proporcionado por la Dirección General de Cómputo y Tecnologías de la Información en la Supercomputadora HP *Cluster Platform* 3000SL (MIZTLI).

Al Dr. Ramón Garduño Juárez, por su tutoría y consejos durante el desarrollo del proyecto y al Dr. José Luis Velasco Bolom por su orientación en los momentos de dificultad.

A las miembros de mi comité tutorial, Dra. Laura Domínguez Dueñas y Dra. Georgina Gurrola Briones, por todos sus comentarios y correcciones durante la Maestría. Gracias por rectificar en varias ocasiones el proyecto.

A los miembros del jurado, Dra. Gloria Saab, Dr. Gerardo Corzo, Dra. Constance Auvynet y Dra. Elba Villegas, por cada una de sus correcciones que permitieron enriquecer y corregir muchas veces el trabajo. En especial a la Dra. Nina Pastor Colón por permitirme haber aprendido mucho de ella durante sus clases (junto con el Dr. Ángel Santiago) y por las correcciones en el proyecto. Por hacer que el mundo de la simulación molecular me sea, con cada lectura, más interesante.

A los que forman y formaron parte del Laboratorio de Modelado Molecular del ICF. En especial al Dr. Sergio Mares, por ayudarme desde el inicio con el modelado de los péptidos, al M. en C. Pavel Montero por haber sido el primero en ayudarme y al Lic. en Nanotecnología J. Manuel H. Meza por su constantes críticas y recomendaciones que me permitieron darme cuenta que siempre hay una perspectiva que no había considerado. A todos ustedes muchas gracias por hacer que el día a día fuera muy ameno.

A los que no forman como tal parte del grupo de Modelado, pero de los que he aprendido mucho en los seminarios y salidas ocasionales, Dr. Carlos Muñoz y Dr. Brandt Bertrand, muchas gracias por siempre compartir algo conmigo.

El hecho de haber realizado la maestría fuera de mi hogar me permitió comprender que hay amistades que sin importar la distancia siempre estarán conmigo. Por lo cual agradezco al Dr. José Luis Medina Franco porque siempre ha extendido su apoyo a pesar de ya no formar parte de su grupo, en verdad lo admiro mucho a usted y a su trabajo. A mi supervisor técnico de la Licenciatura, el Dr. Eli Antonio Alonso Fernández de Gortari porque todo lo que aprendí contigo sigue siendo pilar de lo que hago hoy día. A mis amigos del cubículo 108, DIFACQUIM, por seguir frecuentándonos y preguntarnos a dónde vamos. Estoy muy agradecido de haberlos conocido gracias Marianita, Fernandita, Palomino, su visión me sirve de inspiración, gracias por su amistad.

A la Dr. Irma Ofelia Bernal Lugo por todas aquellas charlas que hemos tenido y por saber escucharme y siempre darme un buen consejo, gracias por compartir su experiencia.

A Amairani Ramírez porque sin importar el tiempo sigues al pendiente de nuestra amistad. A mis amigas de la Prepa Lucero, Dulce y Gaby, por seguir conviviendo hoy día, estoy seguro que esto va a durar toda una vida; en especial a Lucero por apoyarme a mí y a mi familia. A mis amigos de toda la carrera: Lidia, “chiquita”, eres como mi hermana muchas gracias por siempre estar al tanto de mí, te quiero y admiro mucho. Ignacio, por ser mi amigo y hermano, por convivir mucho conmigo mientras estaba por acá. Vale, “bodo”, porque a pesar de la distancia sigues preocupándote por mí. Raúl, desde que te conozco te he considerado un muy buen amigo, tú no puedes faltar en esta lista.

A mis amigos, la IBQ Alejandra De los Santos por siempre escucharme y nunca dejarme sólo, por compartir y disfrutar de la vida. Al Físico Francisco Espinosa por compartir tus pensamientos y escuchar los míos, por cada uno de los momentos que disfrutamos y sufrimos. A los dos quiero agradecerles porque su amistad volvió comfortable estar lejos de casa, desde hace tiempo los considero parte de mi familia. Siempre que los deseen estaré para ustedes, los quiero mucho, amigos.

A todos mis amigos de primer semestre de la Maestría porque en ellos encontré el medicamento perfecto para el estrés. Agradezco en especial a Jorge Jiménez, Arturo Liñan, Jaime Rosas, Ivette García, Miguel Bello, Axel Donjuan, Thalia Barrientos y Brenda Tranquilino; gracias por hacerme crecer en lo académico y en lo personal, por su amistad y por todo el conocimiento que me compartieron.

A todos los que no he escrito aquí, no se ofendan, también les agradezco mucho.

A mi mamá y papá (Lourdes Sánchez y Cecilio Gutiérrez)

Por apoyarme en todo momento, animarme en la buenas y en las malas, darme ese respiro necesario para continuar, compartir tanto sin pedir nada a cambio; gracias por todo su esfuerzo y dedicación en mí. Por todo el amor sin restricciones, los amo.

A mi hermana (Lilia García)

Por animarme a realizar este proyecto desde el inicio, porque siempre motivas cada uno de mis sueños. Por ser muy fuerte y hacernos sentir cosas únicas como familia. Te quiero y amo mucho, hermanita. También se la dedico a Jorge García por apoyarte sin condiciones y amarte diario.

A Luna García

Porque siempre fuiste y serás amada

ABREVIATURAS GENERALES	i
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	ii
RESUMEN	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Resistencia antimicrobiana	3
2.2 Péptidos antimicrobianos	4
2.3 Composición lipídica de membranas	7
2.4 Péptidos antimicrobianos cortos (variantes)	9
2.5 Modelado por homología	10
2.6 Dinámica molecular	11
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVOS	13
4.1 Objetivo general	13
4.1 Objetivos particulares	13
5. METODOLOGÍA	14
5.1 Modelado estructural de los PAMs	14
5.1.1 Búsqueda de plantillas y alineamientos	14
5.1.2 Selección de la plantilla	14
5.1.3 Construcción de los modelos	16
5.1.4 Selección de los modelos	16
5.1.5 Evaluación de los modelos	17

5.1.6 Minimización energética	18
5.2 Membrana lipídica	18
5.3 Sistemas PAM-Membrana	19
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1 Modelado estructural de los PAMs	22
6.2 Membrana lipídica	30
6.3 Sistemas PAM-Membrana	34
6.3.1 Estructura secundaria	35
6.3.2 Comportamiento del PAM	37
6.3.3 Comportamiento de la Membrana	41
6.3.4 Interacciones PAM-Membrana	44
6.3.5 Energías de Unión	57
6.4 Actividad biológica y simulación	63
7. CONCLUSIONES	68
8. PERSPECTIVAS	68
ANEXO I	69
ANEXO II	76
ANEXO III	77
ANEXO IV	79
ANEXO V	81
REFERENCIAS	83

ABREVIATURAS GENERALES

aa	aminoácido(s)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
APL	Área por lípido
CL	Cardiolipina
CME	Criomicroscopía electrónica
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COM	Centro de masa (<i>Center of mass</i>)
CX	Cristalografía de rayos X
DM	Dinámica Molecular
Ec	<i>Escherichia coli</i>
PAMC	Péptido antimicrobiano corto
PAMs	Péptido(s) antimicrobiano(s)
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PME	<i>Particle mesh Ewald</i>
PS	Fosfatidilserina
PO	Palmitoil-oleil
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Raíz de la desviación cuadrática media (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
SM	<i>Sphingomyelin</i>

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Mecanismos de resistencia antimicrobiana	4
Figura 2. Determinantes fisicoquímicos y estructurales de los PAMs	5
Figura 3. Mecanismos de acción de los PAMs y composición membranal ...	7
Figura 4. Fosfolípidos y otros componentes de membranas	8
Figura 5. Diagrama del modelado por homología	11
Figura 6. Diagrama de caja-bigote para C _{ss} 5414	15
Figura 7. Diagrama de flujo para el modelado estructural de los PAMs	17
Figura 8. Sistemas generados para la simulación	20
Figura 9. Gráfica de <i>Score</i> vs RMSD para C _{ss} 5414	24
Figura 10. Comparación de estructuras con y sin plantilla	26
Figura 11. Evaluación del modelo de La47	28
Figura 12. Evaluación del modelo de C _{ss} 54	28
Figura 13. Estructuras de los modelos de C _{ss} 54, La47 y variantes	29
Figura 14. Comportamiento de a) temperatura y b) presión de las bicapas .	30
Figura 15. Área por lípido (APL) y grosor de la membrana	31
Figura 16. Parámetro de orden para las cadenas alifáticas en las bicapas ..	32
Figura 17. Densidad de los componentes de a) POPC y b) POPG	33
Figura 18. Estructura secundaria de C _{ss} 54 con POPG en 200 ns	36
Figura 19. RMSD para C _{ss} 54 y sus variantes con membranas de POPC y POPG para la réplica uno	38
Figura 20. RMSD para La47 y sus variantes con membranas de POPC y POPG para la réplica uno	39
Figura 21. Ángulos respecto a la membrana para La47 y La4715E con POPC y POPG	41
Figura 22. Mapa de calor para la distribución del grosor de membrana de C _{ss} 5415E con POPC	43

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 23. Css5415E con POPC para la réplica uno	43
Figura 24. Css54 y sus variantes con POPC y POPG para la réplica uno ...	45
Figura 25. La47 y sus variantes con POPC y POPG para la réplica uno	46
Figura 26. Comportamiento de los residuos de Css5414 con POPG (capa superior) a lo largo de 200 ns de la primera réplica	47
Figura 27. Interacciones relevantes de Css54 y algunas variantes con POPC y POPG	48
Figura 28. Interacciones de Css5414 con POPG	50
Figura 29. Interacciones de La47 y algunas variantes con POPG	50
Figura 30. Comportamiento de los residuos de La4715 con POPG	52
Figura 31. POPG como donador y aceptor y POPC como aceptor de puentes de hidrógeno	54
Figura 32. Puentes de hidrógeno de residuos con carga	54
Figura 33. Interacción catión- π para Css5414 con POPC	57
Figura 34. Interacción de algunos PAMs con la membrana	59
Figura 35. Interacción del ácido glutámico con POPC	60
Figura 36. Interacción de la Phe1 y Arg3 de Css5415E con POPC en la réplica uno	60
Figura 37. Energías de unión totales para Css54, La47 y variantes	65
Figura 38. Modificaciones generales a los PAMs	66
Tabla 1. Secuencia y actividad antimicrobiana y hemolítica de Css54, La47 y variantes	9
Tabla 2. Composición de cada sistema simulado	19
Tabla 3. Plantillas seleccionadas para Css54 y sus variantes	22

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 4. Plantillas seleccionadas para La47 y sus variantes	23
Tabla 5. Modelos generados para La47 y Css54	25
Tabla 6. Parámetros calculados para las membranas de POPC y POPG en simulaciones de 200 ns	34
Tabla 7. Proporción de estructura secundaria de los PAMs en las tres réplicas	35
Tabla 8. Promedios de los ángulos de inclinación de POPC y POPG para cada réplica	40
Tabla 9. Promedios del grosor de membrana (P-P) y del área por lípido	42
Tabla 10. Promedio del porcentaje (en decimales) del tiempo en que los COM de Css54, La47 y variantes, cumplen con el criterio de distancia	46
Tabla 11. Promedio del porcentaje (en decimales) del tiempo en que los residuos, de Css54 y variantes, cumplen con el criterio de distancia	49
Tabla 12. Promedio del porcentaje (en decimales) del tiempo en que los residuos, de La47 y variantes, cumplen con el criterio de distancia	51
Tabla 13. Número promedio de puentes de hidrógeno para Css54 y variantes	53
Tabla 14. Número promedio de puentes de hidrógeno para La47 y variantes	55
Tabla 15. Promedio del porcentaje (en decimales) del tiempo en que los residuos cumplen con el criterio de distancia para interacciones catión- π ...	56
Tabla 16. Contribuciones energéticas de los sistemas para la réplica uno ..	58
Tabla 17. Energía de unión promedio por residuos, en KJ/mol, para Css54 y variantes	61
Tabla 18. Energía de unión promedio por residuos, en KJ/mol, para La47 y variantes	62

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue investigar péptidos catiónicos cortos con el fin de identificar características estructurales comunes que podrían ser útiles para el diseño de péptidos-miméticos con propiedades farmacológicas mejoradas y con actividad contra bacterias.

Esta búsqueda se enfocó en los péptidos antimicrobianos (PAMs) C_{ss}54 y La47, aislados de los venenos de *Centruroides suffusus suffusus* (escorpión endémico de México) y *Lashesana sp.* (araña), respectivamente. Estos péptidos y sus variantes cortas, que hemos llamado péptidos antimicrobianos cortos (PAMCs) han mostrado diferencias importantes en sus actividades antibacterianas y hemolíticas (información no publicada). Para conocer como estos PAMCs interactúan con modelos de membrana bacteriana (POPG) y de eritrocito (POPC), se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular por 200 ns utilizando Gromacs 5.1.4. Para establecer correlaciones entre su estructura y función, se determinaron algunas propiedades, tales como: su estructura secundaria y su conformación cuando están unidos a la membrana, así como aquellas relacionadas con la estructura de la membrana, como son el área por lípido, los puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, π -catión y las energías de unión. El análisis de los resultados indicó que estos PAMCs interactúan con las membranas, principalmente, a través de su extremo N-terminal, con la ayuda de los residuos cercanos al extremo (hidrofóbicos y cargados positivamente). En general se observó mayor estabilidad en la interacción con membranas de POPG que con aquellas de POPC. Sin embargo, esto no indicó que los péptidos interactuaran con la región no polar (de ácidos grasos de POPG), algo que sucede con POPC; fenómeno relacionado a la adecuada orientación del PAM que permite interactuar a residuos hidrofóbicos. También que el Glu no favorece la interacción con membranas de POPG pero la Arg sí lo hace con este tipo de bicapas.

1. INTRODUCCIÓN

En 2017, la Organización Mundial de la Salud publicó por primera vez una lista de bacterias patógenas resistentes a múltiples antibióticos para las cuales se requieren nuevos tratamientos de manera urgente. La lista incluye *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, etc), *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* y *Neisseria gonorrhoeae*, sólo por mencionar algunas [1]. Infecciones con este tipo de bacterias pueden ser serias y los tratamientos actuales son poco efectivos o nulos, poniendo en riesgo la vida de las personas.

La búsqueda de nuevos agentes antibacterianos efectivos contra las bacterias patógenas resistentes a todos los antibióticos disponibles ha llevado a prestar atención a los Péptidos Antimicrobianos (PAMs). Los PAMs son parte del sistema inmune innato de muchas especies y han demostrado actividad antimicrobiana contra una amplia gama de microorganismos, incluidos las bacterias multirresistentes, levaduras, hongos y virus [2]. A pesar de ser considerados como nuevos antibióticos se ha identificado que se puede adquirir resistencia a estos [3]. Además, existen algunos obstáculos en el uso de PAMs como candidatos terapéuticos, como la generación hemólisis, la falta de estabilidad y los altos presupuestos necesarios para la fabricación (desde 50 hasta 400 dólares por gramo) [4] [5]. Sin embargo, presentan algunas ventajas en comparación con el uso tradicional de moléculas pequeñas, tales como, los productos de degradación son aminoácidos, los cuales tiene un tiempo de vida media corto, evitando una gran acumulación en tejidos y aumentando la seguridad. También, son menos inmunogénicos que las proteínas recombinantes y los anticuerpos [6]. Hasta el 2018, 70 PAMs se encontraban en fase de desarrollo como candidatos a fármacos, la Daptomicina es el único PAM aprobado por la FDA (*Federal Drug Administration*) y se utiliza para infecciones contra bacterias Gram (+) multirresistentes [4]. En la literatura se pueden encontrar diferentes enfoques para mejorar la actividad antibacteriana de los péptidos antimicrobianos cortos (PAMCs) cuyo número de amino ácidos no es mayor a 15 [7] [8] . Los PAMCs tienen algunas ventajas

económicas y clínicas ya que se pueden sintetizar rápida y fácilmente, modificarse y optimizarse.

Los PAMs se han estudiado durante tres décadas, y aún falta una comprensión molecular clara de su mecanismo de acción. Se sabe que su actividad está relacionada a su unión con la membrana microbiana, aunque ésta no siempre es el único sitio de interacción [9]. Características como su carga neta, anfipaticidad, hidrofobicidad y estructura secundaria también definen su actividad.

La aplicación de la dinámica molecular (DM) a modelos de sistemas donde se permita que los PAMCs y membranas de fosfolípidos tengan algún tipo de contacto fisicoquímico en su interfaz puede ayudar a comprender mejor el tipo de interacciones que favorecen la inhibición del crecimiento bacteriano y que disminuyan el efecto hemolítico [10]; y así desarrollar un diseño racional que permita disminuir costos y tiempo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Resistencia antimicrobiana

La resistencia a antibióticos se hace notoria cuando un fármaco pierde su capacidad para inhibir de manera efectiva el crecimiento de una bacteria. Las bacterias se vuelven resistentes y continúan multiplicándose en presencia de niveles terapéuticos de antibióticos. Además, el fenómeno se ve favorecido por el uso innecesario, dosis incorrectas, la interrupción prematura del tratamiento, la mala calidad de éstos, una pobre prevención de las infecciones y por el consumo de animales de granja a los cuales se les administraron antibióticos [11].

Desde una perspectiva evolutiva, las bacterias pueden usar dos estrategias genéticas para adaptarse al ataque del antibiótico: 1) mutaciones en genes que afectan la actividad del fármaco, y 2) adquisición de ácido desoxirribonucleico (ADN) foráneo que genere resistencia [12].

Respecto al primer tipo de estrategia existen diferentes mecanismos como los son (Figura 1): a) modificaciones del fármaco (alteraciones químicas del antibiótico o su destrucción), b) decremento de la entrada del fármaco (disminución de la permeabilidad o bombas de eflujo que excluyan el antibiótico de la célula), c) cambios en los sitios blanco (protección o modificación del blanco molecular), o bien, d) modificaciones generales de las vías metabólicas. En cuanto a la segunda estrategia, la bacteria puede obtener ADN foráneo mediante transferencia horizontal de genes: conjugación, apareamiento bacteriano y el más común; transformación, incorporación de ADN libre; o transducción, mediada por fagos [12].

Debido a la alta adaptación de los microorganismos que les permiten sobrevivir a diferentes tipos de antibióticos, se han buscado nuevas alternativas terapéuticas que favorezcan su eliminación. Una de ellas son los péptidos antimicrobianos (PAMs).

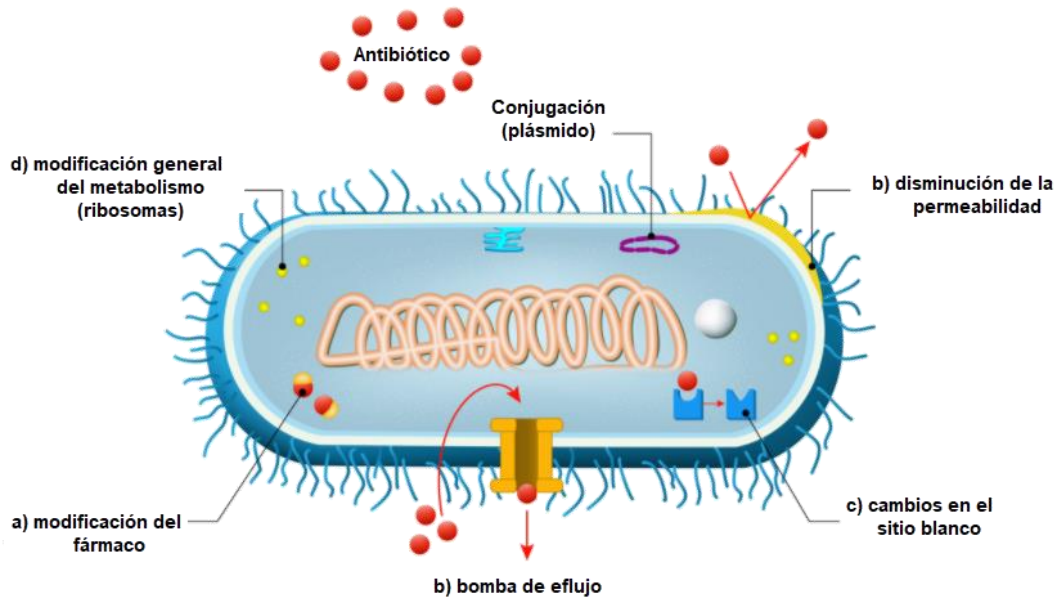


Figura 1. Mecanismos de resistencia antimicrobiana. Mutaciones en genes que afectan la actividad del fármaco (a, b, c y d) y adquisición de ADN foráneo (e.g. conjugación). Obtenido de Kadam Swati, 2016.

2.2 Péptidos antimicrobianos

Los PAMs se encuentran, ampliamente, distribuidos en la naturaleza: en bacterias, protozoarios, hongos, plantas y animales. Dentro del reino animal algunas de las fuentes son: insectos, peces, anfibios, reptiles, pájaros y mamíferos [13].

Estos péptidos forman parte de la respuesta inmune innata, la cual es una estrategia de protección de los organismos para defenderse del ataque de patógenos. La mayoría de los PAMs están constituidos de entre 12 a 50 aminoácidos [10]. Se han encontrado determinantes fisicoquímicos y estructurales basados en estudios de relación estructura-actividad que indican características esenciales para que estos péptidos lleven a cabo su actividad, tales como (Figura 2) la carga, la anfipaticidad, la hidrofobicidad y la conformación [14] [15].

Los PAMs por lo regular presentan cargas desde +2 hasta +9. Su anfipaticidad refleja la separación de grupos hidrofóbicos y polares; una manera de cuantificarla es por medio del momento hidrofóbico (que se define como la suma promedio de hidrofobicidad y permite conocer el grado con el cual residuos polares y no polares

son segregados a lo largo del eje de una hélice [16]). La hidrofobicidad representa el porcentaje de residuos hidrofóbicos dentro del péptido, aproximadamente, es 50 % en la mayoría de los PAMs. En cuanto a la conformación, varios PAMs adquieren una estructura secundaria de tipo α -hélice al entrar en contacto con la membrana de fosfolípidos (Figura 2); las estructuras tipo beta son poco comunes [14] [17]. De acuerdo con datos experimentales y simulaciones moleculares, varios PAMs adoptan una conformación aleatoria (*random coil*) en agua y sólo adquieren una forma α -hélice hasta que interactúan con la membrana [18] [19].

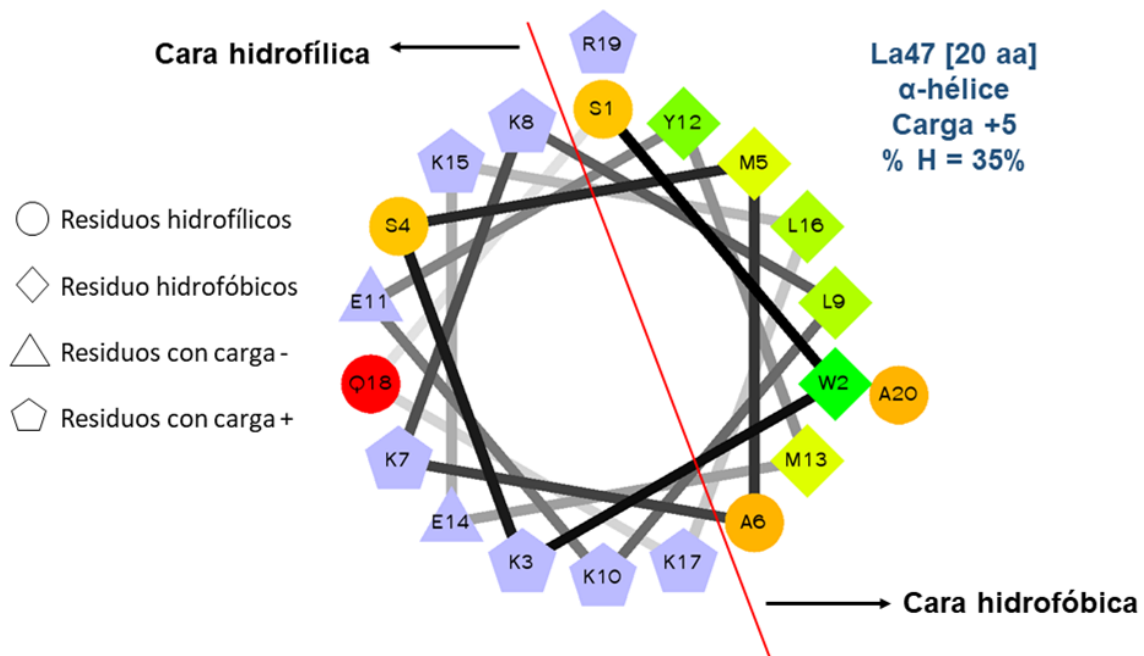
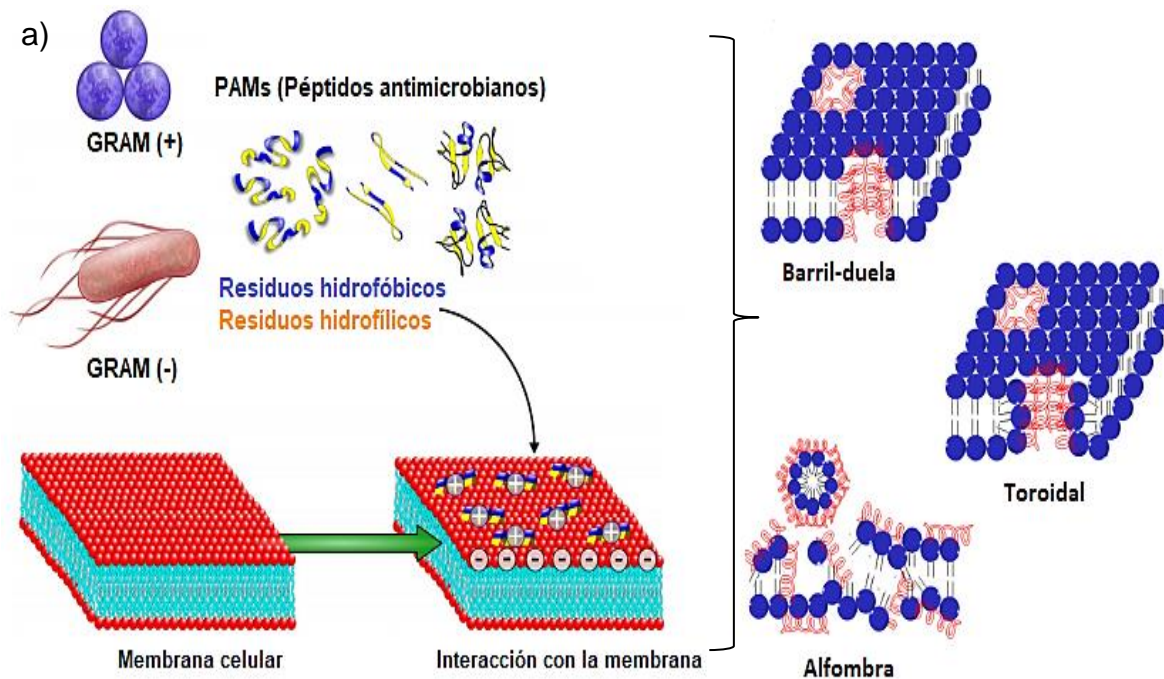


Figura 2. Determinantes fisicoquímicos y estructurales de los PAMs. Proyección de rueda de La47; carga neta, % de hidrofobicidad, carácter anfipático y configuración alfa. La tonalidad verde decrece proporcionalmente a la hidrofobicidad, siendo amarillo una hidrofobicidad de cero. La tonalidad roja disminuye con el decremento de la hidrofiliidad de los residuos sin carga. Los residuos con carga se encuentran en azul claro. Obtenido de r2lab.ucr.edu, Armstrong D. & Zidovetzki R. 23/ene/18 15:34 h.

Los PAMs inician su mecanismo de acción mediante interacciones electrostáticas con la membrana (cargada negativamente en microorganismos); también se ha sugerido que los péptidos pueden interactuar con estructuras que funcionen como receptores. No existe un mecanismo único por el cual el péptido pueda llevar a cabo su actividad y depende de factores como la composición de la membrana [17].

En la Figura 3a se muestran algunos de los mecanismos como: el de duela de barril, donde se forma un canal constituido por PAMs, en el cual los residuos hidrófobos se orientan hacia las cadenas de los grupos acilo de la membrana mientras que los hidrófilos forman el poro acuoso. En el mecanismo de poro toroidal, a diferencia del anterior, los lípidos están intercalados con los péptidos en el canal transmembranal; los residuos hidrofóbicos de los péptidos desplazan las cabezas polares de la membrana induciendo la curvatura de la misma. El mecanismo de alfombra, es un modelo no específico de permeabilización que se compara con el efecto detergente, depende de la acumulación de PAMs sobre la superficie de membrana y no involucra la formación de un poro. Cada uno de estos mecanismos afecta la integridad de la membrana, definida como el estado en el cual la membrana se encuentra completa y sin alteraciones [20]. Una vez que la integridad de la membrana se interrumpe, la célula puede morir por alguna(s) de las siguientes causas: despolarización de la membrana, pérdida del gradiente iónico y/o metabólico y cese de la respiración, inhibición de la síntesis de biopolímeros extracelulares (peptidoglicano o quitina) o interrupción de procesos intracelulares (inhibición de síntesis de ARN o ADN) [17].



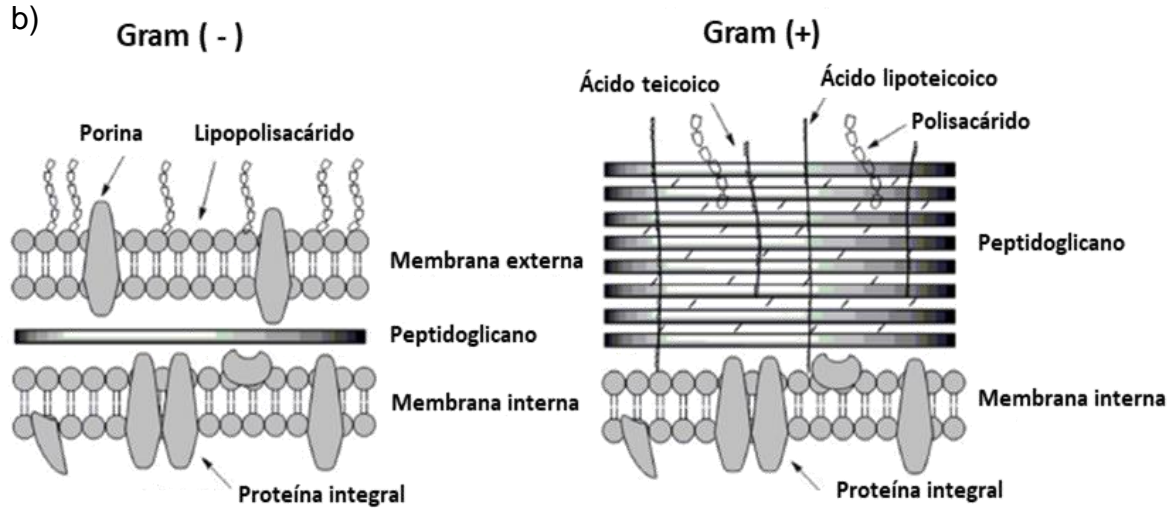


Figura 3. Mecanismos de acción de los PAMs y composición membranar. a) Interacción del PAM con la membrana por distintos mecanismos: Barril-duela, poro toroidal y alfombra. b) Diferencias entre membranas Gram (-) y Gram (+). Modificado de Li, j., et al., 2017 y Ageitos, J.M., et al., 2017.

En la Figura 3b se muestra la composición general de la membrana la cual varía entre bacterias Gram (-) y Gram (+). En la imagen se observa que la diferencia más notoria es el mayor tamaño de la capa de peptidoglicano presente en bacterias Gram (+) en comparación con las Gram (-); otra diferencia, se encuentra en la doble membrana de las bacterias Gram (-) [21]. Además, la composición lipídica entre bacterias Gram (+) y Gram (-), y entre células eucariontes (eritrocitos) confiere diferentes características a la membrana que afectan la actividad de los PAMs.

2.3 Composición lipídica de membranas

Existen diferencias fundamentales entre células microbianas y de mamíferos; una muy importante es la composición de membrana. La carga de las biomembranas es importante en la interacción inicial de los PAMs y depende principalmente del tipo de fosfolípidos (Figura 4). La fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) carecen de carga neta ya que son zwitteriones. La esfingomielina (SM), un análogo a la PC, es neutra. El colesterol y ergosterol, encontrados en membranas eucarióticas, pero raramente en las de procariontas, son neutros. Por otra parte, los fosfolípidos hidroxilados fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) y fosfatidilserina (PS), contienen una carga neta negativa [17].

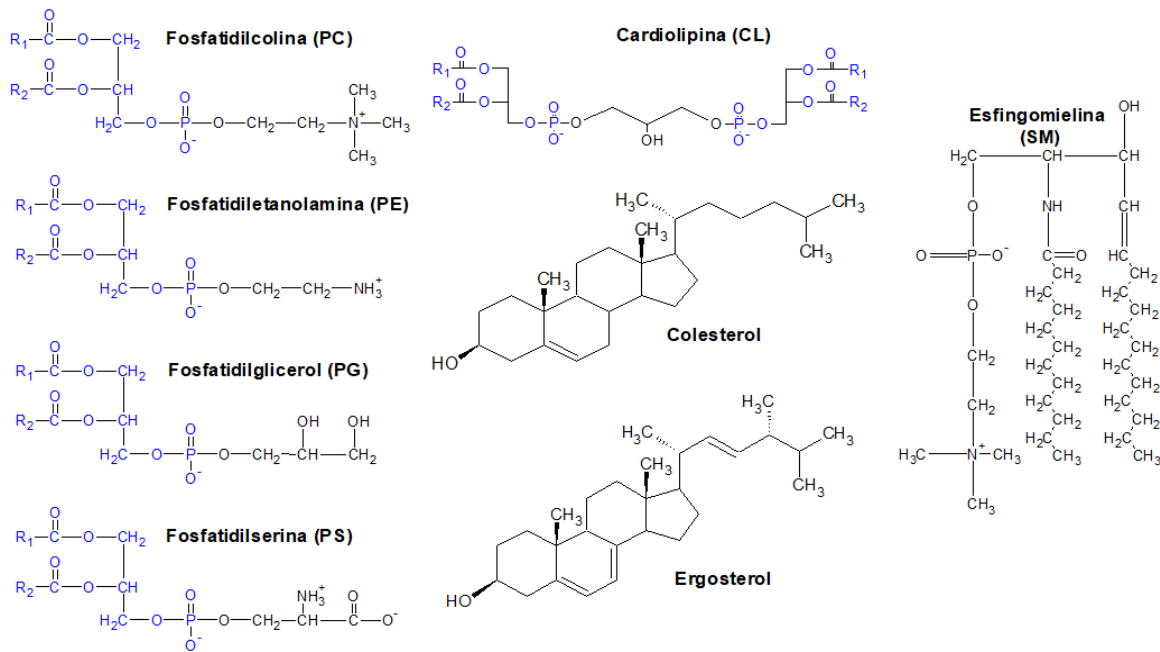


Figura 4. Fosfolípidos y otros componentes de membranas. La PC y PE son zwitteriones, el PG, PS y CL presentan carga negativa, y el colesterol, ergosterol y la SM son neutros.

Los eritrocitos presentan membranas externas ricas en PC, PE, SM, colesterol y ácidos grasos saturados; en la membrana interna aumenta la cantidad de PE y disminuye la de PC [22]. En las bacterias depende de cada especie. En *Sa* (una bacteria Gram positiva) existen PG y CL mayoritariamente, mientras que para *Ec* (una bacteria Gram negativa) están presentes PE, PG y CL con porcentajes de 75%, 20% y <5%, respectivamente [23].

Además de los diferentes tipos de fosfolípidos las membranas bacterianas contienen otros componentes que le confieren carga negativa adicional. Las bacterias Gram (-) contienen lipopolisacárido (LPS) mientras que las Gram (+) presentan ácidos lipoteicoicos (ALT); los LPS y ALT confieren carga negativa. Los eritrocitos deben su carga negativa a su elevado contenido de ácido siálico [17] [24]. Todas estas características afectan la actividad y modo de acción de los PAMs respecto a diferentes tipos de bacterias y células como los eritrocitos. Para mejorar la selectividad hacia algún tipo de célula se pueden generar variantes cuya actividad dependerá de la secuencia de aminoácidos y del tipo de membrana donde se una.

2.4 Péptidos antimicrobianos cortos (variantes)

Para que un PAM pueda ser utilizado como agente terapéutico necesita poseer varias propiedades como: i) alta actividad antimicrobiana (baja concentración mínima inhibitoria, CMI), ii) baja toxicidad en membranas de mamíferos (bajo efecto hemolítico), iii) alta estabilidad proteolítica y iv) bajo costo [21].

Una manera de resolver varios de estos problemas es generando mutantes o variantes de manera racional basados en las características fisicoquímicas y estructurales, explicadas anteriormente [25]. Además, la generación de péptidos de menor tamaño (péptidos antimicrobianos cortos, PAMCs) puede reducir los costos de fabricación [8]. Se considera que un péptido antimicrobiano es corto si el número de residuos no sobrepasa los 15 aminoácidos [7].

Garcia et al. [26] reportaron dos PAMs, C_{ss}54 y La47, aislados del veneno del alacrán *Centruroides suffusus suffusus* (*C.s. suffusus*) y de la araña *Lachesana sp.* Ambos PAMs presentaron actividad contra *Escherichia coli* (Ec) ATCC (*American Type Culture Collection*) 25922 y *Staphylococcus aureus* (Sa) ATCC 25923 (Tabla 1). Estas mismas cepas frente a antibióticos comerciales como la ampicilina y estreptomycin presentaron una CMI de 7.2 µM vs Ec y 28.6 µM vs Sa con ampicilina, y 357.8 µM (contra ambas bacterias) con estreptomycin [26].

Tabla 1. Secuencia y actividad antimicrobiana y hemolítica de C_{ss}54, La47 y variantes.

Nombre	# aa	% H	Secuencia	CMI (µM)		% Hemólisis
				Ec	Sa	
C _{ss} 54	25	44	FFGSLLSLGSKLLPSVFKLFQRKKE	3.1	6.3	100
C _{ss} 54[15E] ⁺⁴	15	60	FWRKLELLFKFLKK	12.5	25	100
C _{ss} 54[14] ⁺⁵	14	64	FWRLKLLFKFLKK	25	12.5	70
La47	20	40	SWKSMAKKLKEYMEKCLKQRA	40	34	NA
La47[15E] ⁺⁶	15	53	FWKKLYEKLKMARK	12.5	25	15
La47[15] ⁺⁷	15	48	FWKMLKKMYKCLKRA	12.5	12.5	25

H= aa hidrofóbicos; Ec= *Escherichia coli*; Sa= *Staphylococcus aureus*; CMI= Concentración Mínima Inhibitoria

El grupo del Dr. Gerardo Corzo (IBt, UNAM) en colaboración con el grupo del Dr. Alexis Rodríguez Solís (Centro de Investigación en Biotecnología, UAEMor) diseñaron, sintetizaron y evaluaron una serie de variantes cortas. Las actividades antimicrobianas y hemolíticas se reportan en la Tabla 1. El diseño de las variantes se basó en la eliminación de residuos poco relacionados con la actividad antimicrobiana (Gly, Ser, Gln, Pro y Val), en la adición en la segunda posición (partiendo del extremo N-terminal) de un Trp para su cuantificación a 280 nm y de la reorganización de algunos residuos para propiciar una estructura helicoidal.

Para poder ver cómo los PAMs interactúan con la membrana a nivel atómico es necesario tener la estructura tridimensional del péptido la cual puede ser resuelta mediante varios métodos (cristalografía de rayos x o resonancia magnética nuclear [27]). Cuando no se cuenta con este tipo de información se pueden generar modelos basados en la homología del PAM a partir de estructuras ya resueltas.

2.5 Modelado por homología

El modelado por homología o comparativo es una metodología para predecir la estructura de una proteína, que se basa en la observación general de que las proteínas con secuencias similares tienen estructuras similares. A partir de la estructura de una proteína determinada experimentalmente (plantilla) es posible generar modelos con una secuencia homóloga (blanco) que comparta por lo menos un 30% de la secuencia de la plantilla [27]. El proceso consta de (Figura 5): i) la identificación de una estructura 3D conocida que sirva como plantilla, ii) el alineamiento de la secuencia blanco con la plantilla, iii) la construcción del modelo y iv) el refinamiento, validación o evaluación del modelo [28].

Con modelos construidos con más del 30% de identidad, es probable que se comparta un ancestro en común y por lo tanto que la estructura 3D se encuentre relacionada evolutivamente (las construcciones son confiables). Si la secuencia es menor al 15% de identidad, el modelo es especulativo y puede generar conclusiones

entropía, la solubilidad, la viscosidad, la presión, las temperaturas de cambio de fase, y en sistemas biológicos, permite medir la fuerza de interacción entre posibles fármacos y sus dianas biomoleculares o receptores, e incluso, describir el comportamiento de una proteína y moléculas complejas bajo ciertas condiciones, por mencionar algunas de sus capacidades. Si bien, las ecuaciones del movimiento no describen el sistema a nivel cuántico (lo cual requeriría una capacidad de cálculo, extremadamente, grande), este tipo de estudios han mostrado buena correlación con resultados experimentales [30] [31] [32].

Un ejemplo de DM aplicada a la interacción de biomembranas y PAMs fue publicado por Velasco et al. [10] en 2017, quienes realizaron estudios con PAMs aislados del veneno del alacrán *Pandinus imperator*, Pin2 y su análogo Pin2GVG, para explorar su mecanismo de adsorción y el papel de sus aminoácidos cuando interactúan con modelos de bicapa lipídica de POPC (en membrana de eritrocitos) y POPG (en membranas de bacterias como *E coli*). El tiempo de simulación fue de 12 μ s y se colocaron las conformaciones α -hélice de ambos PAMs cerca de las membranas. Los autores encontraron que los residuos aromáticos del extremo N-terminal de Pin2 son los que inician la inserción sobre ambas membranas y que Pin2GVG lo hace con sus residuos C-terminal en POPC; sobre POPG el proceso es lento debido a la fuerte atracción electrostática que mantiene al péptido en la región de los fosfatos retardando su inserción en la membrana.

Este estudio permitió conocer cómo cambios en la secuencia (entre Pin2 y Pin2GVG) propician diferentes modos de interacción y que según sea la composición lipídica de la membrana el comportamiento es distinto. Es por ello que la DM nos puede orientar, a nivel de átomos, cómo es que los distintos residuos (de C55, L47 y las variantes) llevan a cabo su interacción con diferentes modelos de membrana; POPC para representar a los eritrocitos (hemólisis) y POPG para representar a las bacterias (actividad antimicrobiana).

3. HIPÓTESIS

Modificaciones en la secuencia de los residuos de aminoácidos en variantes de C_{ss}54 y La47 interactúan de manera distinta con las bicapas lipídicas, propiciando cambios en las actividades antimicrobianas y hemolíticas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar las interacciones que permiten a las variantes de C_{ss}54 y/o de La47 modificar la integridad de los modelos de bicapa lipídica.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Generar modelos de membranas lipídicas de POPC (membrana de eritrocitos) y POPG (membrana de bacterias).
- Realizar modelado por homología de las estructuras secundarias de los análogos de C_{ss}54 y/o de La47.
- Llevar a cabo simulaciones mediante dinámica molecular, con todos los átomos, de las bicapas lipídicas con las variantes de C_{ss}54 y/o de La47.
- Identificar los aminoácidos de los análogos de C_{ss}54 y/o de La47 que son clave en la alteración de la integridad de las bicapas lipídicas.
- Relacionar el modo en que interactúan los análogos de C_{ss}54 y/o de La47 con membranas, con sus respectivas actividades antimicrobianas y hemolíticas.

5. METODOLOGÍA

5.1 Modelado estructural de los PAMs

Es importante mencionar que, en el análisis, algunas variantes fueron abreviadas de la siguiente manera: C_{ss}54[14]⁺⁵ como C_{ss}5414, C_{ss}54[15E]⁺⁴ como C_{ss}5415E, La47[15]⁺⁷ como La4715 y La47[15E]⁺⁶ como La4715E.

5.1.1 Búsqueda de plantillas y alineamientos

Con la secuencia de cada uno de los PAMs, C_{ss}54 y La47, se realizó la búsqueda y alineamiento a partir de estructuras definidas y similares (plantillas). Las estructuras fueron seleccionadas de aquellas depositadas en la base de datos del PDB. El programa utilizado para la exploración fue GLSEARCH (<http://nrc.nrc.ac.uk/bioinformatics/docs/glsearch.html>) y el alineamiento de secuencias se llevó a cabo con FASTA (<http://nrc.nrc.ac.uk/bioinformatics/docs/fasta.html>). Ambos programas están incluidos en la plataforma de búsqueda de similitud de proteínas del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI, *European Bioinformatics Institute*) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta>) [33]. Cada una de las búsquedas proporcionó un total de 50 candidatos ordenados de acuerdo con su porcentaje de identidad y provenientes de estructuras determinadas con distintas técnicas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Cristalografía de rayos X (CX).

5.1.2 Selección de la plantilla

La selección de las plantillas (estructuras cristalográficas) se basó en: el porcentaje de identidad, pH cercano a 7.2 y temperatura cercana a 298 K (ambos de acuerdo a las condiciones experimentales de cristalización) y un modo de acción igual o similar al de los PAMs en general (interrupción de la integridad membranal) [34].

Para las plantillas provenientes de CX se revisaron los parámetros de calidad del cristal, la congruencia con los gráficos de Ramachandran y que la densidad

electrónica del modelo estuviera justificada con la experimental, esto con ayuda de Coot 0.8.9 [35]. Respecto a las plantillas de RMN se optó por escoger el modelo que mejor representara a todos los confórmeros analizando la distribución de las comparaciones entre el RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de la cadena principal de las estructuras usando ProFIT 3.1 [36]. Lo cual se muestra en la Figura 6.

La Figura 6 es un ejemplo de los diagramas de caja-bigotes. La línea en el centro de la caja representa la mediana (50 % de los datos), los límites de la misma (25 y 75 %, Q1 y Q3, respectivamente) y los bigotes se colocaron a 1.5 veces el valor intercuartil ($Q3 - Q1$) [37]. Cada uno de los confórmeros se comparó consigo y con los demás para calcular el RMSD. La selección del confórmero se basó en omitir las representaciones con valores fuera de los bigotes (modelos 1, 4, 6, 7, 11, 13, 14, 15, 16, 18 y 20) y eliminar aquellos con grandes distribuciones en el RMSD (modelos 2, 5, 8, 9, 10, 12, 17 y 19), ya que con ello se aseguraría que las estructuras fueran lo más similares respecto al modelo seleccionado como plantilla (modelo 3).

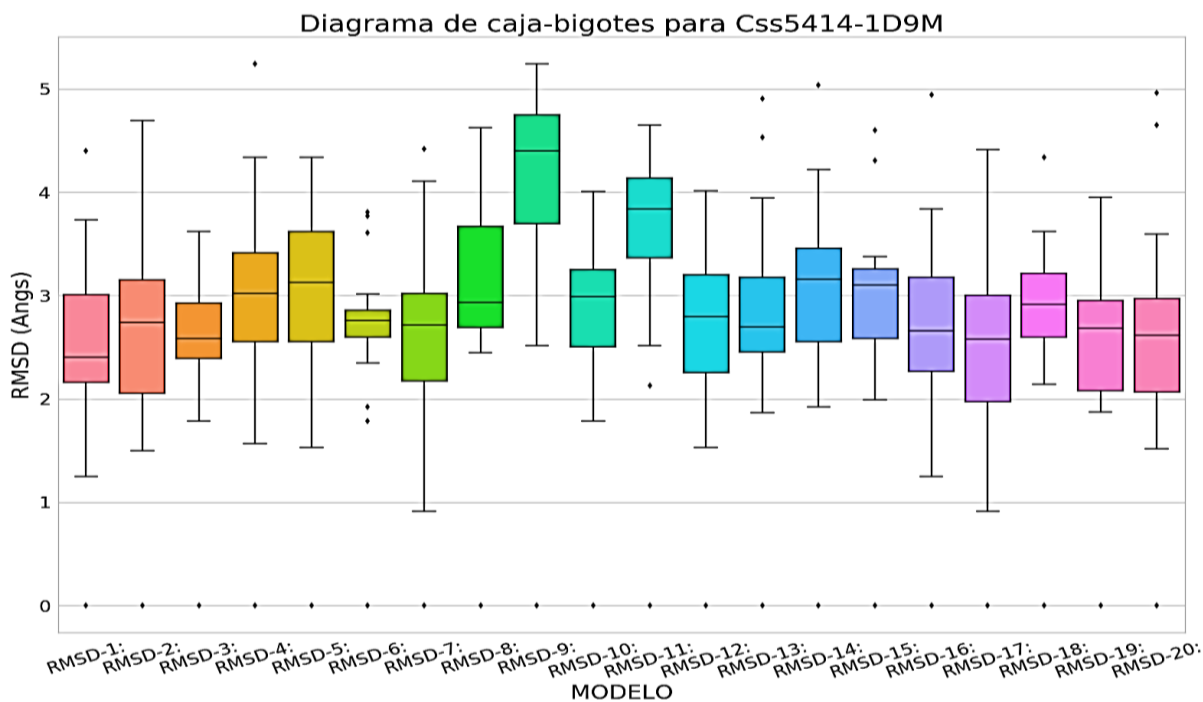


Figura 6. Diagrama de caja-bigote para Css5414. Utilizado en la selección del confórmero más representativo proveniente de modelos de RMN.

5.1.3 Construcción de los modelos

De acuerdo, con la doceava versión del concurso CASP (*Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction*) las dos mejores suites para la construcción de modelos de proteínas a partir de su secuencias son: I-Tasser [38] y Rosetta [39]. Se utilizaron tanto la suite como el servidor en el caso de I-Tasser mientras que con Rosetta sólo se usó la suite ya que el servidor no acepta secuencias menores a 27 residuos.

La manera en que se llevó a cabo la construcción de los modelos se basó en el % identidad de la secuencia problema respecto a las plantillas. Con porcentajes de identidad superiores al 30 % la construcción se realizó mediante modelado comparativo (Rosetta) utilizando las mejores plantillas, ya sean provenientes de RMN o de CX; con porcentajes entre 15 y 30% de similitud, el modelado se llevó a cabo por hilvanado (I-Tasser). El número de modelos generados con I-Tasser fue de cinco y con Rosetta de 1000. Si bien el modelado 3D de la estructura pudo realizarse con herramientas como Pep-Fold3, diseñadas para péptidos, se optó por programas que permitieran el manejo de estructuras de PAMs ya resueltas.

5.1.4 Selección de los modelos

La selección del modelo, con I-Tasser, es automatizada y depende de parámetros como C-score, TM-score, RMSD, la densidad y número de compuestos del clúster más poblado (ANEXO II). El RMSD, se utiliza para medir la similitud entre las coordenadas atómicas (e.g. carbonos alfa) de dos estructuras superpuestas [40].

Con Rosetta, la selección se realizó de dos maneras. En la primera se buscó el clúster más poblado basado en el RMSD de C α (calculado con Calibur [41], un programa interno de Rosetta) y dentro de éste se seleccionó la estructura con el valor más pequeño de puntuación (*Score*). En la segunda sólo se identificó el modelo con el valor de puntuación global más pequeño. Ambos métodos tienen el objetivo de identificar el mejor modelo.

5.1.5 Evaluación de los modelos

Con aquellos modelos que resultaron los mejores de acuerdo a los criterios de selección (sección 5.1.4) para cada PAM se evaluó la geometría estructural con ayuda de Molprobit [42] y PROCHECK [43]. Los factores que se analizaron fueron: cantidad de *outliers* (valores atípicos) de los gráficos de Ramachandran, ángulos adecuados, choques estéricos y rotámeros favorecidos (ANEXO II).

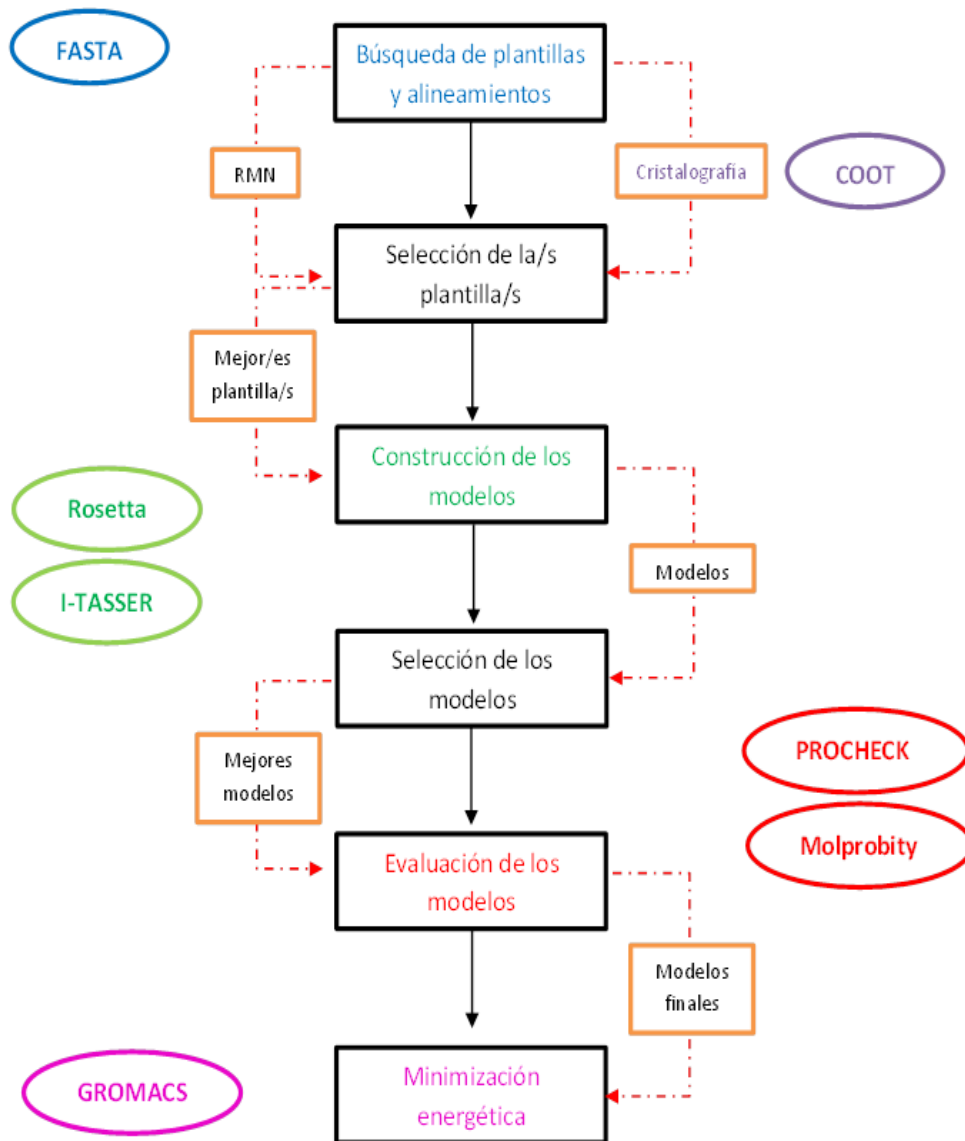


Figura 7. Diagrama de flujo para el modelado estructural de los PAMs.

5.1.6 Minimización energética

Una vez realizada la evaluación de la geometría todas las estructuras fueron sometidas a una minimización con disolvente explícito (modelo de agua TIP3P) utilizando el método de *steepest descent* por 1000 pasos, seguido por otros 1000 pasos de gradiente conjugado, utilizando Gromacs 5.1.4. La modificación del archivo de .pdb a .gro se llevó a cabo con el campo de fuerza charmm36-jul2017, el cual está validado para lípidos y proteínas [44] [45], modificado por el Dr. Alex MacKerell de la Universidad de Maryland para su implementación en Gromacs.

5.2 Membrana lipídica

La construcción de la membrana se realizó con *Membrane Builder* de CHARMM-GUI [46], programa que prepara la topología de las bicapas utilizando el campo de fuerzas de CHARMM36, compatible con Gromacs 5.1.4. Se construyeron dos membranas de 64 lípidos en cada cara, una de POPC y otra de POPG, la primera para representar membranas de eritrocitos [22] y la segunda de bacterias [23].

Para la simulación de los péptidos se utilizó el campo de fuerza de CHARMM36m, modelo de agua TIP3P y como programa de simulación Gromacs 5.1.4. El sistema de POPG contuvo un total de moléculas de agua de 8965 y el de POPC fue de 9420. La cantidad de NaCl fue de 29 para POPC, con POPG fue de 156 Na⁺ y 28 Cl⁻. El tamaño de ambas cajas fue de aproximadamente 6 x 6 x 12 nm.

Las dos membranas fueron minimizadas con *steepest descent* (sin valor de convergencia energética) y gradiente conjugado para eliminar posibles choques estéricos. Se realizó una simulación por 1000 ps bajo el ensamble NVT, con una temperatura de referencia para el acoplamiento de 303.15 K utilizando el termostato de Nosé-Hoover, y un tiempo de integración de 2 fs con ayuda de LINCS. Para las interacciones de largo alcance se utilizó PME y una distancia de corte de 1.2 nm para las interacciones de Van der Waals [47].

La temperatura para la relajación (303.15 K) fue seleccionada para que estuviera por encima de la de transición de fase gel-líquido, 271.15 K tanto para POPC como POPG [48], y con ello contar con una membrana en fase de cristal líquido [10]. Durante el equilibrio se restringió el movimiento de los fósforos en el plano z con una energía de 1000 kJ/mol nm². Se realizó el equilibrio bajo el ensamble NPT con ayuda del baróstato de Parrinello-Rahman y el tipo de acoplamiento semi-isotrópico a una presión de 1.0 bar, por 50 ns. El tiempo fue mayor en comparación al equilibrio NVT, ya que la presión deseada no era alcanzada. La producción de la DM fue de 200 ns, y a diferencia del equilibrio bajo ensamble NPT no se utilizaron restricciones. A partir de la trayectoria se obtuvieron el área por lípido (APL), la distancia entre los fósforos de ambas caras, el orden del parámetro de deuterio, la densidad de las fases, temperatura y presión (mayor información en el ANEXO I).

5.3 Sistemas PAM-Membrana

Con las membranas y los péptidos modelados se generaron seis sistemas, los PAMs fueron colocados a una distancia promedio de 1.5 nm de la membrana y orientados de tal forma que las cadenas laterales de residuos cargados positivamente se encontraran paralelas a la capa de lípidos (Figura 8). Cada sistema fue solvatado, y llevado a una concentración de 0.1 M de NaCl para simular condiciones fisiológicas. En la Tabla 2 se resumen la composición de cada sistema.

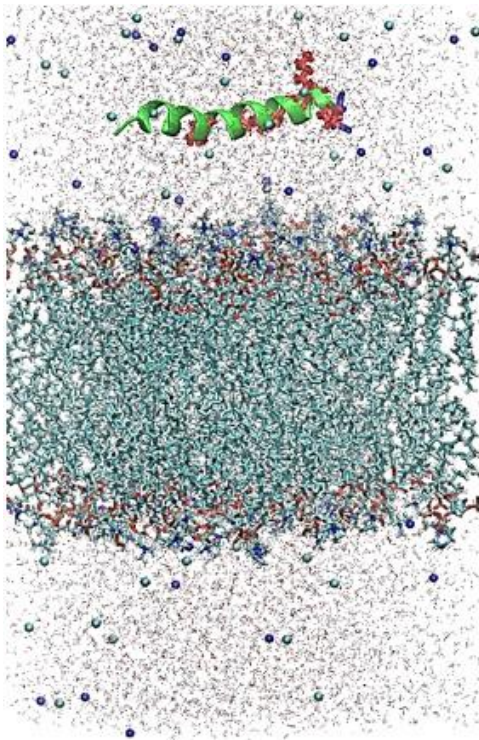
Tabla 2. Composición de cada sistema simulado.

PAM	Lípido	Aguas	Na ⁺	Cl ⁻	Lípido	Aguas	Na ⁺	Cl ⁻
Css54 ⁺⁴	POPG	9278	29	33	POPC	8822	152	28
Css54[15E] ⁺⁴		9334	29	33		8874	152	28
Css54[14] ⁺⁵		9341	29	34		8891	151	28
La47 ⁺⁵		9305	29	34		9258	152	29
La47[15E] ⁺⁶		9341	29	35		9287	151	29
La47[15] ⁺⁷		9331	29	36		9289	150	29

Los sistemas se sometieron a las mismas condiciones de minimización y equilibrio que se comentan en la sección anterior. El tiempo de simulación de cada sistema fue de 200 ns (tiempo utilizado en algunas referencias para asegurar la interacción con la membrana [49] [50]) y se llevaron a cabo en la supercomputadora HP *Cluster Platform* 3000SL “Miztli”.

A partir de las trayectorias de los sistemas se obtuvo la siguiente información: con ayuda de los *plugins* “*VMD Timeline*” la estructura secundaria a lo largo de los 200 ns, con *gmx distance* la distancia promedio de los fósforos entre las dos caras de la membrana (el grosor), con “*Membrane Analysis Tool*” el área por lípido promedio de los últimos 50 ns (intervalos de 100 ps) [51], con *gmx traj* la evolución temporal de los centros de masa (COM, *center of mass*) del PAM y de las cadenas laterales sobre el eje z [10].

a)



b)

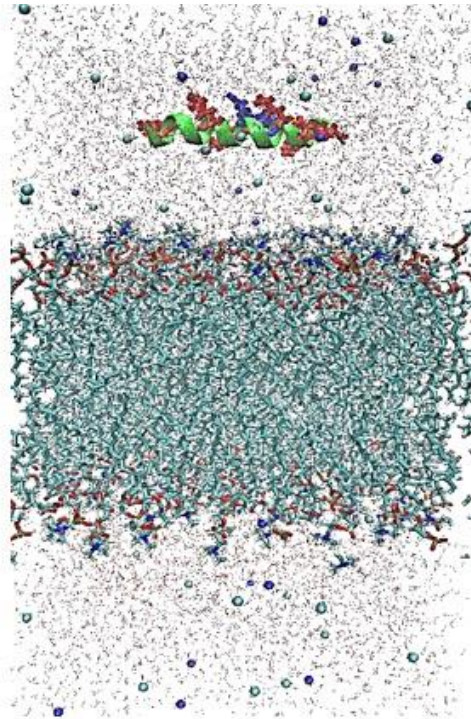


Figura 8. Sistemas generados para la simulación. a) C55 con POPC y b) La47 con POPC, de color rojo se representan los residuos cargados positivamente y de azul negativamente. Se observa que las cadenas de estos residuos se encuentran paralelas a la capa de fosfolípidos

Utilizando *gmx hbond* se calculó la cantidad de puentes de hidrógeno entre el PAM y la membrana (distancia 0.35 nm y ángulo 30° entre D-H y A); *gmx bundle* para el cálculo del ángulo de inclinación respecto al eje z y considerando el vector formado por los extremos C y N terminal, y *gmx rms* para determinar la fluctuación de los átomos pesados (N, C y C α).

Para conocer las energías de unión de los sistemas simulados se usó *g_mmpbsa* [52], una paquetería que permite utilizar las trayectorias generadas por Gromacs y calcular diferentes contribuciones energéticas (fuerzas de Van der Waals, electrostáticas, energía de solvatación con su sección polar y apolar), el cálculo se realizó a lo largo de los 200 ns cada 400 ps.

Con *scripts* generados en Python 2.7 se analizaron las distancias de los residuos para identificar posibles interacciones electrostáticas (< 0.4 nm), hidrofóbicas (< 0.4 nm) y catión- π (< 0.4 nm) [53]. Las gráficas presentadas en este trabajo fueron realizadas utilizando los módulos *seaborn* y *matplotlib* de Python 2.7 y las imágenes se generaron con ayuda Pymol 2.0.7 y VMD 1.9.1.

Mayor descripción de los métodos en el ANEXO I.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Modelado estructural de los PAMs

En la Tabla 3 se muestran las plantillas que fueron seleccionadas para la construcción de los modelos de C_{ss}54 y sus variantes. En ésta se encuentra una breve descripción del péptido, su porcentaje de identidad, el *E value* (reporta la significancia estadística del alineamiento, es decir, el número de veces que se esperaría encontrar una secuencia no relacionada por casualidad; valores menores a 0.001 pueden ser utilizados para inferir homología [54]), la resolución en caso de CX o el número de confórmeros para RMN, el ambiente en el que fueron determinadas y su secuencia.

Tabla 3. Plantillas seleccionadas para C_{ss}54 y sus variantes. De color verde están aquellas que fueron utilizadas y de color rojo aquellas que fueron candidatas, pero descartadas.

PDB ID	Descripción	% Iden	E value	Res o conf	Ambiente	Secuencia
C _{ss} 54						FFGSLLSLGSKLLPSVFKLFQRKKE
3QRX-B	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , centrina unida a melitina	24.0	0.0010	2.2	93 K pH 7.5	-IGAVLKVLTTGLPALISWIK-----
2MLT	Melitina	24.0	0.0013	2.0	pH 7.2	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQ
1BH1	Estudio estructural de la D-Pro melitina	24.0	0.0013	20/1000	277 K pH 5.2 MeOH	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQ
2MW6	Melitina con [(C5H5)RU] ⁺	24.0	0.0013	10/10	298 K pH 7.0 CD3OH	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQ
C _{ss} 5414						FWRLKLLFKFLKK
1D9M	Estructura de cecropina A(1-8)-magainina 2(1-12)	42.9	7.6E-5	20/50	298 K pH 4.0 TFE-H ₂ O	KWKLFKFKIPKFLHS [Modelo 3]
1F0E	Cecropina A(1-8)-magainina 2(1-12) en DPC	42.9	7.6E-5	20/50	298 K pH 4.0 DPC-d38	KWKLFKFKIPKFLHS
C _{ss} 5415E						FWRKLELLFKFLKK
2PCO	Latarcina-1, <i>Lachesana tarabaevi</i>	46.7	3.4E-4	20/200	318 K pH 7.1 SDS	MWRRKLLKLRNALKK [Modelo 18]

En el caso de C_{ss}54 (Tabla 3) se descartó 3QRX-B dado que parte de la secuencia de interés no se encontraba en el modelo, es decir, carecía de información en las

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

coordinadas para ciertos residuos. 1BH1 fue omitido ya que, el modelo contenía una D-Pro (la gramicidina es un ejemplo de PAM con D aminoácidos [55]) cuando por lo general son los de configuración L los más comunes en la naturaleza. 2MW6 fue descartado ya que utilizaron como referencia estructural a 2MLT.

Para la variante C_{ss}5414 las plantillas encontradas, 1D9M y 1F0E, se resolvieron en ambientes similares por lo que sólo se usó a una de ellas, 1D9M. Es importante mencionar que a pesar de que el pH en el que se obtuvo la estructura de 1D9M fue de 4.0 se puede utilizar la estructura ya que el único residuo que puede verse afectado es la His; sin embargo, a dicho pH los residuos básicos (K, R e H) se encuentran protonados. En C_{ss}5415E se encontró a un único candidato según los criterios de selección.

Tabla 4. Plantillas seleccionadas para La47 y sus variantes. De color verde están aquellas que fueron utilizadas y de color rojo aquellas que fueron candidatas, pero descartadas.

PDB ID	Descripción	% Iden	E value	Res o conf	Ambiente	Secuencia
La47						SWKSMAKKLKEYMEKLKQRA
3VU6-B	Inhibidor de HIV, MT-SC22EK	30.0	9.2E-5	2.3	100K pH 8.5	TWEEWDKKIEEYTKKIEELI
La4715						FWKMLKKMYKCLKRA
1D9M	Cecropina A(1-8)-magainina 2(1-12)	46.7	0.00031	20/50	298 K pH 4.0 TFE-H ₂ O	KWKLFKKIPKFLHSA [Modelo 3]
1F0E	Cecropina A(1-8)-magainina 2(1-12) en DPC	46.7	0.00031	20/50	298 K pH 4.0 DPC-d38	KWKLFKKIPKFLHSA
1Q2F	Péptido MDM-2 de P53 con actividad citotóxica	46.7	0.00051	20/200	310 K pH 5.7 DMSO-d ₆ -BPS	LWKLLKKW--KMRRN
2KET	BMAP-27, derivado de catelicidina bovina	46.7	0.0016	20/100	293 K pH 4.3 ETOH-H ₂ O	FRKKFKKLFKKLSPV [Modelo 3]
2RLH	RP-1, derivado de kinocidinas (factor plaquetario 4)	46.7	0.0044	10/50	313 K pH 5.0 DPC y D ₂ O	YKKFKKLLKSLKRL [Modelo 5]
2IGR	CB1a, derivado de la cecropina B	46.7	0.029	20/100	303k pH 4.9 D-HFIP y D ₂ O	KWKVFKKIEKKWKVF
La4715E						FWKKLYEKLLKMARK
1LYP	CAP18, leucocitos cuniculas. Unidos a LPS	53.3	4.3E-5	1	302 K pH=3.5 BPS y TFE-d ₃	FRNKIKEKLLKIGQK
2MWT	Crotalicidina de serpiente. Similar a la catelicidina	40.0	0.042	20/100	298 K pH 3.0 DPC, D ₂ O	RFKKFFKVKKSVKK [Modelo 6]

En la Tabla 4 se muestran los resultados para La47 y sus variantes. La47 sólo tuvo un candidato, 3VU6-B. Para La4715 se encontraron siete candidatos, sin embargo, tres de ellos fueron descartados: 1F0E por los mismos motivos que Css5414, 1Q2F por la falta de información estructural y 2IGR porque no proporcionaba información adicional al de las otras plantillas seleccionadas. Las plantillas seleccionadas fueron 2KET y 2RLH, las cuales no contenían residuos que variaran su estado de protonación en el pH al que fueron resueltas (4.3 y 5.0, respectivamente) y el experimental, de 7.2. Para La4715E, se seleccionó a 2MWT ya que a pesar de que 1LYP tenía mayor porcentaje de identidad, 2MWT no contenía residuos que cambiaran su estado de protonación entre 3.0 y 7.2, como el Glu de 1LYP.

Con las plantillas seleccionadas se generaron los modelos correspondientes con I-Tasser y Rosetta, de acuerdo al porcentaje de identidad. En el caso de I-Tasser sólo un modelo fue elegido como el mejor mientras que con Rosetta es necesario la búsqueda del menor *Score* (puntuación). Como ya se mencionó, un total de 1000 modelos con Rosetta fueron generados. Para ver el comportamiento de todos los modelos se realizaron gráficas de *Score* vs RMSD (Figura 9).

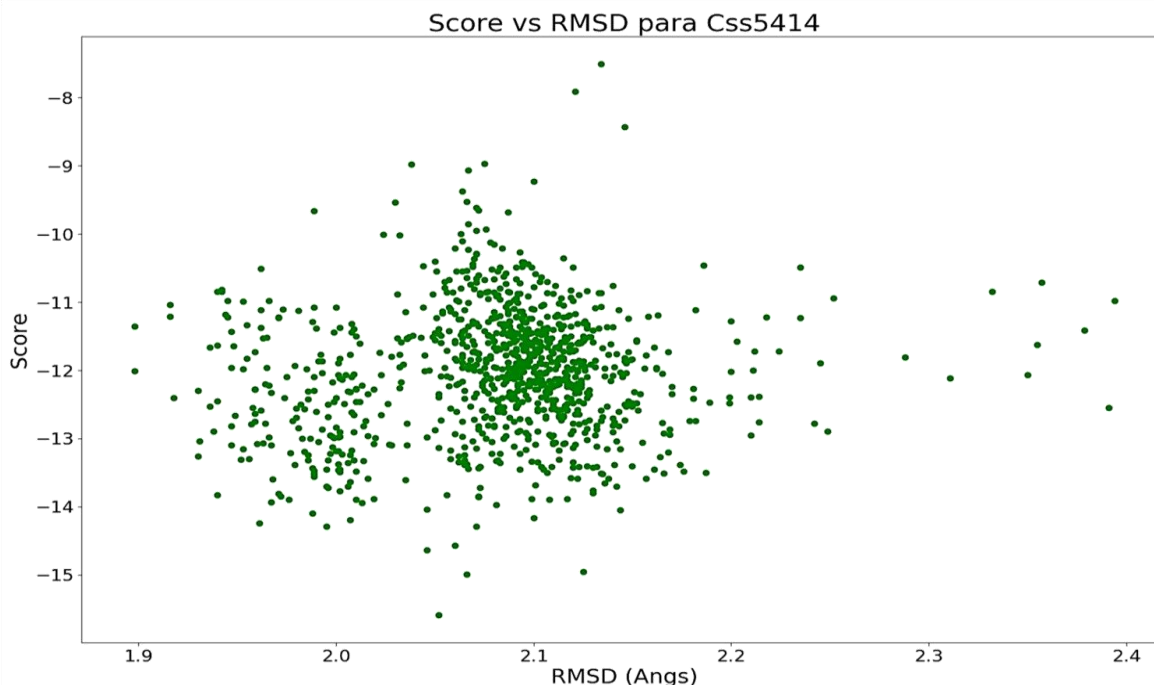


Figura 9. Gráfica de *Score* vs RMSD para Css5414. RMSD respecto a la plantilla 1D9M.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la Figura 9 la mayoría de modelos se aglomera en un intervalo de -10 a -14 del valor de *Score* y la diferencia de los modelos respecto a la plantilla es máximo de 0.5 Å, comportamientos similares se observan para todas las variantes en donde Rosetta fue utilizada. Dado que la mayoría de los modelos se encuentran en intervalos definidos, es posible decir que es poco probable que se visiten otros modelos de menor valor de *Score*. En cuanto al RMSD, los valores no son mayores a 0.5 Å; entre los distintos modelos, por lo que se considera que las estructuras son muy similares. Con todo lo anterior es posible generar sólo 1000 modelos y encontrar un modelo adecuado.

Tabla 5. Modelos generados para La47 y Css54. De color amarillo se encuentran los modelos seleccionados, de color rojo valores no definidos por el programa utilizado.

PAM	%Iden	Programa	Modelo	Cscore	TM-score	RMSD	Score		
Css54	24.0	I-Tasser server 2MLT	model1-mse.pdb	0.51	0.78 ± 0.10	0.6 ± 0.6 Å			
		I-Tasser server sin plantilla	Css54-se.pdb	-0.10	0.70 ± 0.12	1.6 ± 1.4 Å			
		I-Tasser suite con 2MLT	model1-msu.pdb	0.25	0.75 ± 0.11	1.0 ± 1.0			
		I-Tasser suite sin plantilla	Css54-su.pdb	-0.54	0.64 ± 0.13	2.4 ± 1.8 Å			
Css5414	42.9	Rosetta suite 1D9M [Clúster más poblado menor Score]	S_0905.pdb			2.073 Å	-13.724		
		Rosetta suite 1D9M [Menor Score global]	S_0255.pdb			2.052 Å	-15.586		
Css5415E	46.7	Rosetta suite 2PCO [Clúster más poblado menor Score]	S_0421.pdb			0.331 Å	-15.373		
		Rosetta suite 2PCO [Menor Score global]	S_0334.pdb			0.359 Å	-16.348		
La47	30.0	I-Tasser server 3VU6	model1-vse.pdb	0.64	0.80 ± 0.09	0.5 ± 0.5 Å			
		I-Tasser server sin plantilla	La47-se.pdb	-0.01	0.71 ± 0.11	1.1 ± 1.1 Å			
		I-Tasser suite con 3VU6	model1-vsü.pdb	0.66	0.80 ± 0.09	0.5 ± 0.5 Å			
		I-Tasser suite sin plantilla	La47-su.pdb	0.65	0.80 ± 0.09	0.5 ± 0.5 Å			
		Rosetta suite 3VU6 [Clúster más poblado menor Score]	S_0943.pdb			0.521 Å		-21.518	
		Rosetta suite 3VU6 [Menor Score global]	S_0392.pdb			0.466 Å		-22.150	
La4715	46.7	Rosetta suite 1D9M/2KET/2RLH [Clúster más poblado menor Score]	S_0879.pdb			1d9m	2.240 Å		
						2ket	1.183 Å		
						2rlh	1.593 Å		
		Rosetta suite 1D9M/2KE T/2RLH [Menor Score global]	S_0084.pdb				1d9m	2.165 Å	-14.024
							2ket	1.203 Å	
							2rlh	1.581 Å	
La4715E	53.3	Rosetta suite 1LYP [Clúster más poblado menor Score]	S_0333.pdb			0.630 Å	-14.177		
		Rosetta suite 1LYP [Menor Score global]	S_0678.pdb			0.735 Å	-16.841		
	40.0	Rosetta suite 2MVT [Clúster más poblado menor Score]	S_0725.pdb			1.035 Å	-14.623		
		Rosetta suite 2MVT [Menor Score global]	S_0544.pdb			1.159 Å	-19.850		

En la Tabla 5 se muestran los modelos seleccionados para cada PAM. Aquellos provenientes de Rosetta incluyen el valor de *Score*, mientras que los de I-Tasser presentan los parámetros de calidad para el mejor modelo. Todos los modelos seleccionados para las simulaciones fueron generados con Rosetta, C_{ss}54 fue el único en el que se utilizó I-Tasser.

Dado que la plantilla de C_{ss}54 tuvo un porcentaje de identidad de 24% se seleccionó como programa de modelado a I-Tasser, el cual se basa en hilvanado. Con la plantilla (2MLT) se generaron varios modelos, dos con la suite de I-Tasser y dos con el servidor, y en cada uno se varió la presencia de la plantilla. La principal diferencia entre los modelos con y sin plantilla es en la región del centro, donde se encuentra una prolina; otra gran diferencia es el modelado de las cadenas laterales (Figura 10). Los resultados mostraron que el modelo mejor evaluado fue el generado con el servidor y usando la plantilla. La selección fue guiada, principalmente, por el valor del TM-score y C-score (Tabla 5).

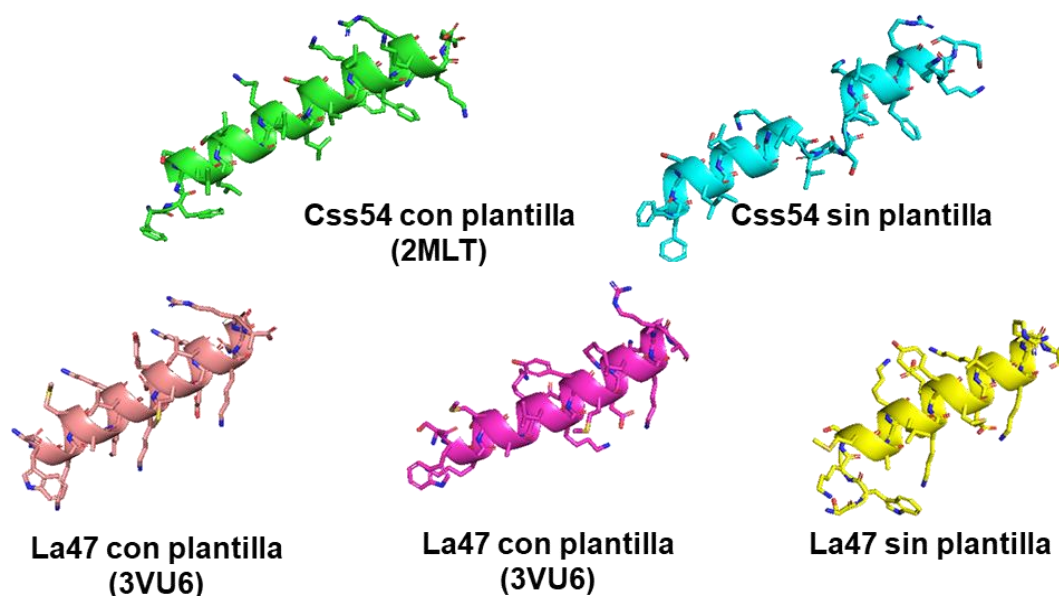


Figura 10. Comparación de estructuras con y sin plantilla. C_{ss}54 modelada con el servidor de I-Tasser con (verde) y sin plantilla (cian); La47 modelada de igual modo con (morada) y sin plantilla (amarilla) y con Rosetta (rosa). De azul los átomos de nitrógeno y de rojo los oxígenos. El valor de RMSD entre C_{ss}54 con y sin plantilla es de 1.475 Å, La47 con y sin plantilla es de 1.701 Å. El RMSD de La47-Rosetta y La47-I-Tasser (con plantilla) fue de 0.568 Å y con La47-I-Tasser (sin plantilla) 0.972 Å.

Para la variante C_{ss}5414, se obtuvo un porcentaje de identidad de 42.9% por lo que el modelado se basó en la homología con la plantilla (1D9M). El modelo seleccionado fue el del menor *score* global ya que también refleja ser el de menor energía. Comparando las metodologías del de menor *score* global y el del clúster más poblado se encontró que los valores de RMSD son similares por lo que, estructuralmente, no son muy distintos. Lo anterior justificó la selección de los mejores modelos para C_{ss}5415E y La4715.

En cuanto a La47, debido a que el porcentaje de identidad fue del 30% se optó por utilizar tanto I-Tasser como Rosetta (Figura 10). Con I-Tasser la generación de los modelos fue aceptable en tres de las variaciones (server + plantilla, suite + plantilla y suite –plantilla). Con Rosetta se seleccionó, como anteriormente se hizo para C_{ss}5414, el modelo de menor *score* global. De ambos programas se optó por seleccionar el modelo generado por Rosetta ya que la estructura generada con I-Tasser presentó una gran cantidad de enlaces erróneos (*bad bonds*, de acuerdo con la evaluación de Molprobit, los cuales indican enlaces por arriba de 4σ conocidos como *outliers*).

Para La4715E se realizó el modelado por homología con Rosetta ya que el porcentaje de identidad fue mayor al 30%. Para esta variante se utilizaron dos plantillas distintas. En 1LYP sólo había un confórmero proveniente de RMN, lo cual generó dudas dada la metodología en donde se espera que se reporten varios confórmeros. Para 2MWT, el número de confórmeros fue lógico ya que se reportaron 20/100, sin embargo, el porcentaje de identidad fue menor (40.0%) al de 1LYP (53.3%), por lo cual se construyeron modelos para ambos. Con 1LYP se encontró un *score* global de -16.841 mientras que para 2MWT fue de -19.850; el modelo seleccionado fue el de 2MWT por tener el menor valor de entre los dos.

La validación de todos los modelos generados por Rosetta contenía valores óptimos de acuerdo con Molprobit (Figura 11a) y con PROCHECK (Figura 11b). La buena

calidad de las estructuras fue producto de haber heredado la estructura de las plantillas y del refinamiento del programa.

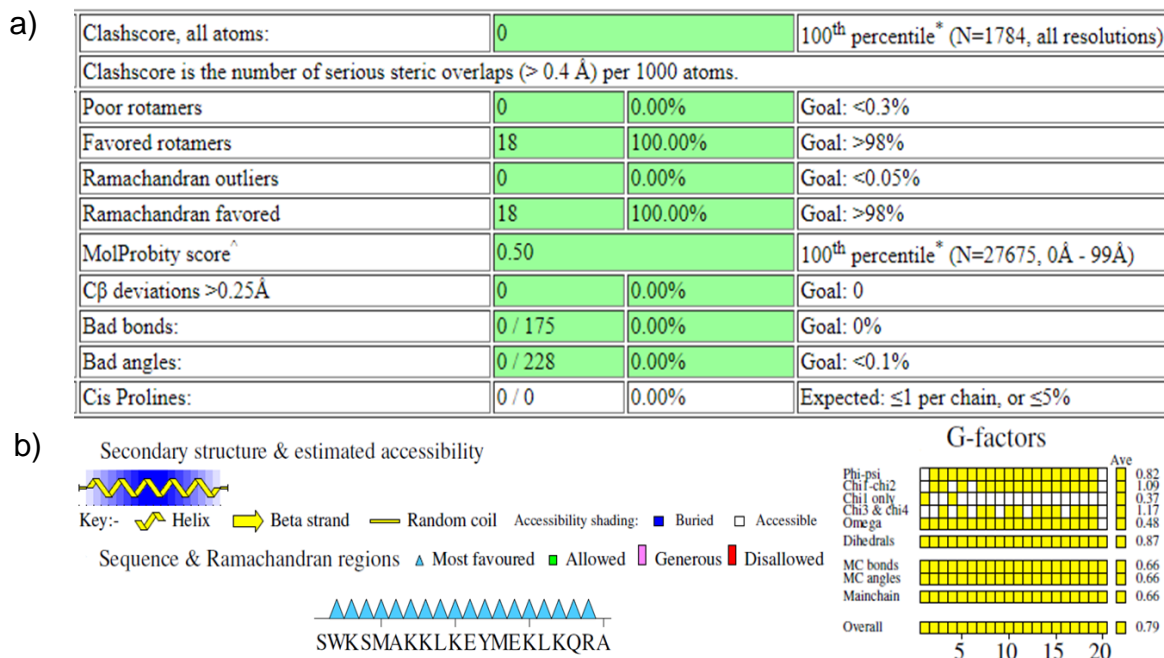


Figura 11. Evaluación del modelo de La47. a) Molprobity y b) PROCHECK. Todos los modelos excepto C554 presentaron comportamientos similares.

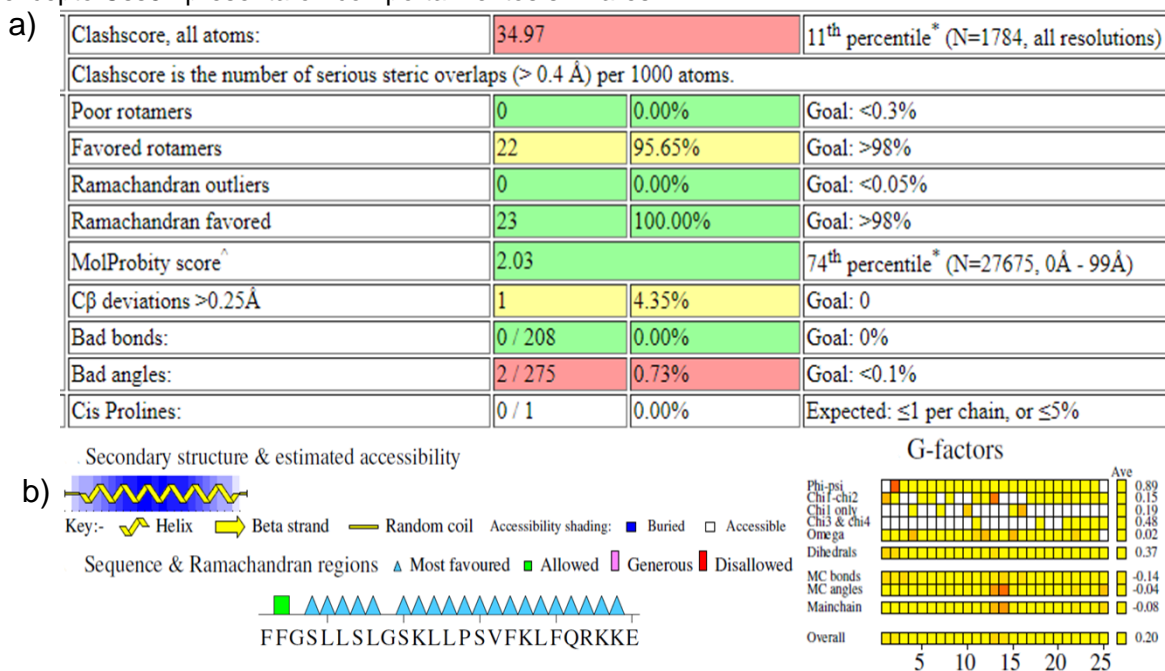


Figura 12. Evaluación del modelo de C554. a) Molprobity y b) PROCHECK.

Sólo en el caso de C_{ss}54 generado con I-Tasser el modelo presentó problemas en su geometría (Figura 12), principalmente de choques estéricos y de ángulos erróneos. El problema de los choques se solucionó con la minimización. En el Anexo II se encuentra una descripción de los parámetros evaluados.

Todas las estructuras fueron minimizadas como se comentó en la metodología; los modelos finales se muestran en la Figura 13.

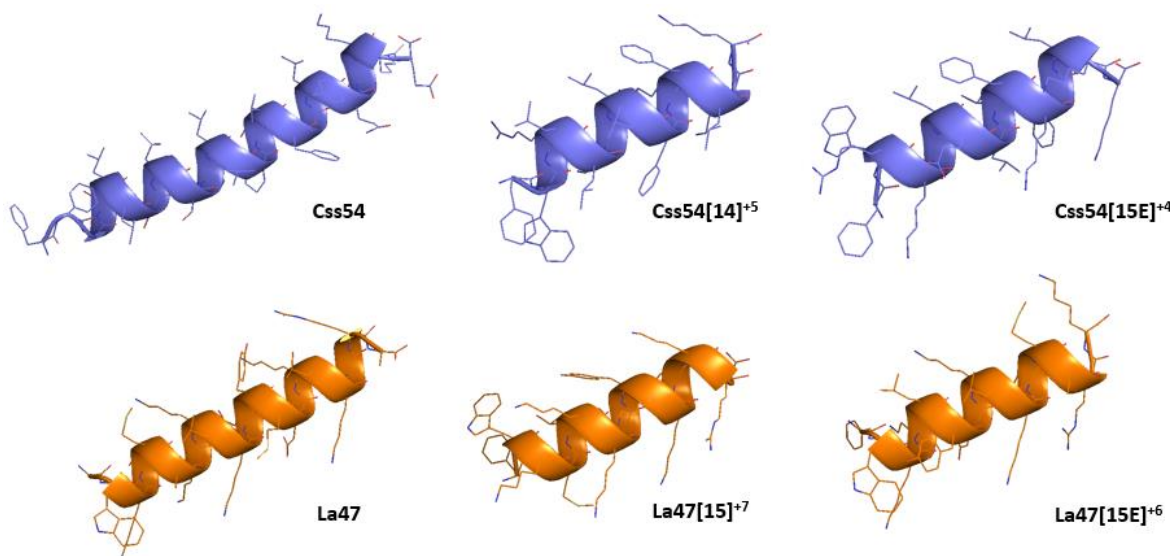


Figura 13. Estructuras de los modelos de C_{ss}54, La47 y variantes.

6.2 Membranas lipídicas

Se realizó la simulación de ambas membranas por 200 ns. El promedio alcanzado de temperatura durante la simulación (Figura 14a) fue de 303.15 ± 0.01 K y 303.15 ± 0.01 K y de presión (Figura 14b) 1.0 ± 0.5 bar y 1.1 ± 0.1 bar para las membranas de POPC y POPG, respectivamente; indicando un correcto equilibrio de presión (1 bar) y temperatura (303.15 K).

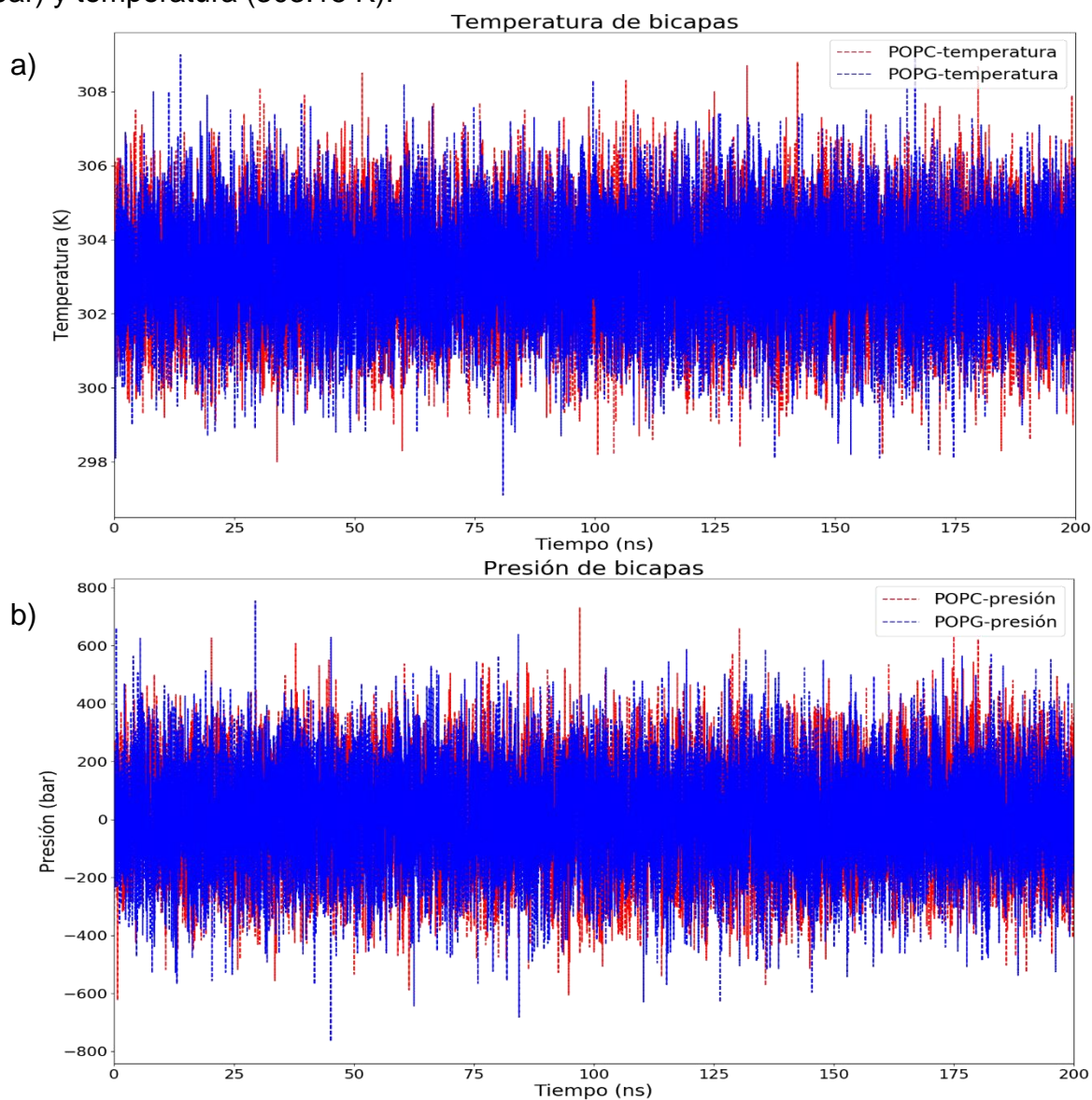


Figura 14. Comportamiento de a) temperatura y b) presión de las bicapas. En rojo se muestra la bicapa de POPC y en azul de POPG, simulación por 200 ns.

Con las trayectorias de la DM se obtuvo el área por lípido (APL, calculada mediante los diagramas de Voronoi, los cuales agrupan a los lípidos de acuerdo a cierta distancia en una determinada área [51]) y la distancia promedio entre los átomos de fosfatos de las cabezas polares de cada capa de la membrana (grosor de la membrana [10]). Para POPC, el APL calculada fue de $64.3 \pm 1.3 \text{ \AA}^2$ y la distancia P-P de $38.9 \pm 0.7 \text{ \AA}$. Los valores obtenidos por la simulación son consistentes con los encontrados experimentalmente (por dispersión de rayos X), $64.3 \pm 1.3 \text{ \AA}^2$ para el APL y $39.1 \pm 0.7 \text{ \AA}$ para el grosor de la membrana [56]. En la Figura 15 se muestra el comportamiento de estas propiedades a lo largo de 200 ns de simulación; al inicio de la simulación el APL de ambas membranas aumenta debido a las dimensiones de la caja cambian (disminuyen) para alcanzar la presión deseada.

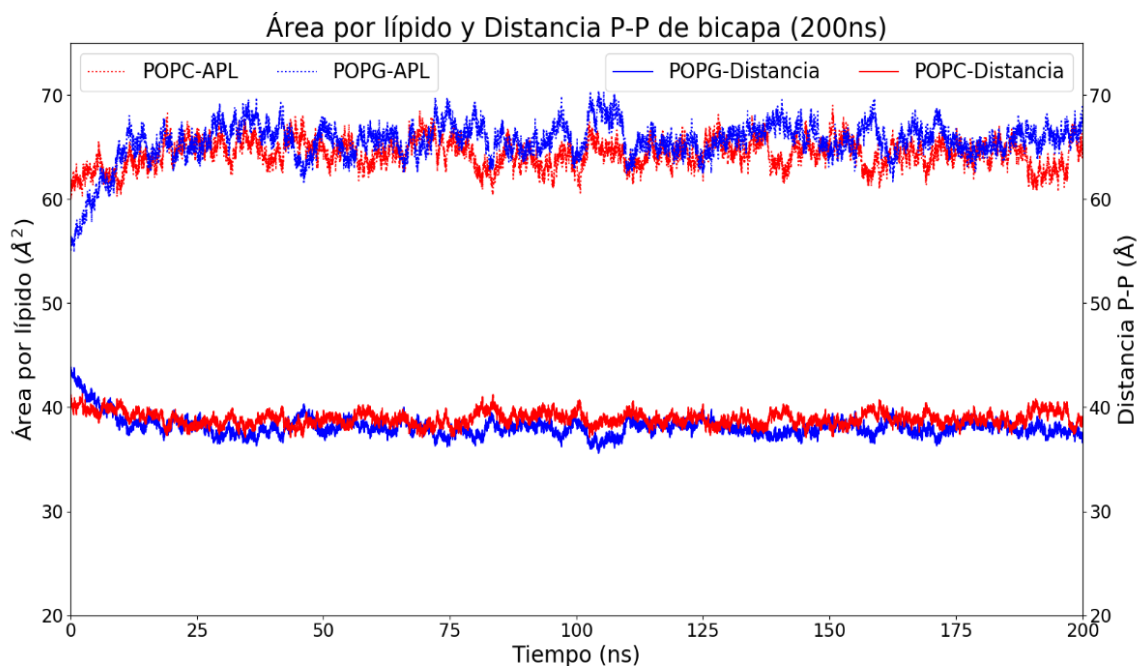


Figura 15. Área por lípido (APL) y grosor de la membrana. En rojo se muestra la membrana de POPC y en azul de POPG, simulación por 200 ns; el grosor se representa como la distancia entre los átomos de P-P de cada cara de la bicapa.

Respecto a la membrana de POPG los resultados de APL y de distancia entre P-P fueron $65.5 \pm 1.9 \text{ \AA}^2$ y $38.1 \pm 0.9 \text{ \AA}$, respectivamente. El valor experimental del APL es cercano al obtenido por dispersión de rayos X, $66.0 \pm 1.3 \text{ \AA}^2$ [57]. En cuanto a la

distancia P-P el valor se encontró dentro de los considerados por la desviación estándar experimental ($36.7 \pm 0.7 \text{ \AA}$ [57]).

El orden de las cadenas de ácidos grasos es otro parámetro que nos indica la estructura de la membrana y puede medirse mediante el parámetro de orden, el cual se encuentra graficado en la Figura 16; este valor es calculado a partir del ángulo del vector CH de las cadenas de ácido graso respecto al eje (Z) normal a la membrana [58]. En esta gráfica se observa que los valores de $-S_{CH}$ u orden para la cadena sn-1 (palmitoil, 16:0) y sn-2 (oleil, 18:1 Δ^9) de POPC presentan valores, ligeramente, superiores a los del POPG, es decir, las cadenas presentan un mayor orden. Esto podría ser consecuencia de las características de las cabezas polares entre los dos fosfolípidos, PC que es zwitterión y PG con carga negativa.

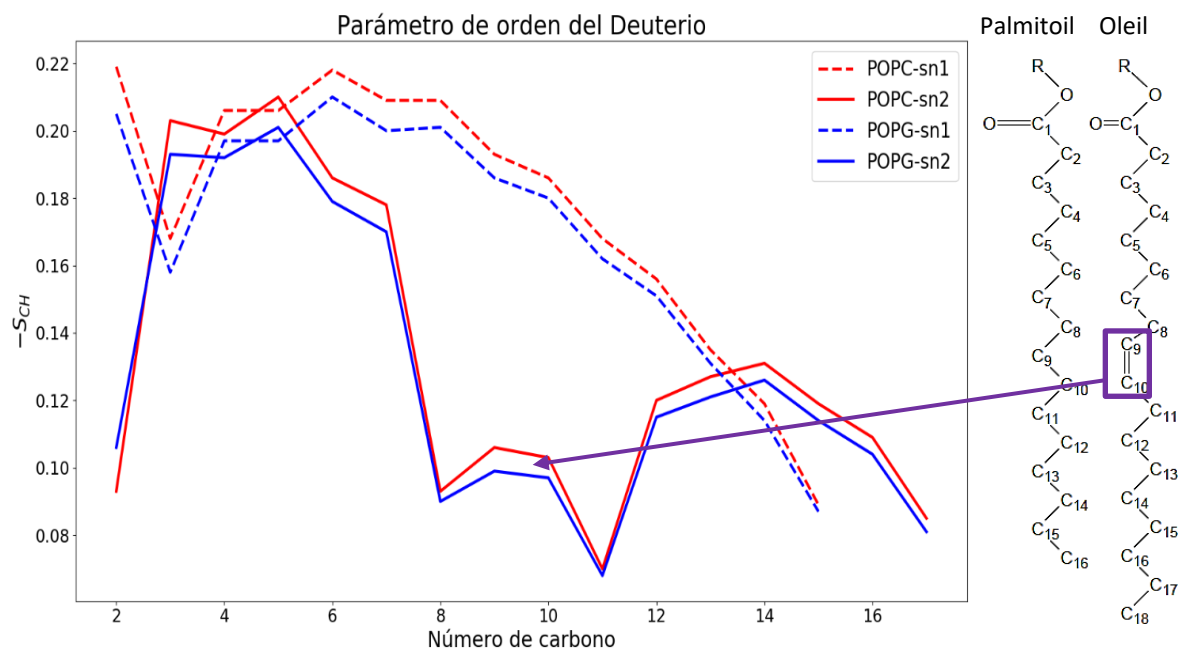


Figura 16. Parámetro de orden para las cadenas alifáticas en las bicapas. En rojo se muestra el comportamiento para la bicapa de POPC y en azul para POPG. La línea punteada indica la cadena sn-1 de palmitoil (16:0) y la continua sn-2 de oleil (18:1 Δ^9).

El comportamiento de ambas bicapas es similar al reportado por experimentos de RMN [59], en los cuales el orden disminuye entre los carbonos 9 y 10 de sn-2 en donde se encuentra el doble enlace del ácido oleico [44]. La disminución es producto

del decremento del ángulo C-H, generado por la configuración *cis* en el doble enlace, respecto a la normal a la membrana.

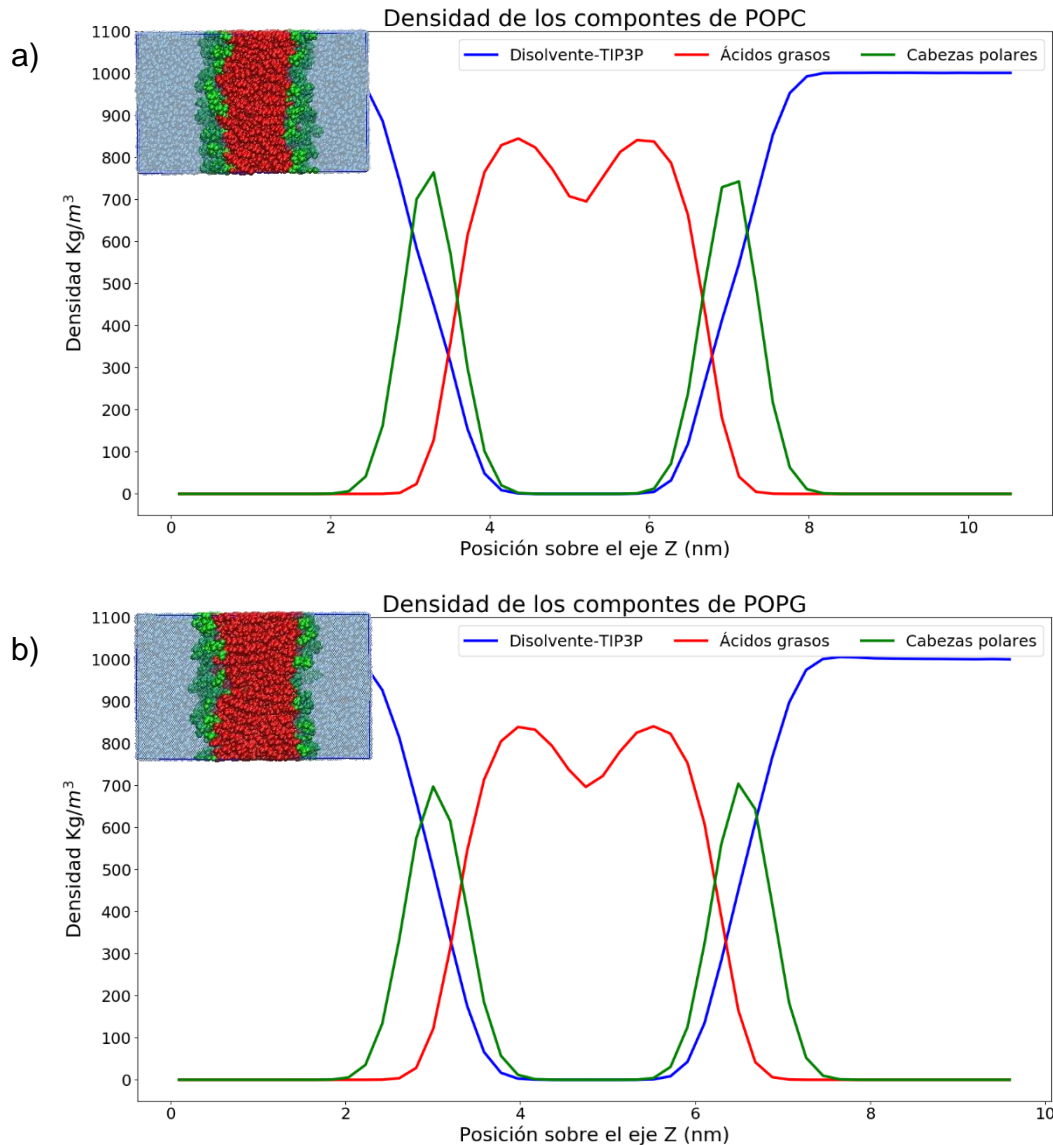


Figura 17. Densidad de los componentes de a) POPC y b) POPG. En azul se muestra la densidad del disolvente (TIP3P), en rojo de los ácidos grasos (Palmitoil y Oleil) y en verde de las cabezas polares (Colina y Glicerol para POPC y POPG, respectivamente). Valores respecto al eje z.

En la Figura 17 se muestran los componentes de POPC (17a) y POPG (17b) graficados respecto a su posición sobre el eje Z o normal a la membrana. En ellas se observa que las zonas (del disolvente, de las cadenas de ácido graso y de las cabezas polares de los fosfolípidos) se encuentran definidas y por lo tanto la

integridad de la membrana se mantiene a lo largo de la simulación. La densidad de cada componente considera el volumen en donde se encuentra y su masa [58]. Es de notar que la densidad de las cabezas polares sea mayor en POPC respecto a POPG, lo cual se debe a que la colina (MM= 104.2 g/mol) tiene una mayor masa molecular (MM) que el glicerol (MM= 92.1 g/mol).

En la Tabla 6 se muestra un resumen de las propiedades calculadas. La temperatura y presión son las utilizadas como referencia durante las simulaciones. La tercera columna es una referencia de simulación realizada con la versión 14 de AMBER y el campo de fuerzas de C36 por 1 μ s y como modelo de agua TIP3P en donde se observan valores cercanos a los calculados en nuestras simulaciones para el área por lípido, pero no en grosor de la membrana.

Tabla 6. Parámetros calculados para las membranas de POPC y POPG, simulaciones de 200 ns.

^a Por dispersión de neutrones y dispersión de rayos X de ángulo reducido.

^b Por dispersión de neutrones, dispersión de rayos X de ángulo reducido y dinámica molecular.

Propiedad	Simulación 200 ns	Skjevik. A., 2016 [60]	Datos experimentales
Bicapa de POPC			
Área por lípido (Å ²)	64.3 ± 1.3	63.8 ± 1.2	^a 64.3 ± 1.3 [56]
Distancia P-P (Å)	38.9 ± 0.7	37.4 ± 0.0	^a 39.1 ± 0.8 [56]
Temperatura (K)	303.15 ± 0.01	303.00	303.15
Presión (bar)	1.0 ± 0.5		1.0
Densidad (Kg/m ³)	1015.6 ± 0.0		1000.0
Bicapa de POPG			
Área por lípido (Å ²)	65.6 ± 1.9	67.2 ± 1.4	^b 66.0 ± 1.3 [57]
Distancia P-P (Å)	38.1 ± 0.9	34.2 ± 0.0	^b 36.7 ± 0.7 [57]
Temperatura (K)	303.15 ± 0.01	303.00	303.15
Presión (bar)	1.1 ± 0.5		1.0
Densidad (Kg/m ³)	1028.2 ± 0.0		1000.0

6.3 Sistemas PAM-Membrana

Para conocer la manera en que cada PAM interactúa con la membrana, se analizaron las siguientes características: su estructura secundaria a lo largo de los 200 ns, RMSD respecto a la estructura inicial, ángulo de inclinación respecto al eje perpendicular a la membrana, interacciones intermoleculares (electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y catión- π) y energías de unión de los sistemas

y su contribución por residuo; así como el grosor de la membrana y el APL promedios.

6.3.1 Estructura secundaria

Como se observa en la Tabla 7 el porcentaje de helicidad de los PAMs fue mayor en las membranas de POPG en comparación con las de POPC, comportamiento similar al reportado para otros PAMs con los mismo tipos de membranas [61], mientras que el de conformación aleatoria (*random coil*) es mayor en las membranas de POPC comparado con las de POPG. El programa *STRIDE*, incluido en VMD, a partir de una función de energía (dependiente de puentes de hidrógeno principalmente) asigna la estructura secundaria [62]. La mayor estabilidad de estructura secundaria en las membranas de POPG es, posiblemente, generada por la formación de interacciones electrostáticas con los fosfolípidos que presentan carga neta negativa y las posteriores interacciones de tipo hidrofóbico con la región de las cadenas de ácidos grasos. Los PAMs al no establecer interacciones adecuadas con POPC permanecen más tiempo en contacto con las moléculas de agua y debido a que son péptidos anfipáticos es posible que pierdan estructura secundaria al no estar en contacto con la región no polar de la membrana [63].

Tabla 7. Proporción de estructura secundaria de los PAMs en las tres réplicas.

PAM	POPC			POPG		
	Hélice	Coil	Otros	Hélice	Coil	Otros
Css54	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Css5415E	0.8 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Css5414	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.0 ± 0.0
La47	0.7 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.0 ± 0.0
La4715E	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.0 ± 0.0
La4715	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Las únicas excepciones al comportamiento, anteriormente, mencionado fueron C_{ss}5415E y C_{ss}5414. El primero presentó en las tres réplicas un porcentaje de

helicidad superior en POPC (promedio de 0.8 ± 0.0) que en POPG (promedio 0.7 ± 0.1), producto de la interacción con la membrana. C_{ss}5414 tuvo un comportamiento similar pero sólo en dos de las réplicas (información no presentada); sin embargo, el promedio de helicidad en POPC (0.7 ± 0.1) fue menor que en POPG (0.8 ± 0.1). Aunque bien, debido al traslape de las desviaciones estándar podrían tener un comportamiento similar al de los demás PAMs.

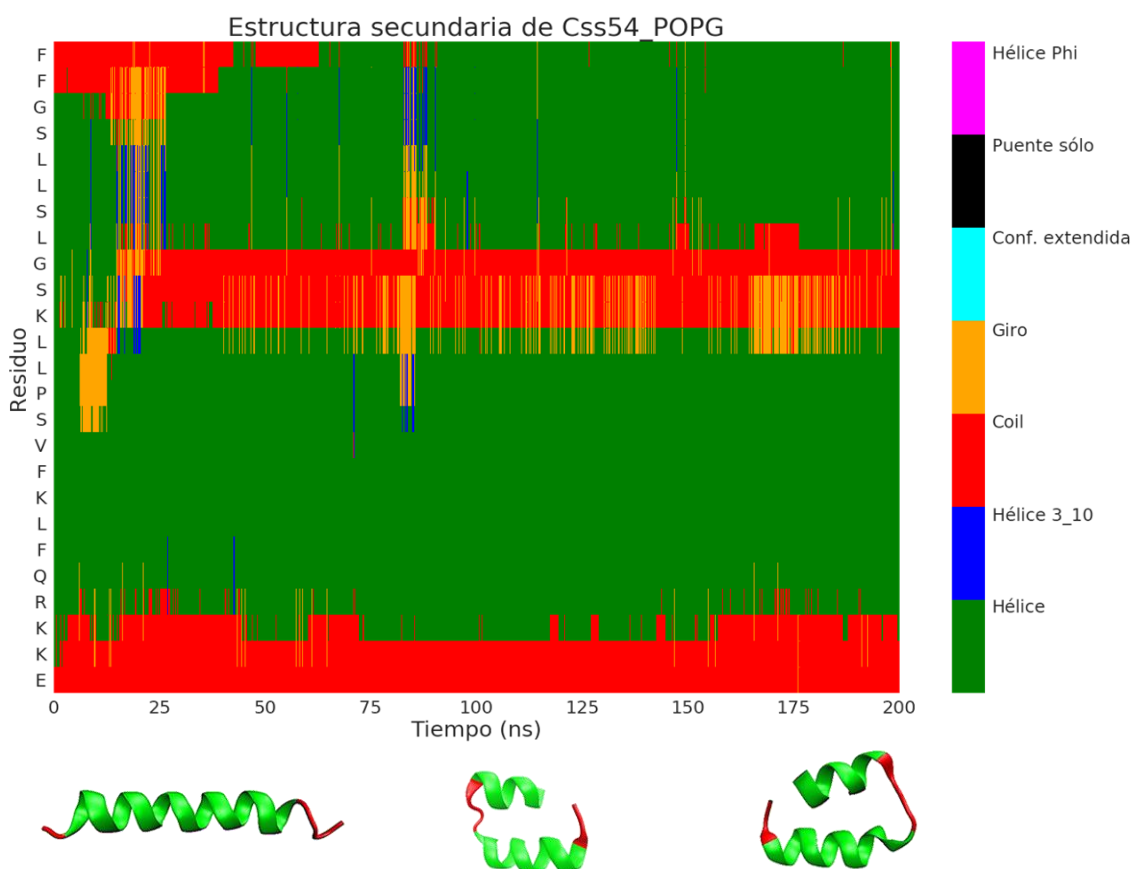


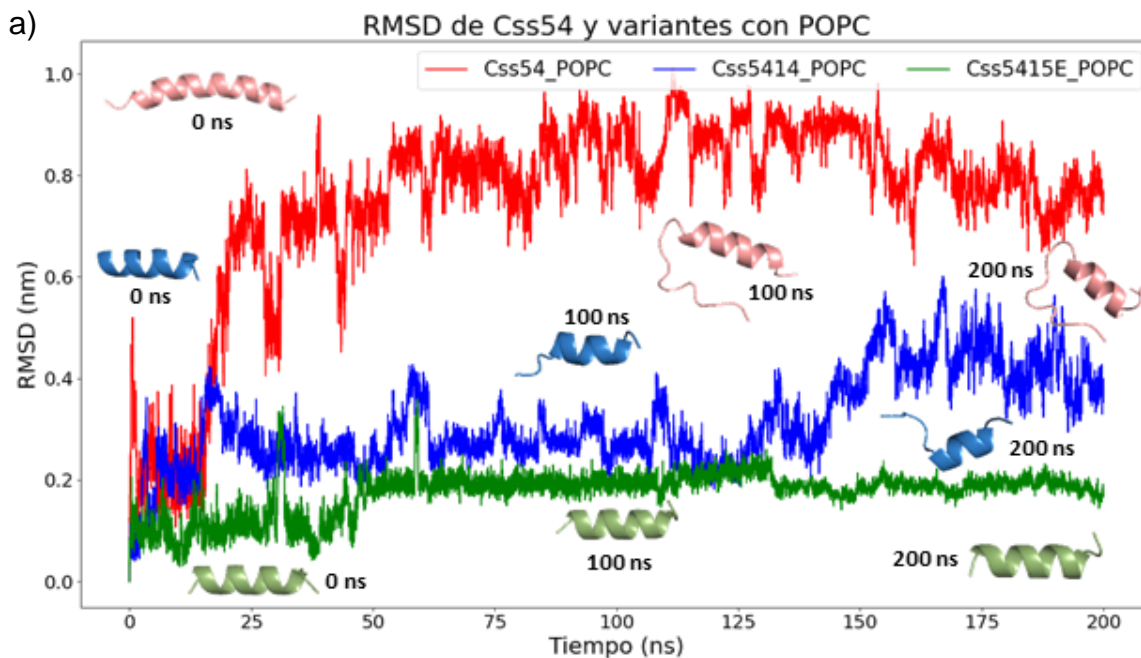
Figura 18. Estructura secundaria de C_{ss}54 con POPG en 200 ns. En la sección de abajo se encuentran las conformaciones al tiempo 0, 100 y 200 ns. El RMSD, calculado con ProFIT 3.1, de los átomos pesados (C, C α , O y N) entre la estructura a 0ns y 100ns es de 8.352 Å, entre 0ns y 200ns es de 8.200 Å y entre la de 100ns y 200ns es de 0.971 Å.

Sin tomar en cuenta el orden en la secuencia entre C_{ss}5415E y C_{ss}5414 se observó que la presencia del ácido glutámico (E) aumentó el porcentaje de helicidad en membranas de POPC; lo contrario sucedió con las mismas variantes en membranas de POPG. La4715E y La4715, presentaron el mismo comportamiento.

Un caso relevante en los sistemas simulados fue el de C_{ss}54 tanto con POPC (en dos de las réplicas) como con POPG (una réplica) ya que este PAM presentó un cambio conformacional importante generado por la Gly-9. En la Figura 18 se observa el gráfico de la estructura secundaria de C_{ss}54 con POPG por residuo a lo largo de los 200 ns para la réplica uno. En ella es de notar que este cambio en la conformación se mantiene en gran parte de la simulación. Las conformaciones de los demás PAMs no presentaron cambios tan notables en su estructura secundaria. De manera general los residuos cercanos al extremo C-terminal se mantienen como *random coil* [64], el extremo N-terminal entre más cercano a la membrana presenta un mayor porcentaje de helicidad (principalmente en sistemas con POPG) y residuos ubicados en el centro del PAM se comportan como hélice .

6.3.2 Comportamiento del PAM

Para conocer la estabilidad del PAM se analizó el RMSD (Figura 19), el cual compara la estructura inicial, únicamente de los átomos pesados (N y C) de la cadena principal, con cada una de las generadas a lo largo de la simulación, también se estudió el ángulo de inclinación.



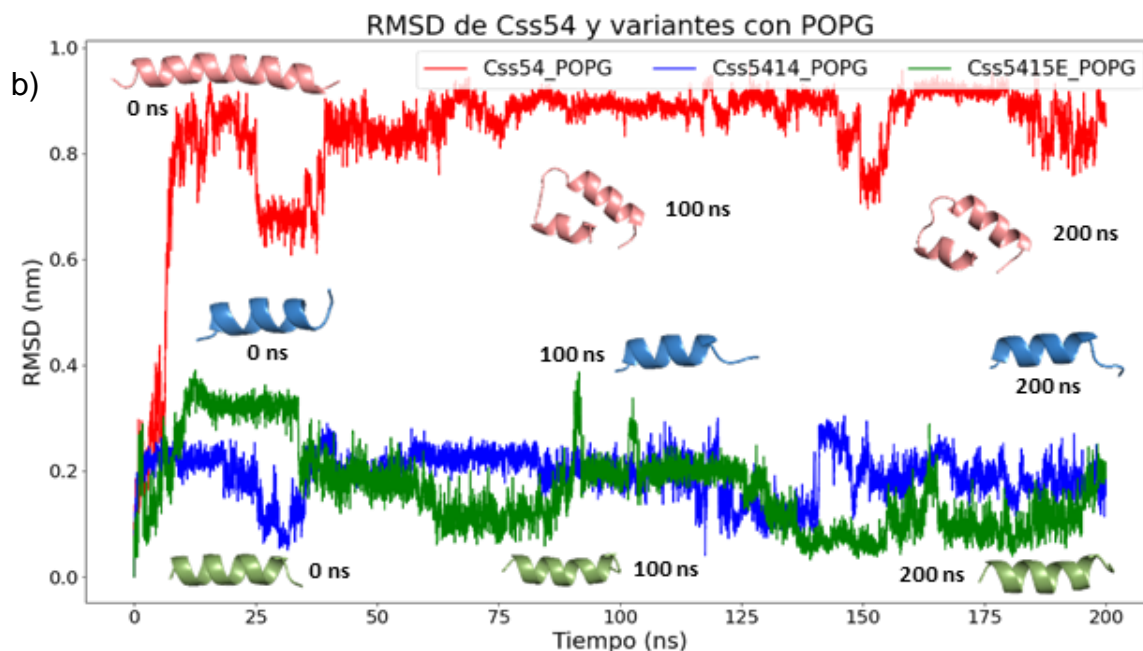


Figura 19. RMSD para Css54 y sus variantes con membranas de POPC y POPG para la réplica uno. a) Css54 y variantes con POPC y b) Css54 y variantes con POPG. Se muestran las estructuras a los 0, 100 y 200 ns.

En estas gráficas se observó que de manera general para las tres réplicas (réplica dos y tres en ANEXO III), Css54 con POPC incrementó su RMSD cuando comenzó a perder la estructura secundaria por la presencia de G9 lo que generó un cambio de entre 0.4 y 0.6 nm a lo largo de la simulación. Css5414 y Css5415E se mantuvieron por debajo de 0.4 nm en la mayor parte de la dinámica, Css5415E fue el PAM que menos cambios de RMSD presentó (cercano de 0.2 nm en todas las réplicas). Con POPG los valores más altos de RMSD se encontraron por debajo de 0.9 nm; Css54 y Css5414 presentaron valores más pequeños de RMSD (debajo de 0.4 nm). Sin embargo, Css5415E tuvo valores menos estables que en ocasiones fueron superiores a 0.2 nm, como se observó para POPC.

En la Figura 20 se encuentra el RMSD a lo largo de 200 ns para La47 y variantes de la primera réplica (réplicas dos y tres en ANEXO III), en ellas se observa que estos PAMs presentaron menos cambios en su RMSD en comparación con los de Css54 y variantes. En general todos los péptidos permanecieron por debajo de 0.7 nm. Con POPG, el cambio fue aún menor manteniéndose por debajo de 0.3 nm

para todos los PAMs (convirtiéndose en los péptidos más estables de todos los sistemas). Además, se observó que el aumento de RMSD es consecuencia del cambio en la estructura secundaria y no, necesariamente, de la falta de interacción con la bicapa.

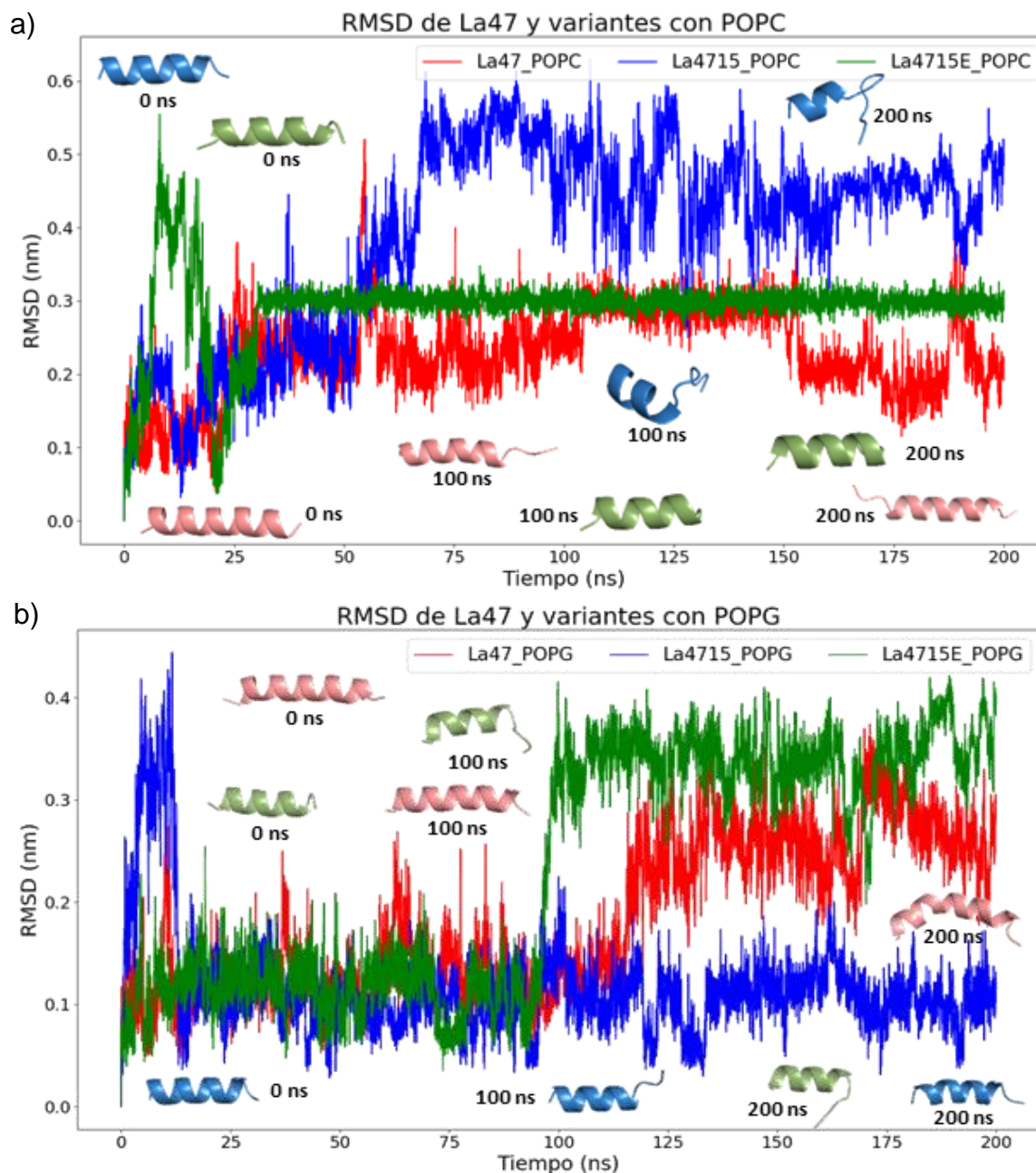


Figura 20. RMSD para La47 y sus variantes con membranas de POPC y POPG para la réplica uno. a) La47 y variantes con POPC y b) La47 y variantes con POPG. Se muestran las estructuras a los 0, 100 y 200 ns.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 8 se muestran los ángulos respecto al eje z para cada uno de los sistemas en cada réplica (Figura en ANEXO I), este dato nos indica que tanto puede moverse el PAM durante toda la simulación. En ella se observa que todos los péptidos tienen menor desviación estándar en POPG respecto a POPC. En POPC, los péptidos no encontraron una forma adecuada de interactuar con la membrana y adoptaron ángulos que variaron más que en POPG. Con POPG, al interactuar rápidamente, los PAMs tuvieron menor grado de movimiento.

Tabla 8. Promedios de los ángulos de inclinación de POPC y POPG para cada réplica.

PAM	Lípido	Ángulo (°) Réplica uno	σ	Ángulo (°) Réplica dos	σ	Ángulo (°) Réplica tres	σ	Ángulo (°) PAM- Membrana
Css54	POPC	82.2	39.2	85.5	42.3	99.7	37.0	7.6 ± 2.1
	POPG	72.7	19.2	83.4	16.5	105.1	25.5	13.0 ± 4.6
Css5415E	POPC	66.5	27.7	81.7	42.1	105.4	37.8	15.7 ± 6.2
	POPG	145.8	14.4	59.2	19.9	125.4	19.2	40.6 ± 10.9
Css5414	POPC	61.8	40.1	95.2	35.3	47.4	20.8	25.3 ± 15.4
	POPG	108.7	12.4	111.5	18.6	114.6	13.2	21.6 ± 2.4
La47⁺⁵	POPC	96.2	42.5	73.9	39.9	95.8	34.3	9.3 ± 4.8
	POPG	127.4	11.3	119.7	19.3	129.2	21.5	35.4 ± 4.1
La4715E	POPC	86.4	40.5	88.5	39.9	114.6	34.4	9.9 ± 10.4
	POPG	133.8	21.7	110.2	15.7	117.0	20.4	30.4 ± 9.9
La4715	POPC	100.5	33.7	83.4	37.9	97.4	34.9	8.2 ± 1.7
	POPG	61.2	11.0	110.3	11.8	107.3	16.4	22.1 ± 4.9

Se resaltan con verde las desviaciones estándar de POPG

El ángulo PAM-Membrana (Figura en ANEXO I) nos permite saber cómo cada PAM interactúa con la membrana. De manera general se observa que con membranas de POPC los PAMs forman ángulos menores (desde 7° hasta 15°), mientras que con POPG se encuentran desde 13° hasta 40° [65]. Si el PAM presenta un ángulo de inclinación grande respecto a la membrana y se encuentra interactuando con ella, probablemente, existan residuos que la atraviesen (Figura 21). Es importante

notar que el ángulo de inclinación sólo representa la orientación general del PAM y no si la interacción comienza por alguno de los extremos del péptido. Además, el ángulo al depender de los extremos (C- y N-terminal) para formar el vector C-N varía según la conformación de la estructura peptídica. En algunos sistemas como C55 con POPC este ángulo no es una buena aproximación ya que la pérdida de estructura secundaria propicia el doblamiento de PAM lo cual hace poco efectivo el vector C- a N- terminal.

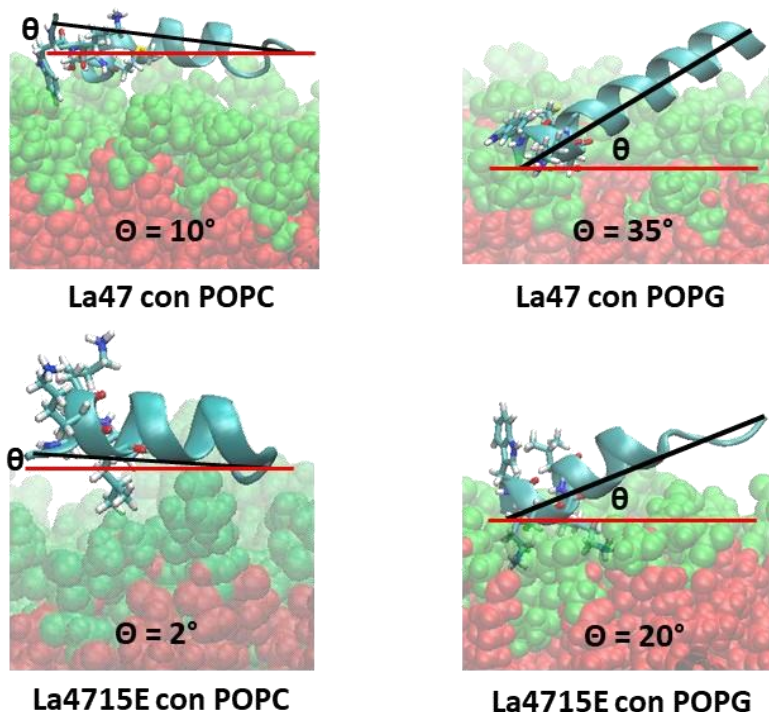


Figura 21. Ángulos respecto a la membrana para La47 y La4715E con POPC y POPG. De color verde los átomos de la cabeza polar y de rojo los de las cadenas de ácido graso.

6.3.3 Comportamiento de la Membrana

Para conocer si el PAM tenía efecto sobre la membrana se calculó el grosor (distancia entre fósforos de ambas capas) y el área por lípido (mediante los diagramas de Voronoi, explicados en la sección 6.2). En la Tabla 9 se observa que, de acuerdo con el grosor de la bicapa a lo largo de toda la simulación, las réplicas no presentaron diferencias importantes ya que los valores se encuentran dentro de

las desviaciones estándar para las simulaciones sin péptidos (puras); los mismo sucedió con el área por lípido de cada sistema.

Tabla 9. Promedios del grosor de membrana (P-P) y del área por lípido.

		Grosor (Å)	APL (Å ²)
		POPC-pura	38.9 ± 0.7
		POPG-pura	65.7 ± 1.2
Css54	POPC	39.2 ± 0.1	64.1 ± 0.2
Css54	POPG	38.0 ± 0.1	65.9 ± 0.6
Css5415E	POPC	39.1 ± 0.1	64.3 ± 1.0
Css5415E	POPG	37.9 ± 0.1	66.7 ± 0.1
Css5414	POPC	39.3 ± 0.0	63.7 ± 0.5
Css5414	POPG	37.9 ± 0.1	66.4 ± 0.3
La47	POPC	39.2 ± 0.1	64.0 ± 0.5
La47	POPG	37.8 ± 0.1	66.3 ± 0.5
La4715E	POPC	39.2 ± 0.2	64.1 ± 0.8
La4715E	POPG	38.0 ± 0.2	65.8 ± 0.2
La4715	POPC	39.1 ± 0.1	64.0 ± 0.7
La4715	POPG	38.0 ± 0.1	65.5 ± 0.5

En aquellos péptidos que lograron penetrar la membrana (Css5415E_POPC en la Figura 24a, de la réplica uno y La4715E_POPC en el ANEXO IV, de la réplica tres) se observó que los residuos hidrofóbicos de los PAMs se posicionaron por debajo de los fósforos mientras que los cargados positivamente lo hicieron en la región polar de la bicapa. Para poder ver si el fenómeno afectó a la membrana se utilizaron los últimos 50 ns de la simulación de Css5415E con POPC de la réplica uno. En la Figura 22 se observa que este péptido modificó el grosor de una región de la membrana ya que en la zona azul se localizan valores inferiores al promedio menos la desviación estándar de la membrana de POPC pura (Tabla 6). La figura se obtuvo mediante el comando *thickness* de Membrapugin, el cual mide la distancia entre dos picos de densidad a lo largo del eje z e interpola las posiciones de las cabezas polares permitiendo observar la deformación local de la membrana [51].

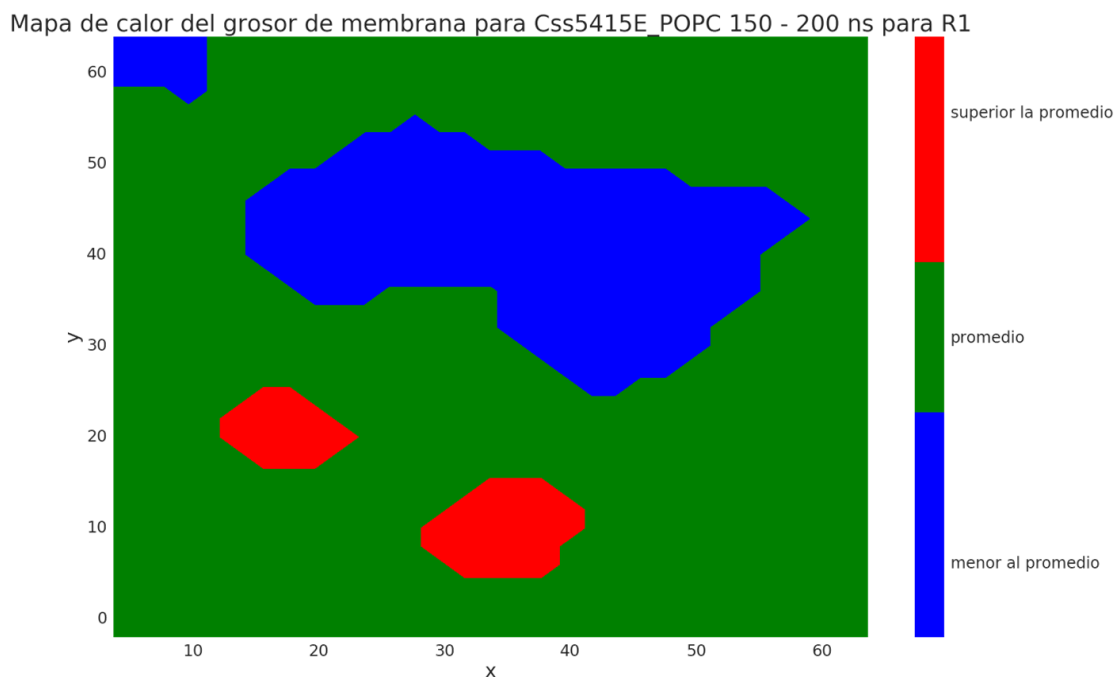


Figura 22. Mapa de calor para la distribución del grosor de membrana de Css5415E con POPC. La media y σ del sistema puro es 38.9 ± 0.7 (Tabla 6). La región de color verde es el promedio incluyendo la desviación estándar, la de color rojo son valores superiores a este y la azul menores.

Otra propiedad que presentó cambios fue el área por lípido. Para los dos sistemas mencionados anteriormente, este parámetro mostró los mayores cambios en su desviación estándar lo que indica modificaciones importantes en la distribución lateral de los lípidos. En la Figura 23a se observa la membrana de POPC en el sistema con Css5415E en el ns 10 y en la 21b se observa en el ns 132. Es claro que en el área en donde se inserta el PAM los lípidos se desplazan.

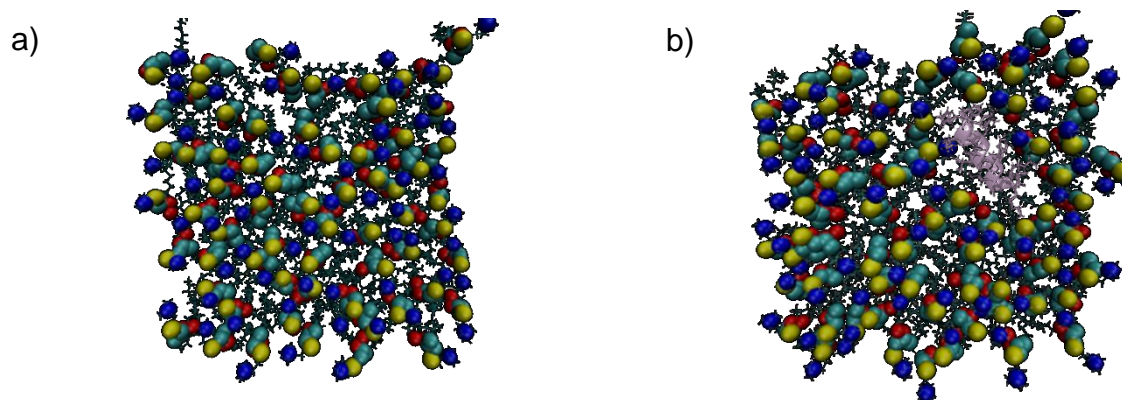


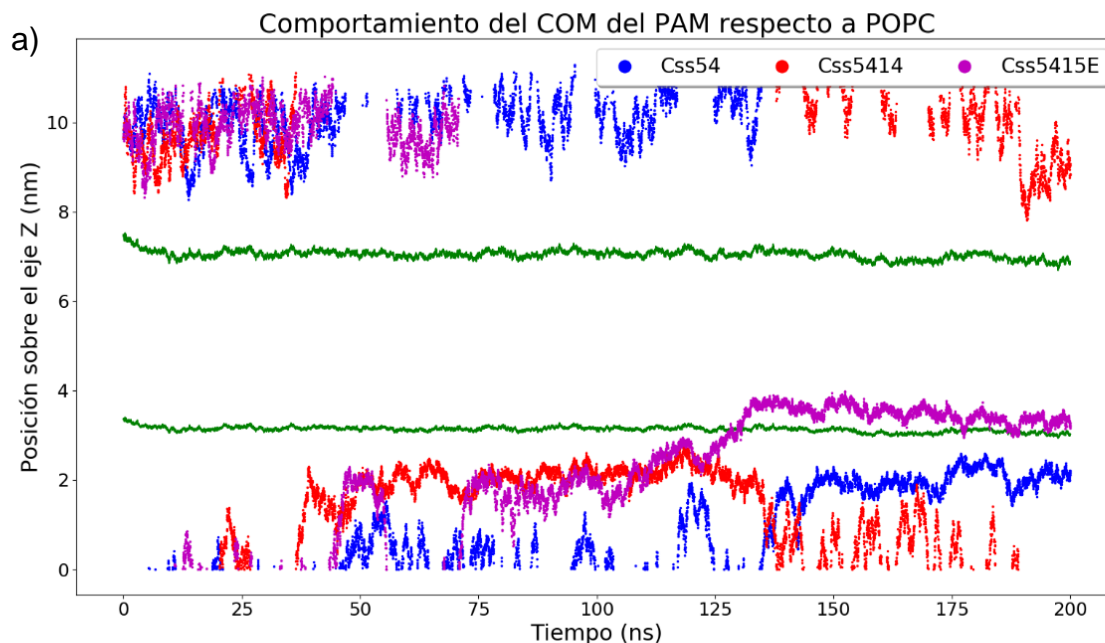
Figura 23. Css5415E con POPC para la réplica uno. a) Membrana de POPC al inicio de la simulación. b) Membrana en el ns 132. De rojo los oxígenos, de azul los nitrógenos, de amarillo los fósforos y de cian los carbonos del glicerol del ácido graso. El PAM se encuentra en color lila.

Algo similar sucede con La4715E-POPC de la réplica 3. Es importante notar que los cambios sólo se observan de manera local.

6.3.4 Interacciones PAM-Membrana

Una vez descritos los comportamientos del péptido y de la membrana individualmente, se analizó el modo de interactuar entre los PAMs y la bicapa; para realizar este análisis se estudió la posición sobre el eje z (normal a la membrana) del centro de masa de los péptidos respecto a los fosfatos (Figuras 24 y 25), con el objetivo de observar el comportamiento del PAM y si su interacción permitía la inserción en la bicapa de fosfolípidos. La discontinuidad de las líneas en las figuras indican que el PAM sale del sistema y entra en contacto con la capa inferior de la membrana y no que el PAM la atraviese; esto es similar a lo reportado en otras simulaciones de PAMs con membranas [66] .

En la Tabla VVV, se reportan el promedio del porcentaje de las tres réplicas, en decimales, del tiempo en el que el COM del PAM se encontraba a una distancia menor a 0.4nm de ambas capas de fosfolípidos.



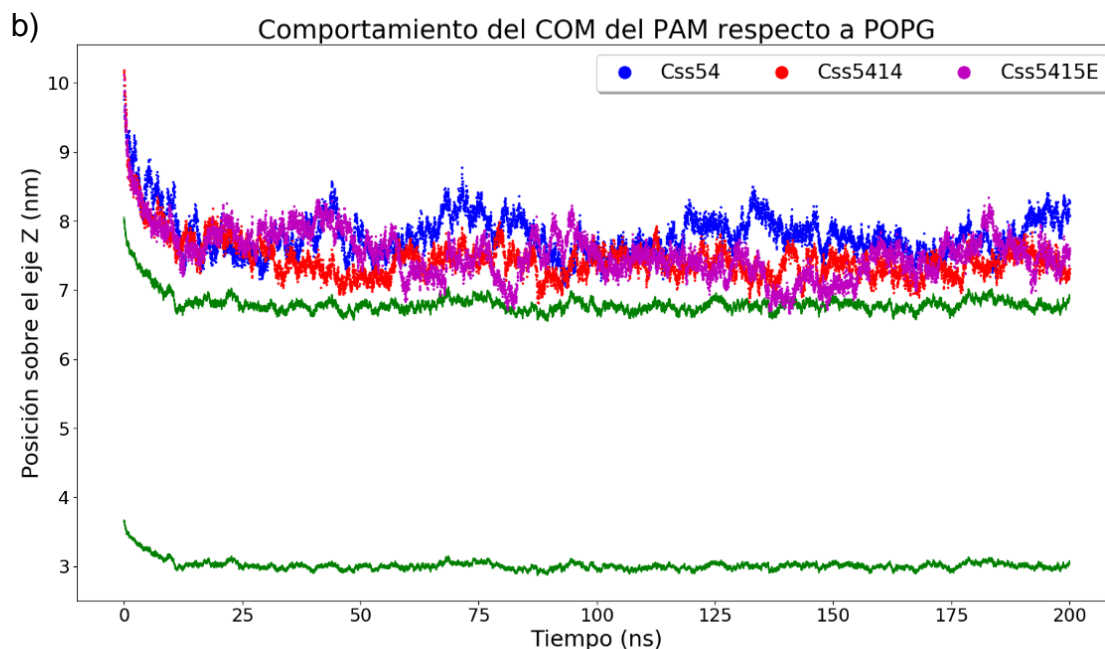
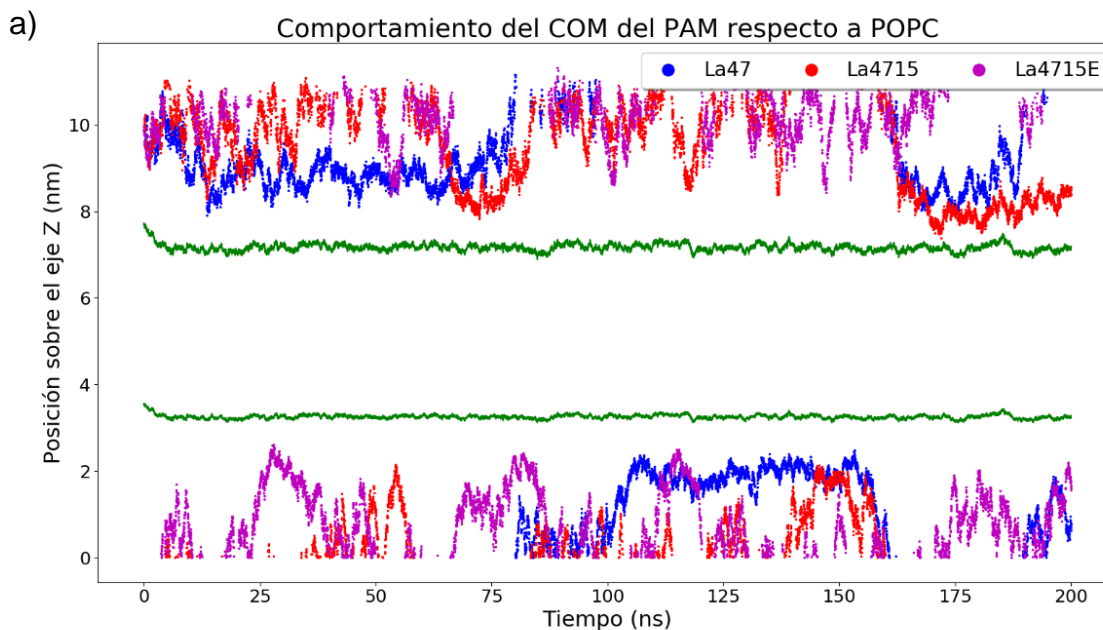


Figura 24. Ccss54 y sus variantes con POPC y POPG para la réplica uno. Ccss54 y variantes con a) POPC y con b) POPG. La línea verde representa a los fósforos (P) de las capas superior e inferior de la membrana. Las distancias son respecto al eje z de la caja de simulación

En la Figura 24a se muestra el comportamiento del centro de masa (COM) de Ccss54 y variantes con POPC para la réplica uno (las gráficas de las réplicas dos y tres se encuentran en el ANEXO IV). En la Figura 24b se presenta a Ccss54 y variantes con POPG para la réplica uno.



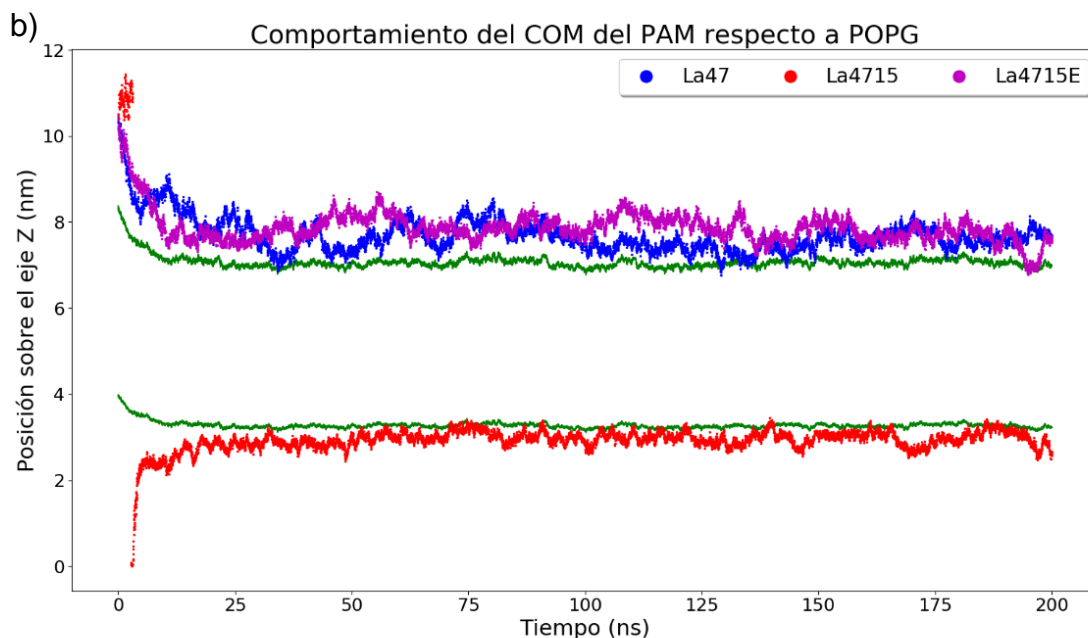


Figura 25. La47 y sus variantes con POPC y POPG para la réplica uno. a) La47 y variantes con POPC y b) La47 y variantes con POPG. La línea verde representa a los fosforos (P) de las capas superior e inferior de la membrana. Las distancias son respecto al eje z de la caja de simulación

En la Figura 25a se encuentra el comportamiento de La47 y variantes con POPC (réplicas dos y tres en ANEXO IV). En la Figura 25b La47 y variantes con POPG.

Tabla 10. Promedio del porcentaje (en decimales) del tiempo en que los COM de C_{ss}54, La47 y variantes, cumplen con el criterio de distancia. Criterio de distancia: <0.4 nm.

PAM	POPC	POPG
C_{ss}54	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0
C_{ss}5415E	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1
C_{ss}5414	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1
La47	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
La4715E	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
La4715	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.1

De acuerdo con los datos de la Tabla VVV se observa que los COM de C_{ss}54, La47 y variantes, en promedio, no se encuentran a menos de 0.4 nm de la superficie de POPC lo cual indica que no hay interacciones favorables con este tipo de membrana; las únicas excepciones fueron C_{ss}5415E y La4715E, en algunas replicas. Este fenómeno se asocia probablemente con la interacción del ácido glutámico y la carga positiva de la colina (Figura 32).

Css54, La47 y variantes, presentaron un mayor porcentaje de COM dentro de los criterios de distancia ($<0.4\text{nm}$) lo cual implica que estos PAMs interactuaron favorablemente con membranas de POPG. Los mayores porcentajes fueron de C55414 y La4715, ambos característicos porque carecen del Glu en su estructura lo cual favorece la interacción de sus residuos positivos con la carga negativa de POPG. La4715 presentó el mayor porcentaje de todos los PAMs lo cual pudo ser consecuencia de ser el que más carga presentó (+7). En general el comportamiento de los PAMs con POPC indica poca selectividad por este tipo de fosfolípido en comparación con POPG.

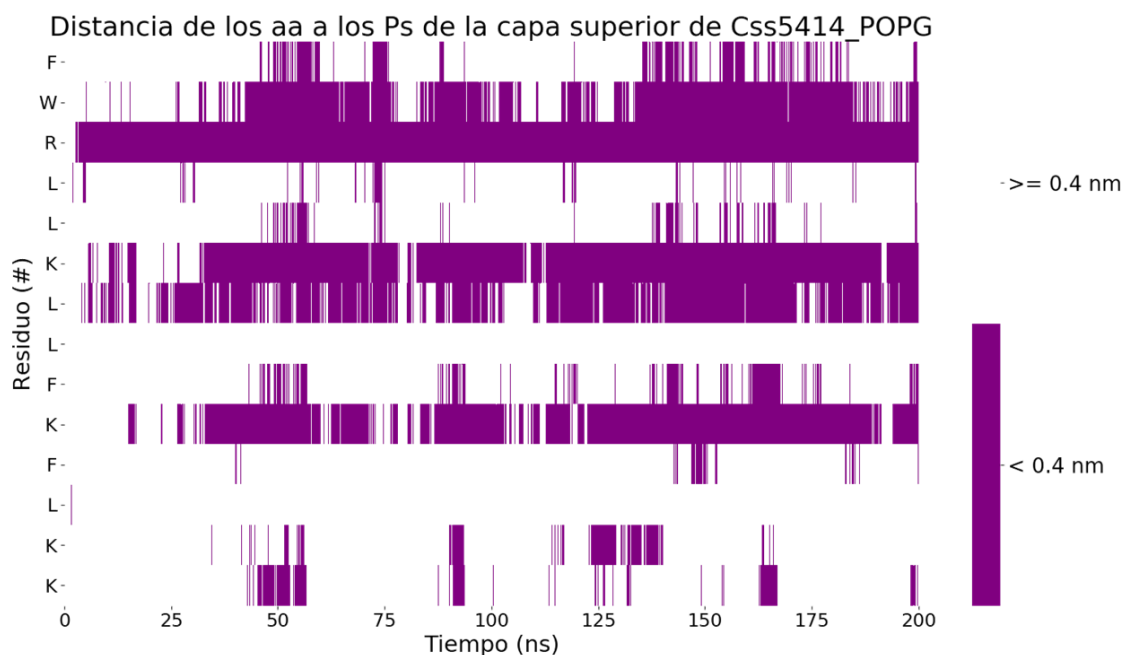


Figura 26. Comportamiento de los residuos de C55414 con POPG (capa superior) a lo largo de 200 ns de la primera réplica. Distancias menores a 0.4 nm entre la cadena lateral y los fósforos de la bicapa se identifican de morado.

Para identificar las interacciones de los PAMs con la membrana, se midieron las distancias de los centros de masa de las cadenas laterales respecto a los fósforos de las capas tanto superior como inferior, todo ello respecto a los 200 ns de simulación. Residuos a una distancia menor a 0.4 nm fueron identificados como se muestra en la Figura 26, en la cual se encuentra C55414 con la cara superior de

POPG. Las interacciones con la cara inferior son nulas. Las interacciones analizadas fueron: electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y catión- π .

En la Tabla 11 se muestra el promedio de los porcentajes decimales del tiempo (200 ns) de los residuos, de C_{ss}54 y variantes, que cumplieron con el criterio de distancia, menores a 0.4 nm de los fosfolípidos. Los residuos que cumplieron con el criterio anterior en más de la mitad de la simulación son sobresaltados con rojo y en verde aquellos que según su desviación estándar alcanzan valores de 0.5. Los valores indican que, C_{ss}54 con POPC no presentó ninguna interacción favorecida. Con POPG los residuos que más interactuaron fueron G3, L8, K11, S15, K18 y R22 (en su mayoría residuos cargados positivamente); este PAM a diferencia de todos los demás está favorecido por interacciones de residuos cercanos al extremo C-terminal (Figura 27a) lo que se debe a la interrupción de la hélice generada por la G9 que provoca que el PAM se doble. Para C_{ss}5415E con POPC, la R3 fue el residuo más cercano a la membrana y estableció interacción con los fosfatos (cargados negativamente) de la Fosfatidilcolina (Figura 27b); con POPG fueron F1, W2, R3, K4, L5 y E7 (Phe1, Arg3 y Lys4 fueron los únicos que pudieron insertarse en la capa de fosfolípidos).

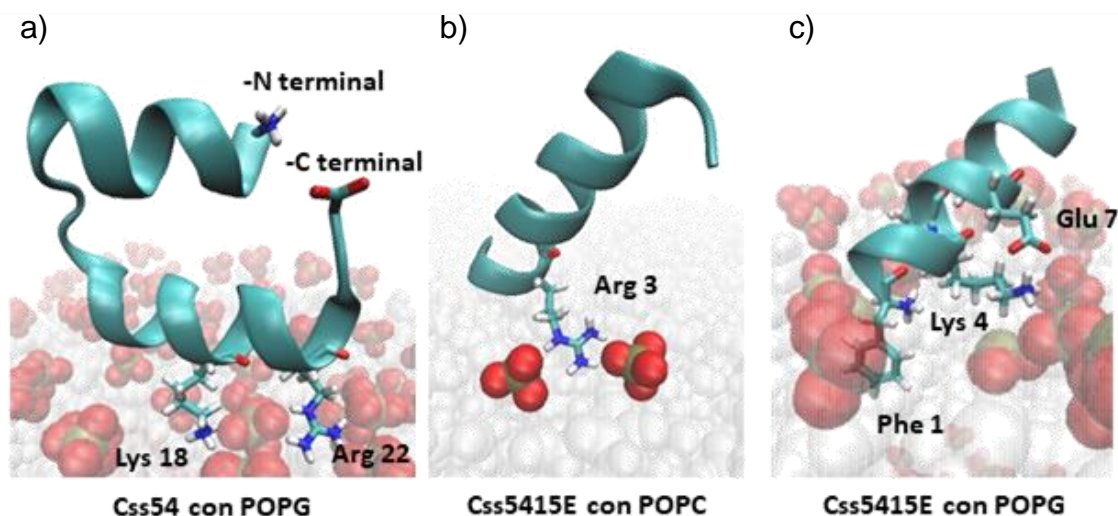
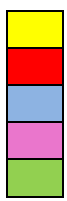


Figura 27. Interacciones relevantes de C_{ss}54 y algunas variantes con POPC y POPG. a) C_{ss}54 con POPG interactuando por el extremo –C terminal, b) Arg3 de C_{ss}5415E en interacción con los fosfatos de POPC y c) C_{ss}5415E con POPG, los residuos con carga positiva permiten la interacción del Glu7 con la bicapa. De rojo los átomos de oxígeno, de azul de nitrógeno y de verde de fósforo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 11. Promedio del porcentaje (en decimales) del tiempo en que los residuos, de C_{ss}54 y variantes, cumplen con el criterio de distancia.

C _{ss} 54				C _{ss} 5415E			C _{ss} 5414		
#	Res	POPC	POPG	Res	POPC	POPG		POPC	POPG
1	F	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2	F	0.3 ± 0.2	0.8 ± 0.2	F	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.1
2	F	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2	W	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.1	W	0.4 ± 0.3	0.7 ± 0.0
3	G	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2	R	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.0	R	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.0
4	S	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.2	K	0.2 ± 0.2	0.8 ± 0.1	L	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2
5	L	0.0 ± 0.1	0.2 ± 0.2	L	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.3	L	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.1
6	L	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	L	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.0	K	0.3 ± 0.3	0.8 ± 0.1
7	S	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2	E	0.2 ± 0.2	0.5 ± 0.1	L	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.2
8	L	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.2	L	0.1 ± 0.2	0.4 ± 0.2	L	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
9	G	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	L	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	F	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
10	S	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1	F	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	K	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.2
11	K	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.3	K	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.1	F	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0
12	L	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1	F	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.2	L	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2
13	L	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	L	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1	K	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.0
14	P	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1	K	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1	K	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2
15	S	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.1	K	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1			
16	V	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0						
17	F	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1						
18	K	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.1						
19	L	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.0						
20	F	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0						
21	Q	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1						
22	R	0.0 ± 0.0	0.8 ± 0.1						
23	K	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1						
24	K	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.1						
25	E	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0						



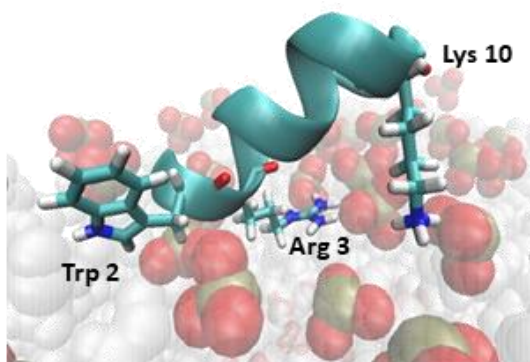
- Hidrofóbico
- Cargado +
- Cargado -
- Polares sin carga
- Especiales

* Residuos con proporción > 0.5

* Residuos con proporción cercana a 0.5

El Glu, a pesar de ser un residuo cargado negativamente, se encontró cercano a la membrana, lo que pudo ser favorecido ya que los primeros cinco residuos cercanos al extremo N-terminal tuvieron muy buena interacción (Figura 27c).

Css5414 con POPC interactuó mediante F1, W2, R3 y K6; con POPG (Figura 28) fueron W2, R3, K6, L7 y K10. En general, C_{ss}5415E y C_{ss}5414 tienen preferencia por interactuar con la membrana mediante el extremo N-terminal ya que se encuentra cargado positivamente.

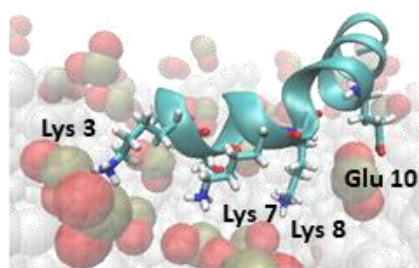


C_{ss}5414 con POPG

Figura 28. Interacciones de C_{ss}5414 con POPG. Los residuos del extremo -N terminal favorecen la interacción con la membrana mediante Trp2, Arg3, Lys6, Lys7 y Lys10. De rojo los átomos de oxígeno, de azul de nitrógeno y de verde de fósforo.

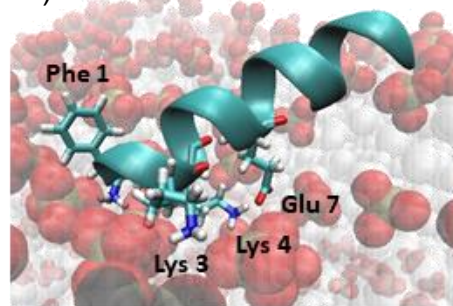
En la Tabla 12 se resumen los porcentajes decimales promedio del tiempo para La47 y sus variantes. De manera general no se encontraron residuos cercanos a la membrana en más de la mitad de la simulación de alguno de estos PAMs con POPC. Sin embargo, con POPG (Figura 29), se reconocieron varios residuos para La47: S1, W2, K3, S4, M5, K7, K8 y E11 (Ser1, Lys3 y Ser4 pudieron insertarse la membrana en las tres réplicas). Para La4715E las interacciones de F1, W2, K3, K4, E7, K8, K10, K11 y R14 fueron las que más tiempo permanecieron cercanas a POPG (la Lys3 y Lys4 lograron insertarse en la bicapa, en las tres réplicas).

a)



La47 con POPG

b)



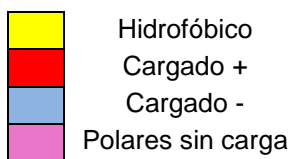
La4715E con POPG

Figura 29. Interacciones de La47 y algunas variantes con POPG. a) La47 con POPG, residuos con carga positiva favorecen la interacción, b) La4715E con POPG, Glu7 interactúan como consecuencia de la interacción de Phe1, Lys3 y Lys4. De rojo los átomos de oxígeno, de azul de nitrógeno y de verde de fósforo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 12. Promedio del porcentaje (en decimales) del tiempo en que los residuos, de La47 y variantes, cumplen con el criterio de distancia.

La47				La4715E			La4715		
#	Res	POPC	POPG	Res	POPC	POPG	Res	POPC	POPG
1	S	0.2 ± 0.2	0.9 ± 0.0	F	0.2 ± 0.2	0.6 ± 0.1	F	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.2
2	W	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1	W	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.1	W	0.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1
3	K	0.2 ± 0.2	0.8 ± 0.1	K	0.1 ± 0.1	0.9 ± 0.0	K	0.1 ± 0.1	1.0 ± 0.0
4	S	0.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	K	0.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1	M	0.0 ± 0.0	0.9 ± 0.1
5	M	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.1	L	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	L	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.2
6	A	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.0	Y	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.1	K	0.0 ± 0.0	0.9 ± 0.0
7	K	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.1	E	0.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	K	0.1 ± 0.0	1.0 ± 0.0
8	K	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.2	K	0.2 ± 0.2	0.5 ± 0.1	M	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2
9	L	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	L	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	Y	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
10	K	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	K	0.1 ± 0.2	0.4 ± 0.2	K	0.0 ± 0.0	0.9 ± 0.0
11	E	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.1	K	0.1 ± 0.2	0.6 ± 0.2	K	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.2
12	Y	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2	M	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	L	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
13	M	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	A	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	K	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1
14	E	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	R	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.2	R	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.0
15	K	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1	K	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	A	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1
16	L	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0						
17	K	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0						
18	Q	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0						
19	R	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.0						
20	A	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0						



Hidrofóbico
 Cargado +
 Cargado -
 Polares sin carga

* Residuos con proporción > 0.5

* Residuos con proporción cercana a 0.5

Finalmente, La4715 fue el péptido que más interacciones formó de todos los sistemas (F1, W2, K3, M4, L5, K6, K7, M8, K10, K11 y K14); Lys3, Lys6, Lys7, Lys10 y Arg14 (Figura 30) penetran la membrana en las tres réplicas.

El ácido glutámico de varios de los PAMs se encontró dentro de los criterios de interacción, lo cual es generado como consecuencia de la cercanía de residuos con

carga positiva a la bicapa. Además, como se discute en la siguiente parte, el Glu es un buen aceptor de puente de hidrógeno y el POPG buen donador (Figura 31), lo cual favorece la interacción con este tipo de membrana.

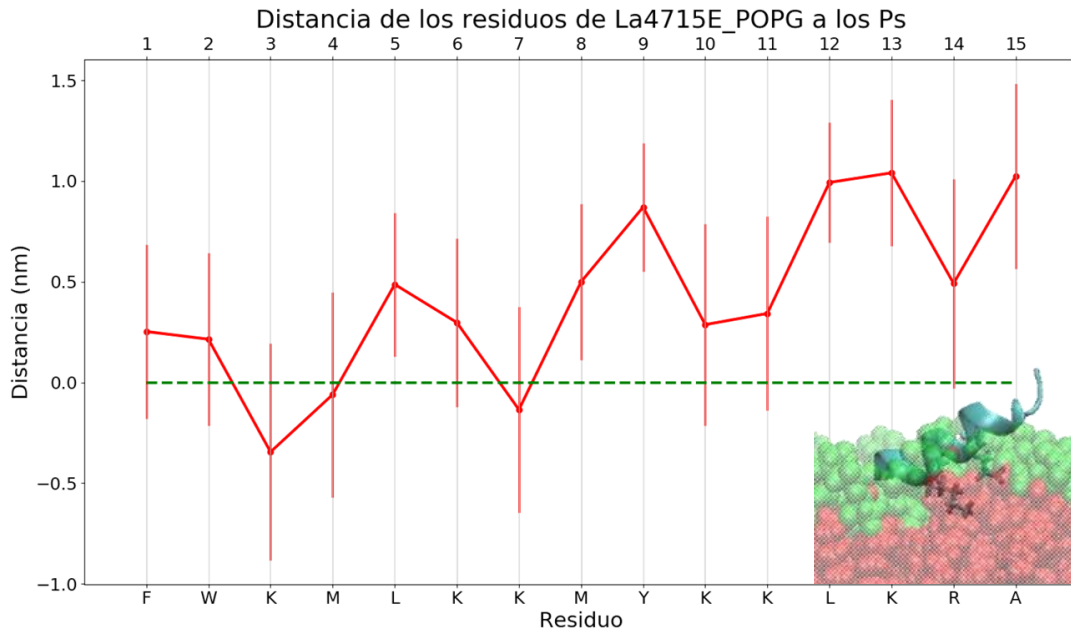


Figura 30. Comportamiento de los residuos de La4715 con POPG. Las líneas rojas representan la desviación estándar de la distancia respecto a la membrana (verde) en nm, para la réplica uno.


A diferencia de C_{ss}54 y variantes, La47 y sus variantes contienen secuencias en donde, prácticamente, todos los residuos, cargados positivamente, cumplen con el criterio de interacción. De manera general se observó que la interacción de residuos cercanos (en su mayoría hidrofóbicos) a aquellos que presentan carga, se favorece. De los residuos cargados positivamente el de mayor porcentaje fue la lisina lo cual se favoreció por el alto contenido de este residuo en los PAMs (en promedio 30%), la Arg estuvo presente en menor porcentaje (6%) y la His ausente.

En las siguientes Tablas (13 y 14) se resume la cantidad promedio de puentes de hidrógeno por residuo a lo largo de los 200 ns de la simulación, que presentaron una distancia entre donador y aceptor máximo 0.35 nm y un ángulo $\leq 30^\circ$. Todos aquellos residuos que contenían N-H y/o O-H fueron potenciales donadores de puentes de hidrógeno mientras que aquellos con átomos como O o N con pares de electrones libres, o no compartidos, fueron buenos aceptores (Arg, Gln, Glu y Ser).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 13. Número promedio de puentes de hidrógeno para Css54 y variantes.

#	Css54				Css5415E				Css5414			
	Res	POPC	POPG		Res	POPC	POPG		Res	POPC	POPG	
			Acept.	Donad.			Acept.	Donad.			Acept.	Donad.
2	F				W	23.0 ± 3.7	26.0 ± 4.3	3.0 ± 0.8	W	26.3 ± 11.1	59.7 ± 9.4	1.3 ± 1.2
3	G				R	113.0 ± 38.4	175.0 ± 5.7	2.3 ± 1.2	R	111.7 ± 23.1	101.7 ± 30.7	0.7 ± 0.5
4	S	8.7 ± 9.0	30.0 ± 18.4	1.7 ± 2.4	K	23.0 ± 6.7	71.3 ± 5.2		L			
6	L				L				K	25.0 ± 15.1	50.7 ± 10.3	
7	S	6.3 ± 8.3	28.3 ± 14.5	2.3 ± 2.1	E			38.7 ± 6.9	L			
10	S	3.0 ± 1.6	19.7 ± 9.3	2.3 ± 0.9	F				K	16.0 ± 13.5	60.0 ± 11.2	
11	K	5.0 ± 4.1	93.7 ± 11.0		K	5.0 ± 5.0	41.7 ± 10.5		F			
13	L				L				K	3.7 ± 2.9	64.3 ± 16.0	
14	P				K	15.0 ± 7.1	44.3 ± 27.4		K	4.0 ± 2.8	67.0 ± 11.2	
15	S		34.3 ± 14.0	2.3 ± 1.7	K	14.3 ± 12.7	72.7 ± 33.6					
18	K	2.7 ± 1.9	79.3 ± 8.3									
21	Q	3.3 ± 2.9	40.3 ± 8.8	10.0 ± 2.9								
22	R	18.0 ± 5.7	172.3 ± 12.7	2.3 ± 0.5								
23	K	3.7 ± 2.9	68.3 ± 8.3									
24	K	0.7 ± 0.9	89.7 ± 15.8									
25	E			20.3 ± 4.5								



■ Hidrofóbico
■ Cargado +
■ Cargado -
■ Polares sin carga

Es de notar que en POPG la cantidad de puentes de hidrógeno es mayor que en POPC, lo que es consecuencia de la capacidad de POPG de ser aceptor (Figura 31a) y donador (Figura 31b) de hidrógenos debido a los hidroxilos de su estructura (POPC sólo es aceptor, Figura 31c). Cuando POPG o POPC son aceptores los átomos involucrados son los oxígenos de los fosfatos [21], en cuanto a POPG los oxígenos del glicerol también participan como aceptores, Figura 31. Por lo anterior,

muchos residuos hidrofóbicos no formaron puentes de hidrógeno (sólo Trp y Tyr participaron en este tipo de interacción, por el –NH del indol y el –OH del fenol).

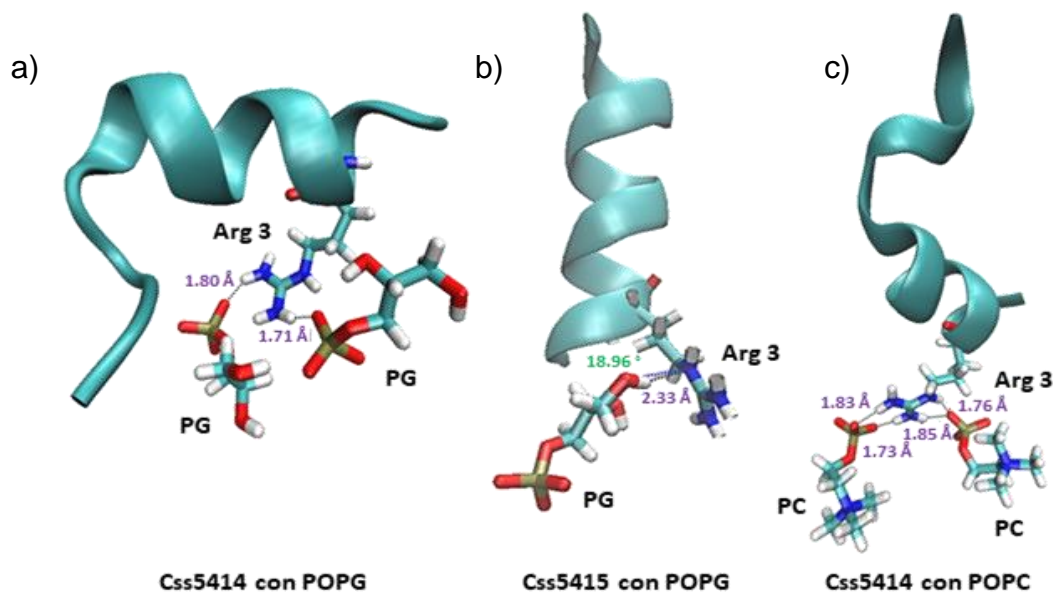


Figura 31. POPG como donador y aceptor y POPC como aceptor de puentes de hidrógeno. a) Arg3 de Cys5414 con POPG como aceptor (PG, Fosfatidilglicerol), b) Arg3 de Cys5415 con POPG como donador y c) Arg3 de Cys5414 con POPC como aceptor (PC, Fosfatidilcolina). De rojo los átomos de oxígeno, de azul de nitrógeno y de blanco los hidrógenos. De lila las distancias del puente de hidrógeno y de verde el ángulo.

La Lys sólo puede ser donador de puentes de hidrógeno, pero no aceptarlos ya que el nitrógeno de su cadena lateral no tiene pares de electrones libres (Figura 32a).

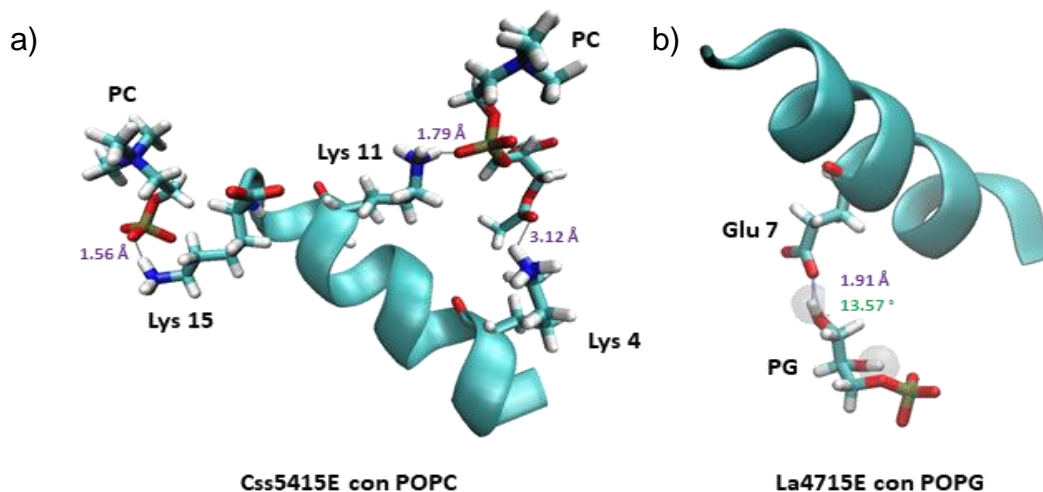


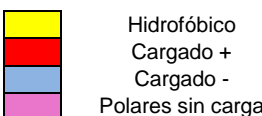
Figura 32. Puentes de hidrógeno de residuos con carga. a) Lys como donadora de puentes y los oxígenos de los fosfatos aceptores y b) Glu como aceptor de puente y los hidroxilos de PG donadores. En rojo los átomos de oxígeno, azul de nitrógeno y blanco los hidrógenos. De lila las distancias del puente de hidrógeno y de verde el ángulo. PC, Fosfatidilcolina y PG Fosfatidilglicerol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sin embargo, la Arg, sí puede ser aceptor (además de donador) ya que en el grupo guanidinio existen nitrógenos que presentan un par de electrones libres [67], Figura 31b. Respecto al Glu, se observó que permite la formación considerable de puentes (20 – 40) ya que es un buen aceptor de hidrógenos del POPG (Figura 32b), algo que con POPC no sucede. Es por eso que si bien, su interacción no se favorece en membranas de POPG, los puentes de hidrógeno permiten su unión a ella.

Tabla 14. Número promedio de puentes de hidrógeno para La47 y variantes.

#	La47				La4715E				La4715			
	Res	POPC	POPG		Res	POPC	POPG		Res	POPC	POPG	
			Acept.	Donad.			Acept.	Donad.			Acept.	Donad.
1	S	34.0 ± 21.2	59.3 ± 6.8	1.3 ± 1.2	F				F			
2	W	19.3 ± 16.5	40.7 ± 9.3	1.7 ± 1.2	W	13.7 ± 7.6	36.3 ± 9.6	2.3 ± 1.2	W	9.7 ± 6.7	44.0 ± 13.9	1.7 ± 1.2
3	K	46.7 ± 31.8	84.0 ± 17.1		K	12.7 ± 11.0	81.7 ± 10.4		K	11.0 ± 8.0	58.3 ± 20.2	
4	S	12.7 ± 7.6	41.0 ± 11.8	1.7 ± 0.9	K	6.3 ± 4.5	56.0 ± 4.2		M			
6	A				Y	7.7 ± 3.9	34.7 ± 9.5	4.0 ± 2.4	K	7.0 ± 5.0	46.7 ± 4.5	
7	K	19.0 ± 13.6	84.3 ± 29.9		E			35.3 ± 9.3	K	10.7 ± 7.9	24.3 ± 17.3	
8	K	10.0 ± 7.5	39.7 ± 29.1		K	13.3 ± 10.6	42.7 ± 6.7		M			
9	L				L				Y	4.0 ± 0.8	13.3 ± 12.7	1.3 ± 0.5
10	K	3.3 ± 1.7	35.0 ± 15.1		K	11.0 ± 10.8	52.3 ± 0.9		K	12.3 ± 8.1	46.3 ± 5.8	
11	E			43.7 ± 8.7	K	11.3 ± 11.1	59.3 ± 14.8		K	12.0 ± 5.4	52.7 ± 7.6	
12	Y	2.7 ± 1.9	23.0 ± 4.9	2.7 ± 2.4	M				L			
13	M				A				K	11.7 ± 4.8	25.7 ± 16.5	
14	E			16.0 ± 12.7	R	29.0 ± 13.9	135.3 ± 30.3	0.7 ± 0.5	R	20.3 ± 20.5	140.3 ± 32.4	0.7 ± 0.5
15	K	1.3 ± 1.9	47.3 ± 5.6		K	8.7 ± 4.1	67.0 ± 11.6		A			
17	K	2.3 ± 3.3	15.7 ± 20.0									
18	Q	4.3 ± 4.0	36.0 ± 8.3	10.0 ± 0.8								
19	R	8.7 ± 6.2	134.0 ± 12.8	1.0 ± 0.8								



Hidrofóbico
 Cargado +
 Cargado -
 Polares sin carga

El último tipo de interacción analizado fue el tipo catión- π , la cual es considerada como electrostática y se basa en que los carbonos del anillo (sp^2) son más electronegativos que los hidrógenos, generando dipolos locales $C^{\delta-} - H^{\delta+}$ que propician que exista una distribución negativa en el centro del anillo y positiva alrededor de éste [68], Figura 33c. Este fenómeno permite que átomos con carga positiva como el nitrógeno de la colina en POPC interactúen con Phe, Trp y Tyr [69].

Tabla 15. Promedio del porcentaje (en decimales) del tiempo en que los residuos cumplen con el criterio de distancia para interacciones catión- π .

a)							b)								
Css54			Css5415E			Css5414			La47			La4715E		La4715	
#	Res	POPC		POPC		POPC	#	Res	POPC		POPC		POPC		
1	F	0.0 ± 0.0	F	0.2 ± 0.2	F	0.3 ± 0.2	1	---	---	F	0.2 ± 0.2	F	0.0 ± 0.0		
2	F	0.0 ± 0.0	W	0.3 ± 0.2	W	0.4 ± 0.3	2	W	0.1 ± 0.0	W	0.2 ± 0.2	W	0.0 ± 0.0		
9	---	---	---	---	F	0.1 ± 0.1	6	---	---	Y	0.1 ± 0.1	---	---		
10	---	---	F	0.1 ± 0.2	---	---	9	---	---	---	---	Y	0.0 ± 0.0		
11	---	---	---	---	F	0.0 ± 0.0	12	Y	0.0 ± 0.0	---	---	L	---		
12	---	---	F	0.1 ± 0.2	L	---									
17	F	0.0 ± 0.0													
20	F	0.0 ± 0.0													

a) C_{ss}54 y variantes y b) La47 y variantes, ambas con membranas de POPC. De amarillo los residuos hidrofóbicos que participan en este tipo de interacción.

En la Tabla 15, se resumen el porcentaje de tiempo en el cual residuos como Phe, Trp y Tyr estuvieron una distancia menor de 0.4 nm de los nitrógenos de la colina en POPC. En ella se observa que ninguna interacción fue favorable en promedio. Sin embargo, en aquellos sistemas como C_{ss}5415E de la réplica uno que logró interactuar favorablemente con la membrana se observó que esta interacción mejoró (Phe1 0.5 y Trp2 0.5). Algo similar sucede con C_{ss}5414 de la réplica tres (Phe1 0.5 y Trp2 0.9), Figura 33 a y b. En ambos casos se observó que estas interacciones se favorecen en el inicio de la interacción con la bicapa. Tyr es posible que no haya tenido interacciones favorables por su posición en la estructura.

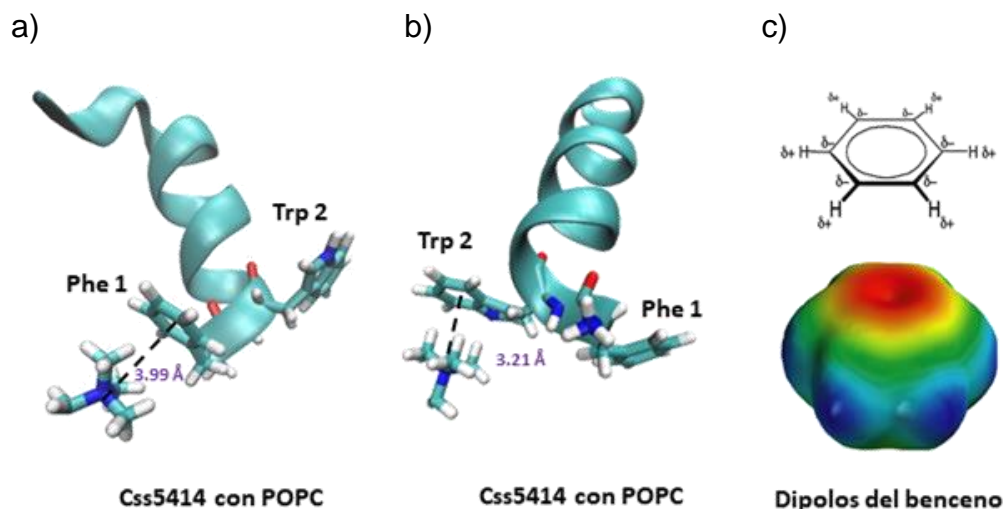


Figura 33. Interacción catión- π para Cys5414 con POPC. Los electrones π de anillos aromáticos de los residuos Phe1 y Trp2 interactúan con la carga positiva de la colina de POPC. En rojo los átomos de oxígeno. En azul de nitrógeno y de blanco los de hidrógeno. a) Interacción de Phe1 con colina, b) interacción de Trp2 con colina y 3) Mapa de potencial electrostático para el benceno en donde se muestra la densidad electrónica (rojo), tomada de Dougherty DA., 2007.

6.3.5 Energías de Unión

En la Tabla 16 se resumen las contribuciones energéticas en KJ/mol de Van der Waals (VdW), electrostáticas, polares y de SASA (*Solvent Access Surface Area*), así como, la suma de todas ellas (Energía de unión). Las contribuciones para la réplica dos y tres se encuentran en el ANEXO V. En general se observa que las energías de unión en los sistemas con POPG se encuentran favorecidas (energías más negativas) respecto a los sistemas con POPC, lo cual se debe a la contribución electrostática de la interacción [61] [70]. Cys54-POPC y La4715-POPC tuvieron valores positivos de energía de unión, en todas las réplicas producto de los valores más positivos de la aportación electrostática.

Aquellos sistemas con energías de VdW más negativas (Cys5415E-POPC en la réplica uno (Figura 34a), Cys5415E-POPC y La4715E-POPC (Figura 34b) en la réplica tres) están relacionados con la interacción de residuos hidrofóbicos en la región no polar de la membrana, lo cual indica que existe una inserción en la membrana. Dado que las interacciones con las membranas de POPG son muy

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fuertes es poco probable que en estos sistemas todos los residuos hidrofóbicos del PAM interactúen con la parte no polar de la membrana (Figura 34c). Es posible tener buenos valores de energías de unión, de los PAMs, y que no se inserten en la región no polar de la membrana manteniéndose sobre la superficie; esto producto de la fuerte interacción electrostática. En sistemas con POPC, algunos PAMs lograron interactuar con las cadenas de ácidos grasos, lo cual en parte se debe a que los residuos hidrofóbicos del PAM encuentran una conformación adecuada con la cual insertarse en la bicapa.

Tabla 16. Contribuciones energéticas de los sistemas para la réplica uno.

PAM	Membrana	VdW (KJ/mol)	Electrostática (KJ/mol)	Polar (KJ/mol)	SASA (KJ/mol)	Energía de unión (KJ/mol)
Css54	POPC	-40.4 ± 65.1	-0.2 ± 240.4	116.7 ± 106.7	-5.7 ± 9.5	70.4 ± 192.4
	POPG	-106.7 ± 50.2	-19409.3 ± 2307.3	977.6 ± 481.5	-18.4 ± 7.9	-18556.9 ± 1982.7
Css5415E	POPC	-155.4 ± 176.4	-754.5 ± 938.8	496.1 ± 508.4	-21.4 ± 23.3	-435.3 ± 635.7
	POPG	-142.9 ± 49.6	-20787.4 ± 2198.4	1052.7 ± 347.7	-22.6 ± 6.7	-19900.2 ± 2004.3
Css5414	POPC	-40.6 ± 49.9	-235.7 ± 541.1	221.9 ± 258.4	-6.6 ± 8.4	-61.0 ± 364.2
	POPG	-140.3 ± 38.7	-28052.8 ± 2469.1	1931.6 ± 494.5	-24.8 ± 5.5	-26286.3 ± 2141.6
La47	POPC	-38.9 ± 34.9	-541.8 ± 785.5	362.4 ± 360.4	-7.5 ± 6.8	-225.8 ± 458.8
	POPG	-128.0 ± 58.4	-26392.5 ± 3375.9	1734.6 ± 693.3	-24.9 ± 9.3	-24810.8 ± 2852.4
La4715E	POPC	-6.4 ± 15.4	127.9 ± 239.7	56.6 ± 108.5	-1.0 ± 3.5	177.1 ± 210.3
	POPG	-95.5 ± 46.8	-31315.2 ± 3847.9	1672.2 ± 653.4	-20.7 ± 7.8	-29759.1 ± 3341.6
La4715	POPC	-20.8 ± 35.8	-155.2 ± 756.6	194.4 ± 337.8	-3.6 ± 6.6	14.8 ± 488.3
	POPG	-139.9 ± 49.6	-36818.8 ± 3223.6	2167.0 ± 632.4	-27.0 ± 7.6	-34818.7 ± 2739.5

Las contribuciones de VdW, electrostáticas y SASA favorecen en todos los sistemas la interacción con POPG, mientras que la parte polar suele ser más negativa en membranas de POPC que en las de POPG. Este fenómeno es causado por la falta de interacción de los PAMs con este tipo de membranas, la contribución polar es mayor cuando el PAM se encuentra en el disolvente, si el péptido interactúa con POPC la diferencia de la contribución polar disminuye respecto a POPG. La contribución no polar obtenida con SASA indica la exposición al disolvente del sistema; entre más negativo sea este valor menos expuesto se encuentra al disolvente y por lo tanto mayor interacción con la membrana. Por tal motivo los valores más negativos se encuentran en los sistemas con POPG.

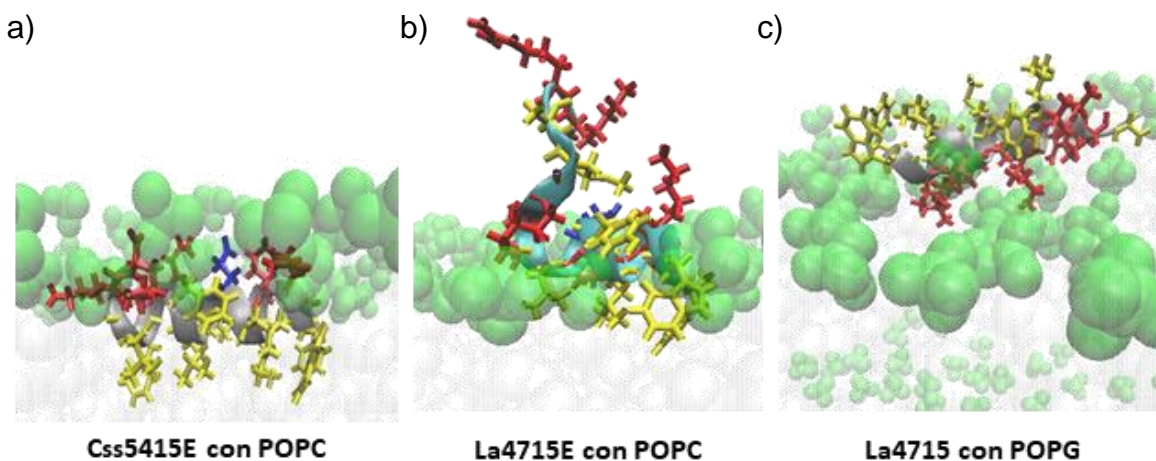
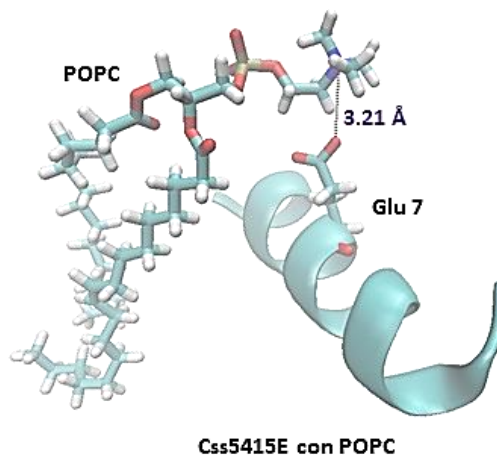


Figura 34. Interacción de algunos PAMs con la membrana. a) C_{ss}5415E con POPC, b) La4715E con POPC y c) La4715 con POPG. En a y b se observa que algunos residuos hidrofóbicos interactúan con la región no polar de la membrana de POPC favoreciendo la contribución de VdW, en c las interacciones electrostáticas son tan fuertes con POPG que evitan que los residuos hidrofóbicos del PAM interactúen con las cadenas de ácido graso. En rojo los residuos con carga (+), de azul con carga (-) y de amarillo hidrofóbicos. De verde los fosfatos de la bicapa y de blanco los ácidos grasos.

En la Tabla 17 se resumen los promedios de las energías de unión (suma de energías de VdW, electrostática, Polar y SASA) por residuo para C_{ss}54 y variantes. Los residuos que presentan un mayor aporte energético son los cercanos al extremo N-terminal, principalmente el primer residuo (debido a que el extremo se encuentra libre, sin ningún tipo de bloqueo) y aquellos con carga positiva. Con C_{ss}54 se observó que los residuos polares sin carga favorecen la interacción en POPG, con C_{ss}5415E se notó que el ácido glutámico perjudica la interacción con membranas

de POPG y no con las de POPC, algo que se debe a la interacción del Glu con la carga positiva del nitrógeno de la colina (Figura 35).

Figura 35. Interacción del ácido glutámico con POPC. Uno de los oxígenos del carboxilo de Glu7 interactúa con la carga positiva de la colina de PC, Fosfatidilcolina. En rojo los átomos de oxígeno, en azul de nitrógeno y de blanco los hidrógenos. De lila la distancia del puente de hidrógeno.



Las energías en Cys5414 son mejores para POPG respecto a las demás variantes lo cual se debe a la ausencia del ácido glutámico. La interacción de los residuos con carga positiva (como Arg y Lys) en membranas de POPC se ve favorecida energéticamente, lo cual es consecuencia de los fosfatos de la membrana (los cuales generan regiones con carga negativa) y de la superficie rugosa de la misma (producto del espacio entre las cabezas polares de los fosfolípidos), fenómeno que se observa en la Figura 36.

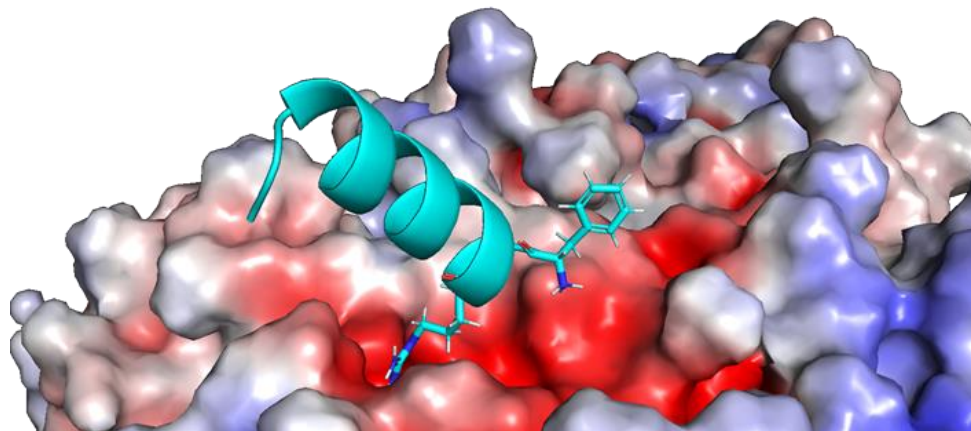



Figura 36. Interacción de la Phe1 y Arg3 de Cys5415E con POPC en la réplica uno. De rojo región rica en densidad de carga negativa y azul de densidad de carga positiva, mapa de potencial electrostático generado con pdb2pqr y Pymol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 17. Energía de unión promedio por residuos, en KJ/mol, para Css54 y variantes.

Css54				Css5415E			Css5414			
#	Res	POPC	POPG		POPC	POPG		POPC	POPG	
1	F	9.0 ± 4.1	-2175.2 ± 131.1	F	-44.8 ± 18.4	-2542.8 ± 56.5	F	-53.3 ± 40.3	-2550.8 ± 51.1	
2	F	-0.4 ± 0.4	-12.3 ± 3.9	W	-13.9 ± 4.4	-26.3 ± 6.0	W	-15.1 ± 12.7	-36.5 ± 0.5	
3	G	-0.9 ± 1.1	-10.8 ± 6.9	R	-45.5 ± 17.9	-2500.5 ± 67.9	R	-67.8 ± 52.1	-2737.0 ± 89.6	
4	S	-2.1 ± 3.1	-10.3 ± 3.0	K	-14.6 ± 13.5	-2538.7 ± 55.5	L	-3.3 ± 1.9	-11.6 ± 0.2	
5	L	-1.3 ± 1.7	-8.6 ± 3.0	L	-3.3 ± 2.2	-18.2 ± 3.7	L	-3.5 ± 2.6	-11.7 ± 1.2	
6	L	-2.2 ± 2.8	-4.7 ± 8.4	L	-3.6 ± 1.2	-19.4 ± 4.4	K	-43.0 ± 53.4	-2622.7 ± 78.2	
7	S	-1.1 ± 1.5	-6.9 ± 6.7	E	6.9 ± 8.7	2405.0 ± 32.6	L	-2.6 ± 1.8	-20.5 ± 2.3	
8	L	-0.2 ± 0.2	-0.3 ± 4.1	L	-2.7 ± 2.8	-21.6 ± 4.0	L	-1.4 ± 1.2	-8.7 ± 1.3	
9	G	0.1 ± 0.2	2.1 ± 6.2	L	-2.4 ± 2.4	-17.4 ± 3.5	F	-3.9 ± 4.4	-19.4 ± 2.1	
10	S	0.1 ± 0.1	1.6 ± 3.9	F	-2.2 ± 1.3	-14.5 ± 6.3	K	-14.1 ± 29.3	-2599.1 ± 81.3	
11	K	13.4 ± 1.5	-2334.2 ± 209.1	K	3.7 ± 12.3	-2288.4 ± 3.4	F	-0.9 ± 1.0	-7.8 ± 8.3	
12	L	-0.1 ± 0.0	6.2 ± 1.6	F	-2.1 ± 3.2	-8.0 ± 7.7	L	-0.7 ± 1.0	-7.4 ± 5.9	
13	L	-0.2 ± 0.3	3.0 ± 4.1	L	-1.2 ± 1.8	-5.9 ± 3.7	K	11.3 ± 5.5	-2269.3 ± 76.1	
14	P	-0.0 ± 0.0	-8.6 ± 3.8	K	3.1 ± 14.6	-2121.5 ± 29.7	K	2.6 ± 2.1	-69.7 ± 77.5	
15	S	0.1 ± 0.0	-0.6 ± 2.4	K	-1.5 ± 6.1	-44.7 ± 37.5				
16	V	-0.1 ± 0.1	3.6 ± 2.0							
17	F	-0.3 ± 0.3	-6.1 ± 3.6							
18	K	14.2 ± 3.0	-2433.2 ± 139.4							
19	L	-0.1 ± 0.1	-5.3 ± 2.3							
20	F	-0.5 ± 0.6	-0.8 ± 3.2							
21	Q	-0.0 ± 0.3	-21.6 ± 5.6							
22	R	14.4 ± 2.4	-2439.8 ± 137.8							
23	K	15.3 ± 1.3	-2241.2 ± 95.7							
24	K	15.7 ± 1.4	-2212.9 ± 164.9							
25	E	-31.8 ± 1.2	4112.6 ± 247.8							

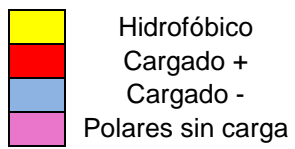

 Hidrofóbico
 Cargado +
 Cargado -
 Polares sin carga

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 18 se resumen los promedios de las energías de unión (suma de energías de VdW, electrostática, Polar y SASA) por residuo para La47 y variantes. La tendencia de los resultados es similar a los datos de la Tabla 15. POPG presentó residuos con mejor contribución energética que los de POPC.

Tabla 18. Energía de unión promedio por residuos, en KJ/mol, para La47 y variantes.

La47				La4715E				La4715			
#	Res	POPC	POPG		POPC	POPG		POPC	POPG		
1	S	-24.5 ± 28.6	-2522.4 ± 124.3	F	-19.9 ± 29.8	-2628.4 ± 42.0	F	5.6 ± 9.6	-2545.4 ± 201.4		
2	W	-7.3 ± 5.2	-12.6 ± 5.4	W	-7.1 ± 6.2	-31.0 ± 14.9	W	-2.2 ± 1.8	-24.3 ± 13.0		
3	K	-29.9 ± 32.5	-2458.4 ± 63.6	K	-0.9 ± 9.7	-2692.1 ± 32.1	K	2.7 ± 15.2	-2676.6 ± 126.2		
4	S	-3.1 ± 2.5	-21.3 ± 4.2	K	-4.2 ± 18.0	-2592.8 ± 63.2	M	-0.4 ± 0.6	-11.6 ± 11.6		
5	M	-2.3 ± 1.5	-12.8 ± 7.7	L	-2.0 ± 2.2	-13.9 ± 8.7	L	-0.3 ± 0.3	-8.0 ± 4.3		
6	A	-1.7 ± 1.2	-12.0 ± 5.0	Y	-1.7 ± 1.6	-25.6 ± 7.1	K	8.1 ± 5.6	-2618.4 ± 158.3		
7	K	-5.2 ± 15.5	-2503.1 ± 12.5	E	1.7 ± 14.7	2560.4 ± 115.7	K	1.3 ± 11.0	-2639.9 ± 143.7		
8	K	7.5 ± 6.1	-2490.3 ± 42.2	K	-11.7 ± 29.0	-2453.6 ± 80.9	M	-0.2 ± 0.3	-8.1 ± 5.6		
9	L	-0.8 ± 0.5	-10.8 ± 6.2	L	-1.7 ± 2.1	-15.5 ± 8.0	Y	-0.1 ± 0.6	-19.6 ± 4.4		
10	K	10.2 ± 4.8	-2263.3 ± 46.4	K	-4.3 ± 24.2	-2515.0 ± 125.8	K	8.9 ± 5.0	-2629.4 ± 106.6		
11	E	-9.2 ± 4.9	2379.5 ± 47.8	K	-4.2 ± 25.2	-2482.5 ± 158.2	K	9.5 ± 5.1	-2484.8 ± 154.6		
12	Y	-0.2 ± 0.1	-18.5 ± 5.4	M	-0.1 ± 0.6	-14.3 ± 4.5	L	-0.0 ± 0.3	-12.8 ± 3.4		
13	M	-0.4 ± 0.2	-16.5 ± 4.7	A	0.4 ± 0.1	-9.6 ± 3.3	K	9.1 ± 6.4	-2329.1 ± 127.3		
14	E	-12.8 ± 2.9	2171.5 ± 82.1	R	7.2 ± 8.2	-2308.8 ± 214.1	R	12.3 ± 3.7	-2505.6 ± 66.2		
15	K	16.1 ± 1.3	-2337.1 ± 56.1	K	-1.4 ± 3.1	-28.7 ± 25.7	A	-12.0 ± 5.3	2246.2 ± 67.9		
16	L	0.0 ± 0.1	-12.5 ± 3.6								
17	L	16.3 ± 0.3	-2043.6 ± 109.1								
18	Q	0.6 ± 0.2	-23.1 ± 1.1								
19	R	17.3 ± 0.3	-2183.6 ± 87.4								
20	A	-14.3 ± 1.3	1943.5 ± 100.4								



Hidrofóbico
 Cargado +
 Cargado -
 Polares sin carga

Los residuos cercanos al extremo N-terminal favorecieron la interacción, los residuos con carga positiva hicieron la diferencia en la aportación de energía con membranas de POPG y los residuos polares sin carga favorecieron la interacción con POPG. La4715 es el PAM que mejor contribución presentó por residuo. Sin embargo, para todos los sistemas con POPC las contribuciones varían.

6.4 Actividad biológica y energías de unión

Para poder relacionar las simulaciones con las actividades biológicas de la Tabla 1 es conveniente recordar que las membranas de POPC representan al lípido mayoritario en eritrocitos, mientras que en las de bacteria es el POPG; sin embargo, se sabe que según la especie de bacteria cambia la composición lipídica [23]. Este trabajo, únicamente, se va a centrar en la relación de actividad antimicrobiana con *Staphylococcus aureus* ya que en membranas de esta bacteria el componente principal es el POPG en otras como *Escherichia coli* la composición favorece a POPE (3:1, donde la menor composición es de POPG [71]). De acuerdo con los resultados de la Tabla 16 y al del ANEXO V (réplica dos y tres), las energías de unión de siete (Css54 con POPC y POPG; Css5415E, Css5414, La47, La4715 y La4715E con POPG) de los doce sistemas fueron consistentes entre todas las réplicas.

En el caso de los sistemas de Css54 no se encuentra una buena correlación entre las energías de unión calculadas y sus actividades (Figura 37). Por ejemplo, la estimación basada en la simulación indica que Css54 tiene una energía de unión con POPC más desfavorable que Css5414, lo que haría que tuviera menor actividad, sin embargo, éste péptido presenta 100% de hemólisis. A pesar de que Css54 con POPG tiene valores negativos de energía, no representa al valor más favorecido energéticamente respecto a las demás variantes (el más negativo). Sin embargo, es el PAM que requiere una menor CMI, lo que supondría una mejor energía en la interacción. Este problema pudo ser consecuencia de la inadecuada orientación del PAM respecto a la membrana, generada por el cambio de estructura

secundaria de la Gly9 de este péptido, lo cual no permitió la interacción de otros residuos de importancia en el tiempo de simulación analizado, algo que podría solucionarse con dinámicas más largas o más réplicas. Algunos autores han identificado que la flexibilidad de algunos PAMs (ocasionada por Gly y Pro) está relacionada con la mejora en la actividad antimicrobiana de estos péptidos; fenómeno que relacionan con el aumento en la resistencia de auto asociarse [72] [73]. Sin embargo, el aumento en la actividad antimicrobiana viene en muchos de los casos asociado con el aumento en la actividad hemolítica.

Css5415E con POPC en la réplica uno (Tabla 16) tuvo un valor de energía menor que Ccss5414 de la misma réplica (Figura 37), lo que coincide con los valores experimentales ya que el porcentaje de hemólisis del primero es del 100% mientras que del segundo es de 70%. En las réplicas dos y tres no se presentó el mismo comportamiento y la energía tuvo valores más negativos para Ccss5414, lo que sucedió debido a que Ccss5415E de la primera réplica logró penetrar la membrana. Ccss5415E con POPG tuvo valores que justifican que la CMI sea mayor (25 μM) que Ccss5414 con la misma membrana (12.5 μM) ya que los valores de energía de unión de Ccss5414 en las tres réplicas fueron menores.

La actividad de La47 con POPC no puede justificarse ya que, experimentalmente, no se detectó actividad y las energías del PAM fueron negativas con este tipo de membrana (Figura 37). La47 con POPG presentó los valores menos negativos de energía de unión, lo que coincide con su baja actividad antimicrobiana. Para La4715E y La4715 con POPC, las actividades sólo se relacionaron con la primera réplica; La4715E con POPC presentó un porcentaje de hemólisis del 15% y una energía de unión de 177.073 KJ/mol, mientras que con La4715 fue del 25% y la energía de 14.777 KJ/mol, ambas justificadas, a mayor porcentaje de hemólisis mejor interacción y por lo tanto energías más negativas y viceversa. Finalmente, La47 y variantes con POPG, fueron consistentes con las actividades antimicrobianas contra *S. aureus* en las tres réplicas. En general las diferencias

entre cada uno de estos PAMs fueron de 5000 KJ/mol, siendo La4715 el más negativo y por lo tanto el que requiere una menor CMI (12.5 μ M).

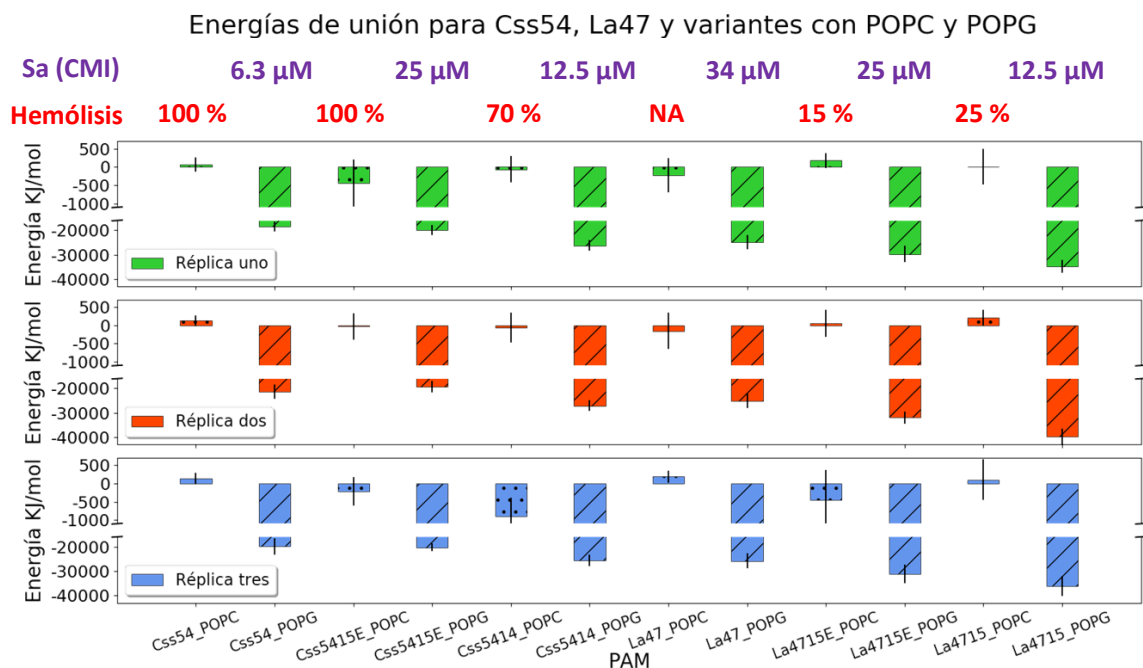


Figura 37. Energías de unión totales para C_{ss}54, La47 y variantes. En la imagen se muestran los datos con sus respectivas barras para cada réplica. En puntos las barras para aquellos PAMs que interactúan con POPC y con líneas diagonales para los que interactúan con POPG. En la parte superior se muestran las actividades, en morados las antimicrobianas contra Sa y en rojo el porcentaje de hemólisis.

Para C_{ss}54 y variantes, es importante notar que la presencia del ácido glutámico en la secuencia del PAM perjudica su actividad antimicrobiana [74]; en el caso de C_{ss}54 al tenerlo en el extremo -C terminal y junto con dos lisinas este fenómeno no afecta la actividad. Lo mismo sucede con La47 y sus variantes. Este hecho se justifica ya que el ácido glutámico presenta energías de unión positivas respecto a la bicapa de POPG (Tablas 17 y 18). La actividad hemolítica varía, experimentalmente, según el sistema, para C_{ss}5415E y C_{ss}5414, la presencia del Glu favorece la hemólisis (sólo visto en la réplica uno) y entre La4715E y La4715, el Glu disminuye la actividad hemolítica. Este fenómeno es difícil de explicar con las energías de unión, por lo cual consideramos que depende de otros factores como su interacción con otros PAMs [21] [75], el cambio de su estructura secundaria durante la simulación y la falta de heterogeneidad (falta de otros componentes en la

bicapa) en los modelos de bicapa. Además, debido a las diferentes conformaciones, disposiciones y al tiempo de simulación del péptido interactuando con la membrana es posible que se estén omitiendo modos de interacción mejores a los encontrados en este estudio. Una diferencia entre las variantes de C55 y La47 es su contenido de residuos hidrofóbicos el cual es mayor en las primeras (Tabla 1), esto podría estar relacionado con el alto porcentaje de hemólisis de C55 y sus variantes; algo similar a lo reportado por Hollmann A., et al. en 2016, quienes demostraron que aumentando la hidrofobicidad incrementas la hemólisis [76] [77].

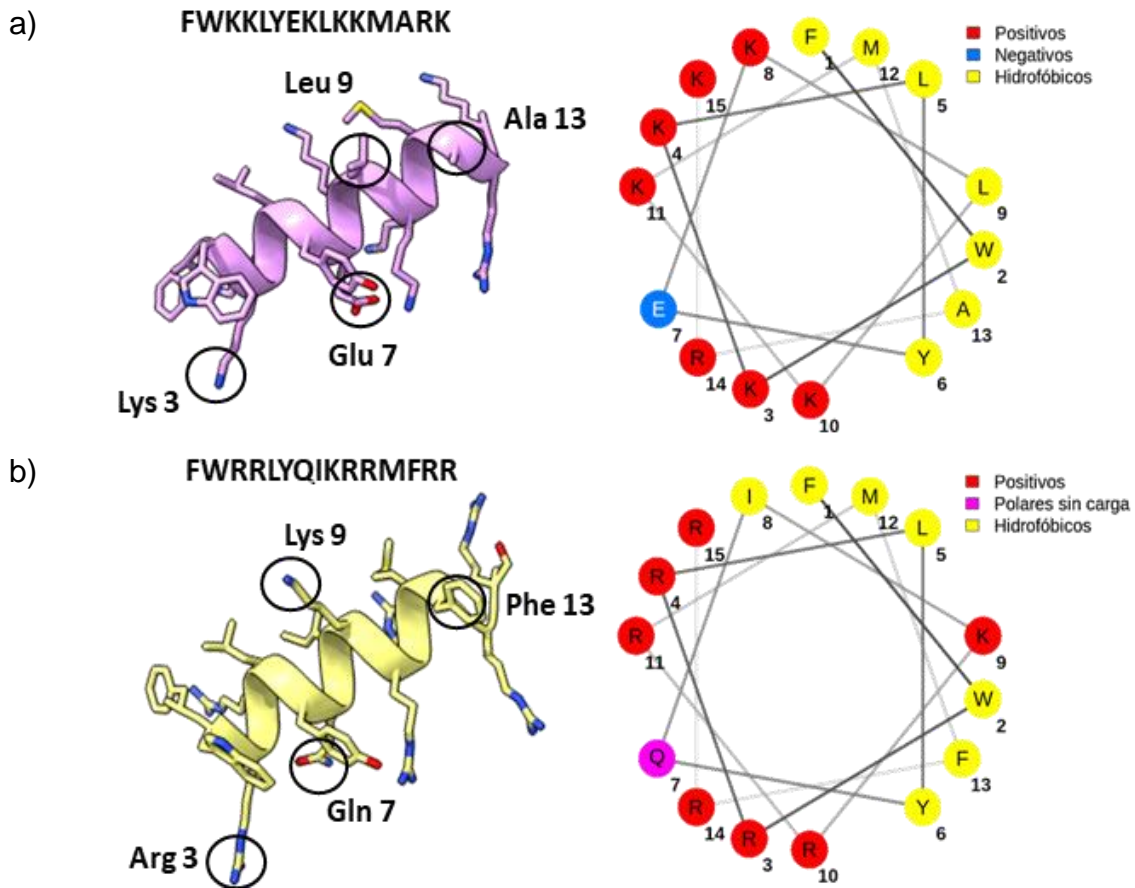


Figura 38. Modificaciones generales a los PAMs. a) La4715E (izquierda) y su proyección de rueda (derecha). b) La4715E modificado (izquierda) y su proyección de rueda (derecha). Cambio de Lys3 por Arg3, eliminación de residuos con carga negativa (Glu7 a Gln7), adición de residuo con carga positiva en la región no polar (Leu9 a Lys9) y cambio de Ala13 por Phe13 para incrementar las interacciones hidrofóbicas. Estructura obtenida con PEP-FOLD3 [78] y proyección de rueda a través de <http://lbqp.unb.br/NetWheels/> [79]; imágenes generadas con ChimeraX 0.91 [80].

Entre las modificaciones que se proponen, se encuentra realizar cambios en los residuos cercanos al N-terminal para asegurar la interacción, uno de ellos es modificar el primer residuo (Phe) por uno que favorezca la atracción electrostática con la membrana (como la Arg). Mantener el Trp en la segunda posición ya que es necesario para asegurar la interacción con la región no polar [81] y cambiar la Lys por Arg (Figura 38), debido a que puede formar una mayor cantidad de puentes de hidrógeno [82] [83]. Para evitar perder estructura secundaria, se puede bloquear el extremo C-terminal, amidándolo, ya que de acuerdo con la literatura esto mejoraría la estabilidad helicoidal de los PAMs [84]. Algunos residuos hidrofóbicos como Ala pueden ser sustituidos por Iso, Leu o Phe para promover el contacto con la membrana, ya que son aminoácidos más largos (Figura 38).

Ya sea para mejorar la actividad antimicrobiana y disminuir la hemólisis, es necesario evitar tener residuos con carga negativa (Figura 38). Como se comentó en el párrafo anterior si se desea disminuir la actividad hemolítica es recomendable disminuir el contenido de residuos hidrofóbicos, cuidando el no afectar la actividad antimicrobiana. Otra recomendación, se basa en evitar la auto-asociación entre PAMs, se ha visto que si esto sucede afecta la actividad antimicrobiana pero en ocasiones no a la hemolítica [77]. Este fenómeno está relacionado con la hidrofobicidad y se recomienda colocar algún residuo con carga positiva en la cara no polar del PAM (Figura 38) [74] [85] o bien colocar residuos con carga positiva en ambos extremos [86].

7. CONCLUSIONES

- Se generaron modelos de los PAM de buena calidad estructural, así como de membranas puras con parámetros similares a los experimentales.
- De acuerdo con las simulaciones, las membranas de POPG favorecen la interacción de los PAMs en comparación con las de POPC. Sin embargo, algunos sistemas logran su interacción con la región no polar de POPC, lo cual no sucede en POPG.
- El Glu se encuentra relacionado con la poca actividad antimicrobiana, de C₅₅5415E, La47 y La4715E, contra *Staphylococcus aureus*.
- Los residuos cercanos al extremo N-terminal juegan un rol primordial en la interacción de C₅₅54/variantes y La47/variantes con los lípidos de las membranas tanto POPC como POPG.
- Los residuos con carga positiva y los hidrofóbicos son importantes para lograr interacciones estables con las membranas.

8. PERSPECTIVAS

- Generar sistemas con mezcla de lípidos que se asemejan a la composición de las membranas por especie de bacteria y para el eritrocito.
- Correlacionar los parámetros obtenidos por DM mediante relaciones estructura actividad (Modelos farmacofóricos o QSAR).
- Utilizar una mayor cantidad de PAMs para ver el efecto de aglomeración y formación de poro.
- Utilizar conformaciones distintas, seleccionadas mediante un análisis de muestreo, y simular por mayor tiempo.

ANEXO I (Parámetros evaluados)

Temperatura

Para mantener estable la temperatura se utilizó el termostato Nosé-Hoover. Este termostato introduce un término para el depósito térmico y para la fricción (relacionado con la velocidad de cada partícula y con el baño térmico) a las ecuaciones de movimiento:

$$\frac{d^2 r_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i} - \frac{p_\xi}{Q} \frac{dr_i}{dt} \qquad \frac{dp_\xi}{dt} = (T - T_0)$$

donde r indica posiciones, t el tiempo, F la fuerza y m la masa de los átomos. El término de fricción (ξ) presenta su propio momento (p_ξ) y depende de la diferencia entre la temperatura del sistema (T) y la de referencia (T_0). La fuerza de acoplamiento está determinada por una constante (llamada parámetro de masa del depósito (Q) y depende de la temperatura de referencia) [87].

Presión

Para mantener la presión estable se utilizó el barostato de Parrinello-Rahman. Este barostato escala las coordenadas y los vectores de la caja de simulación en cada paso de la simulación [87]:

$$\frac{db^2}{dt^2} = VW^{-1}b^{\tau-1}(P - P_{ref})$$

donde b es la matriz de los vectores de la caja, V el volumen de la caja, W la fuerza de acoplamiento, τ una constante de tiempo para el acoplamiento y P la presión del sistema y P_{ref} la de referencia. Al igual que en el termostato las ecuaciones de movimiento se modifican:

$$\frac{d^2r_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i} - M \frac{dr_i}{dt}$$

M es una modificación de la matriz de los vectores de la caja (b).

Área por lípido (APL)

Para calcular el APL se utilizó el comando *lipidarea* del *plugin Membrane Analysis Tool* compatible con VMD 1.9.1, se analizaron los últimos 50 ns con intervalos de 100 ps. El programa considera las coordenadas en x y y donde se encuentra los fósforos de los lípidos y los proyecta en un plano de acuerdo con las dimensiones de la caja de simulación, posteriormente el plano es dividido en polígonos de generando diagramas de Voronoi. El APL en cada polígono es calculado [51].

Grosor de la membrana

Para calcular el grosor de la membrana se utilizó el comando *gmx distance* para conocer la distancia entre los centros de masa de los átomos de fósforo (P) de las capas inferior y superior de los fosfolípidos [87].

Orden de -S_{CH}

Para conocer el comportamiento de las cadenas de ácido graso se utilizó el comando *gmx order*, en cual se especificó la enumeración de los átomos de carbono de cada cadena. El parámetro de orden se calcula de acuerdo con:

$$S_{CH} = \frac{3}{2} \langle \cos^2 \theta_z \rangle - \frac{1}{2}$$

donde θ_z es el ángulo entre el eje z (eje normal a la membrana) de la caja de simulación y un eje de referencia. El cual es definido como el vector de C_{n-1} a C_{n+1} , C_n representa a cada uno de los átomos de carbono especificados. Los *brackets*

indican promedio en el tiempo. El orden varía entre 1 (ordenado a lo largo de la normal) y $-\frac{1}{2}$ (ordenado, perpendicular a la normal) [87].

Densidad de membrana

Con *gmx density* se identificaron las diferentes regiones de la membrana (del disolvente, de las cadenas de ácido graso y de las cabezas polares de fosfolípidos). El programa calcula la densidad de masa por grupos y la gráfica respecto al eje z. Para ello, el eje z es dividido en rebanadas, cada rebanada contiene una masa relacionada con la región, la cual es promediada según el tiempo de simulación. El promedio es dividido en el volumen de la rebanada promediada [87] [58].

Estructura secundaria

Por medio de *VMD Timeline* se identificó el tipo de estructura secundaria de cada residuo. El programa utiliza *STRIDE*, el cual se basa en información verificada de estructuras secundarias obtenidas por cristalografía y depositas en el PDB. Considera los patrones de puentes de hidrógeno y la geometría de la cadena principal (ángulos ψ y ϕ). La energía de los puentes de hidrógeno depende de la distancia entre donador y aceptor y de su ángulo [62] [88] .

Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD, *Root Mean Square Deviation*)

Se utilizaron dos programas distintos:

ProFIT

Para el cálculo del RMSD de los átomos pesados (N, C, O y C α) entre dos estructuras proteicas (modelos y plantillas), el programa superpone dos conjuntos de coordenadas mediante el ajuste de cuadrados mínimos (de las rotaciones y translaciones de los átomos seleccionados) [36].

Gromacs

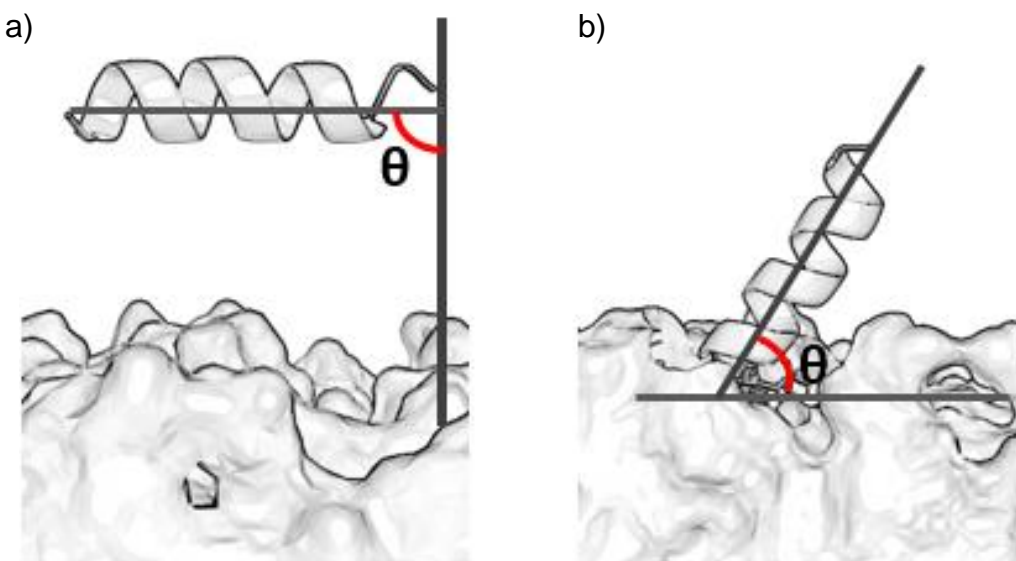
gmx rms para determinar la fluctuación de los átomos pesados (N, C y C α , de la cadena principal) a lo largo de la trayectoria, ocupando como referencia la estructura inicial. Para ello el programa utiliza la siguiente ecuación:

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

donde $M = \sum_{i=1}^N m_i$ y $r_i(t)$ es la posición de un átomo i en el tiempo t , t_2 es la estructura de referencia en el tiempo 0. m_i indica que hay ponderación de las masas [87].

Ángulo de inclinación

gmx bundle se ocupó para calcular el ángulo de inclinación respecto al eje z (a), considerando el vector formado entre los centros de masa de los átomos -C y -N terminal [58]. Para conocer el ángulo con la membrana (b) se calculó la diferencia respecto a un ángulo de 90°.



- a) ángulo respecto al eje z para cada uno de los sistemas, este dato nos indica que tanto puede moverse el PAM durante toda la simulación.
- b) ángulo entre el PAM y la membrana, nos permite saber la inclinación de cada PAM respecto a la membrana.

Comportamiento del Centro de Masa

Con *gmx traj* se conoció la evolución temporal de los centros de masa (COM, *center of mass*) del PAM, de las cadenas laterales y de los fósforos de cada una de las capas de la membrana, todos sobre el eje z. El COM se calcula por medio de la siguiente ecuación [87]:

$$COM = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i x_i$$

donde $M = \sum_{i=1}^N m_i$, m es la masa y x la posición de los átomos seleccionados para este cálculo.

Interacciones

Con el cálculo del COM de las cadenas laterales y de los fósforos se calculó mediante un programa de Python la distancia entre cada residuo con la membrana. El radio de corte fue de 0.5nm y el tipo de interacción se clasificó según la distancia:

Electrostática

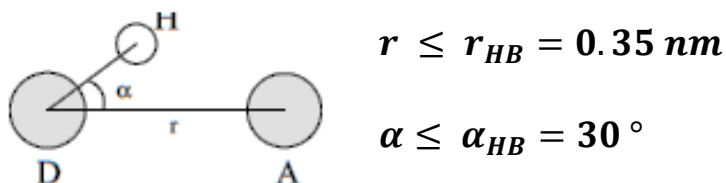
Consideramos como puente salino si residuos con carga se encontraban a una distancia menor de 0.4 nm de la membrana [53].

Hidrofóbicas

Se consideraron interacciones hidrofóbicas a aquello residuo hidrofóbicos que se encontraban a una distancia menor a 0.4 nm de la membrana [53].

Puentes de hidrógeno

Utilizando *gmx hbond* se calculó la cantidad de puentes de hidrógeno entre el PAM y la membrana, el programa analiza todos los posibles donadores (D) y aceptores (A). Para determinar si existe un puente de hidrógeno, se utiliza el siguiente criterio geométrico:



donde r , indica la distancia entre el donador y aceptor y α el ángulo [87].

Catión- π

Consideramos interacción catión- π si átomos con carga positiva de la membrana (el nitrógeno de la colina en POPC) se encontraban a una distancia menor de 0.4 nm [53] de residuos con aromáticos con electrones π (Phe, Trp y Tyr).

Energía de unión

Para conocer las energías de unión de los sistemas simulados se usó *g_mmpbsa* una paquetería que permite utilizar las trayectorias generadas por Gromacs y calcular diferentes contribuciones energéticas (fuerzas de Van der Waals, electrostáticas y energía de solvatación polar y apolar) [52], el cálculo se realizó a lo largo de los 200 ns cada 400 ps considerando las siguientes ecuaciones:

$$G_x = \langle E_{MM} \rangle - TS + \langle G_{solvatación} \rangle$$

donde G es la energía libre, E la energía potencial por mecánica molecular al vacío, TS es la entropía y la temperatura y $G_{solvatación}$ la energía libre de solvatación.

$$E_{MM} = E_{enlazante} + E_{no\ enlazante} = E_{enlazante} + (E_{vdW} + E_{electrostática})$$

La energía enlazante considera enlaces, ángulos, diedros y diedros impropios. La energía no enlazante calcula VdW mediante la función de Lennard-Jones y la electrostática se calcula con la función del potencial de Coulomb.

$$G_{solvatación} = G_{polar} + G_{no\ polar}$$

donde G_{polar} y $G_{no\ polar}$ son las contribuciones electrostáticas y no electrostáticas a la energía libre de solvatación, respectivamente.

La energía de solvatación polar G_{polar} es estimada resolviendo la ecuación de Poisson-Boltzmann (PB), la cual considera el potencial electrostático, la constante dieléctrica, la densidad de carga y la fuerza iónica de la solución. El programa genera una caja considerando 1.5 veces la longitud a partir de los extremos del complejo en cada dimensión. Posteriormente, lo suple por una caja de grano fino extendiéndola 5Å.

La energía de solvatación no polar $G_{no\ polar}$ es el termino no electrostático, incluye la fuerza repulsiva y atractiva entre el soluto y el disolvente, generadas por la formación de cavidad en el disolvente por el soluto y por las interacciones de van der Waals entre solvente y soluto.

$$G_{no\ polar} = G_{cavidad} + G_{vdW}$$

Estos términos pueden ser calculados utilizando el modelo no polar de SASA (*Solvent Accessible Surface Area*):

$$G_{no\ polar} = \gamma A + b$$

Donde γ es un coeficiente relacionada a la tensión superficial del disolvente, A es SASA y b un parámetro de ajuste.

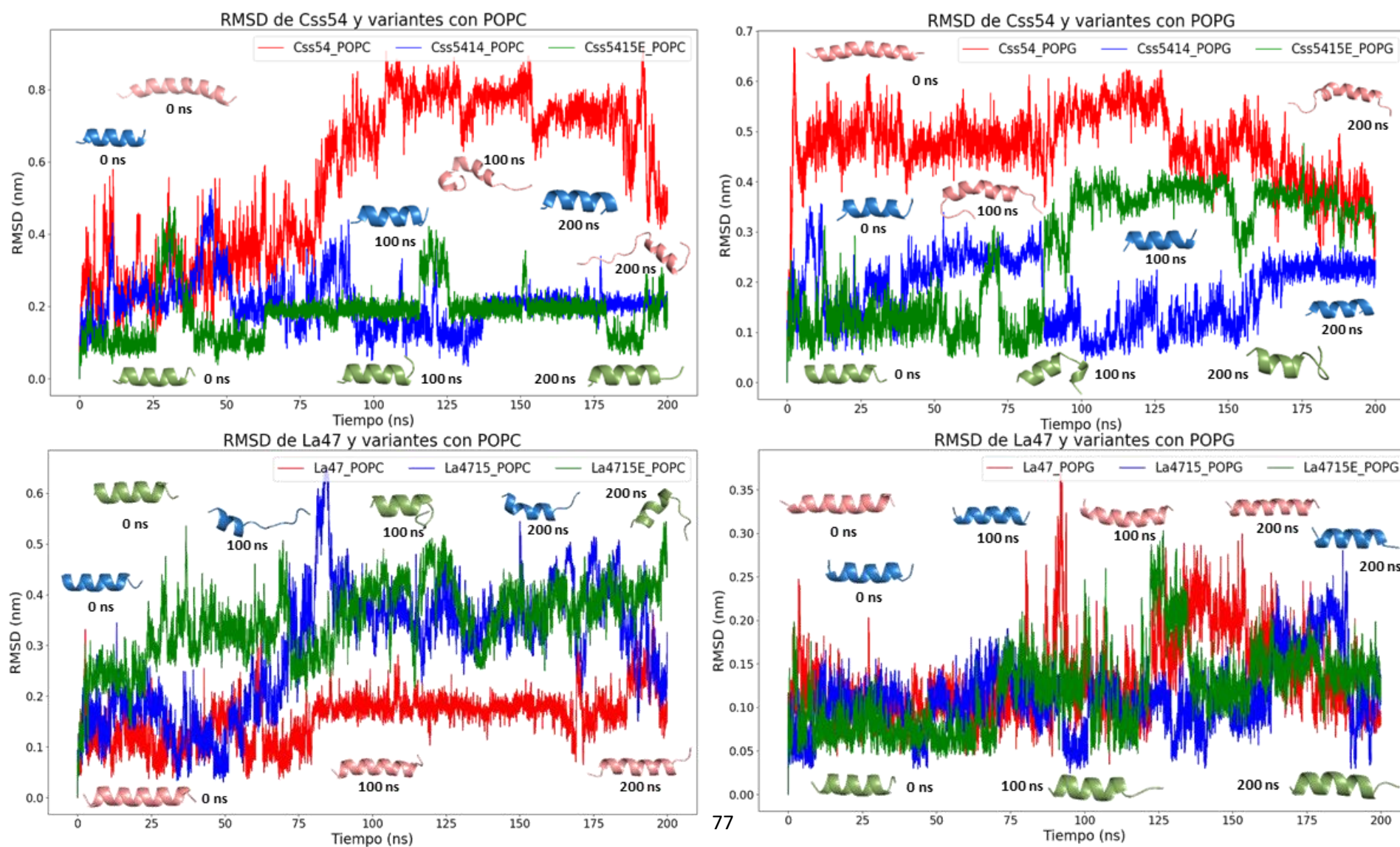
ANEXO II (Parámetros de calidad de I-Tasser)

Parámetro	Valores	Definición
C-score	[-5, 2], entre mayor sea es más confiable el modelo.	Estima la calidad del modelo predicho. Es calculado basado en los alineamiento con las plantillas [38].
TM-score	[0, 1], TM > 0.5 indica una topología correcta. TM < 0.17 similitud aleatoria.	Mide la similitud estructural entre el mejor modelo y las plantillas, de manera local. Ponderando con mayor peso distancias cortas que grandes [38].
RMSD	[0, 1]	Mide la similitud estructural entre el mejor modelo y las plantillas, de manera general [38].

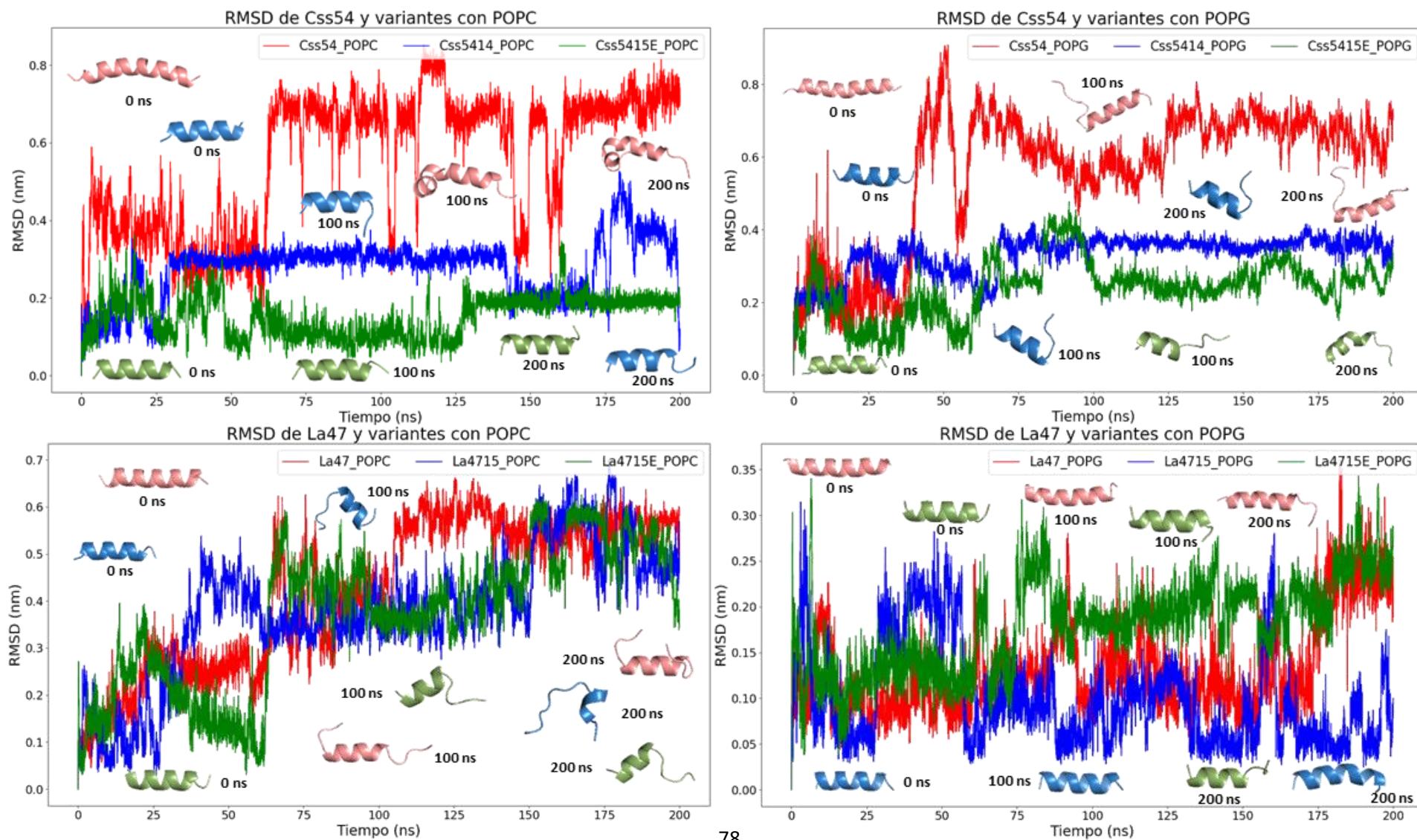
ANEXO II (Parámetros de calidad de Molprobit)

Parámetro	Descripción	Valor ideal
<i>Clashscore</i>	Átomos no aceptores ni donadores de H que se sobrelapan por más de 0.4 Å. Valor dado por cada 1000 átomos [42].	0
<i>Poor rotamers</i>	Rotámero dentro del 0.3% de la distribución de la biblioteca de rotámeros [89].	< 0.3 %
<i>Ramachandran outliers</i>	Valores fuera del 95 % de la distribución normal de los ángulos ϕ y ψ de la cadena principal [42].	< 0.05 %
<i>Molprobit score</i>	Proporciona la resolución cristalográfica esperada, según los tres parámetros anteriores [42].	Entre más bajo mejor
<i>Cβ deviation</i>	Valores > 0.25 Å se relacionan con un desajuste local [42].	0
<i>Bad bonds</i>	<i>Outliers</i> $\geq 4 \sigma$ según bases de datos estructural de proteínas y ácidos nucleicos [42].	0
<i>Bad angles</i>	<i>Outliers</i> $\geq 4 \sigma$ según bases de datos estructural de proteínas y ácidos nucleicos [42].	< 0.1 %
<i>Cis prolines</i>	La configuración <i>cis</i> en prolina es común (5 %). 0.03 % de residuos no-Pro son <i>cis</i> [90].	< 5 %

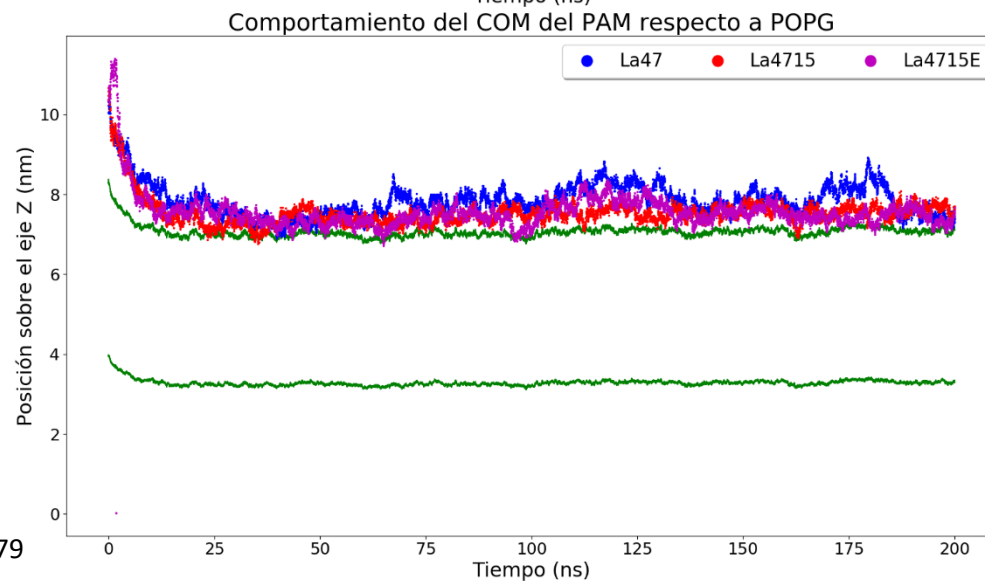
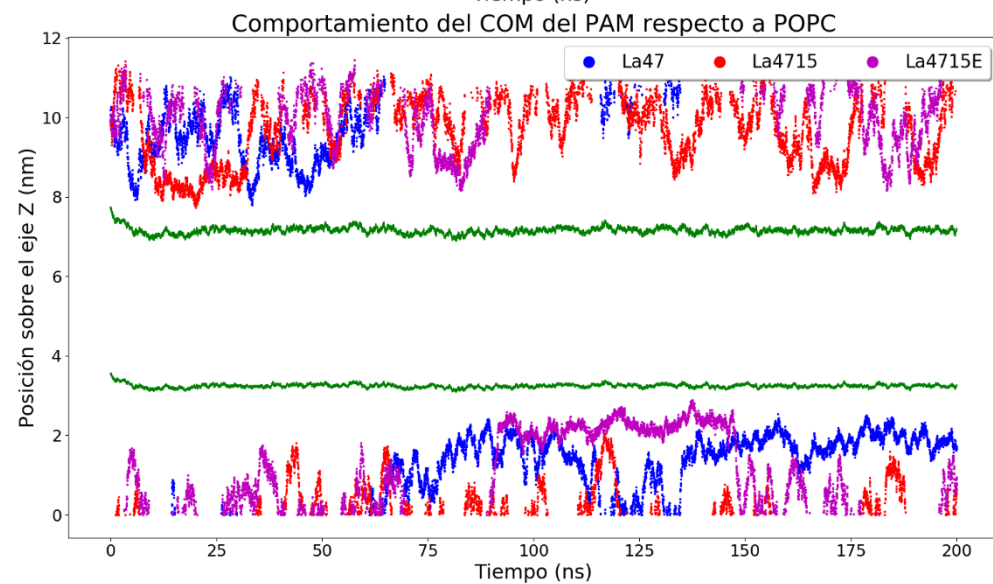
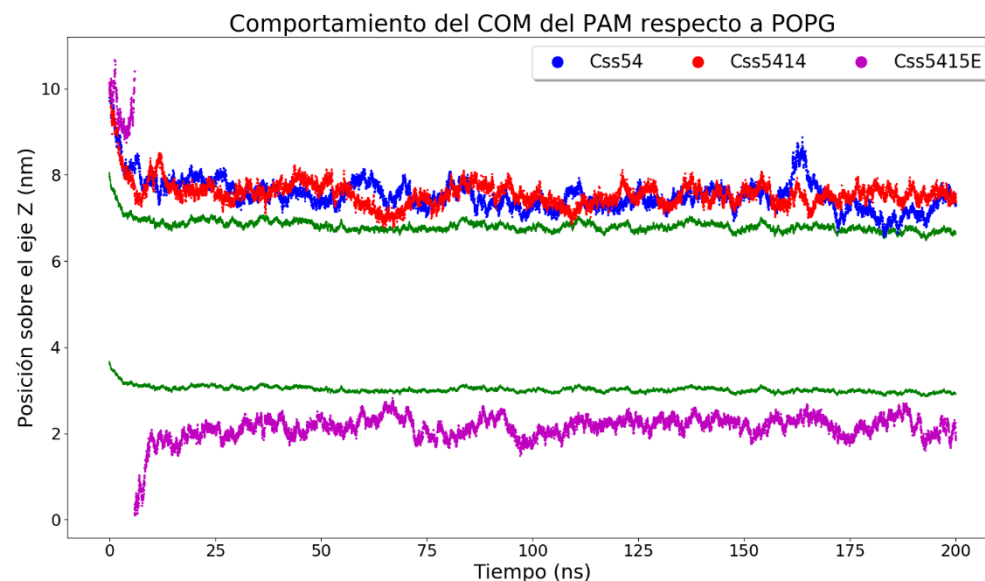
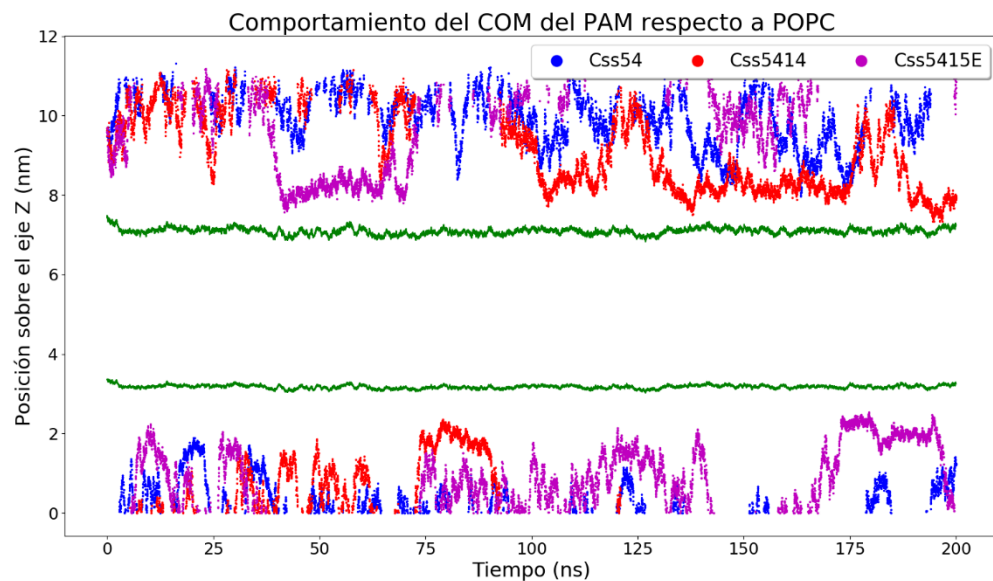
ANEXO III (Segunda réplica)



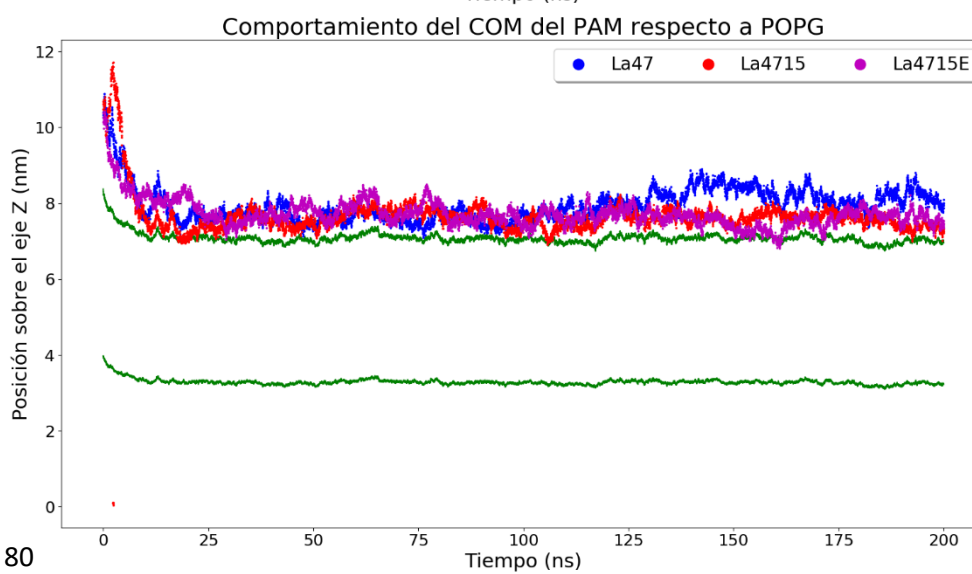
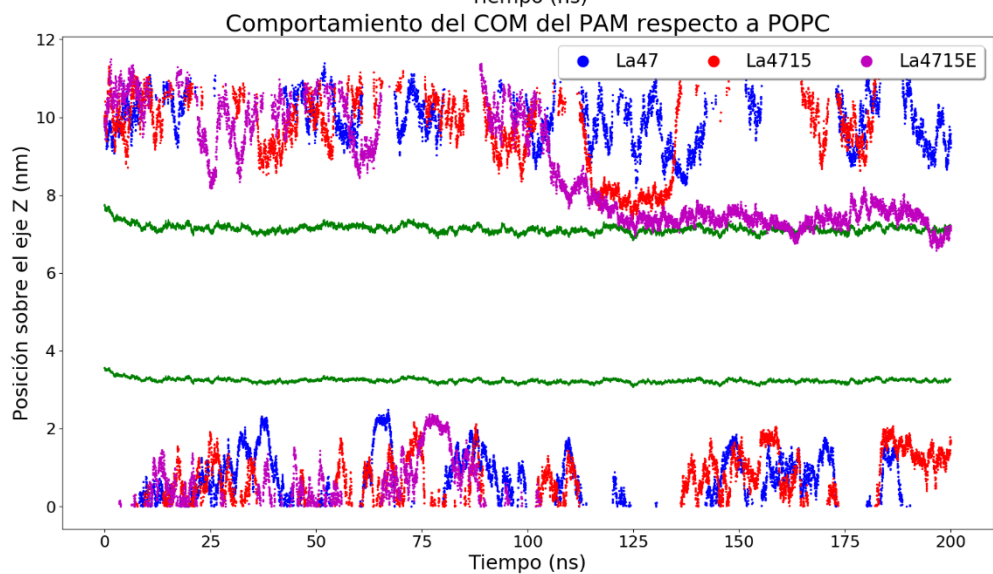
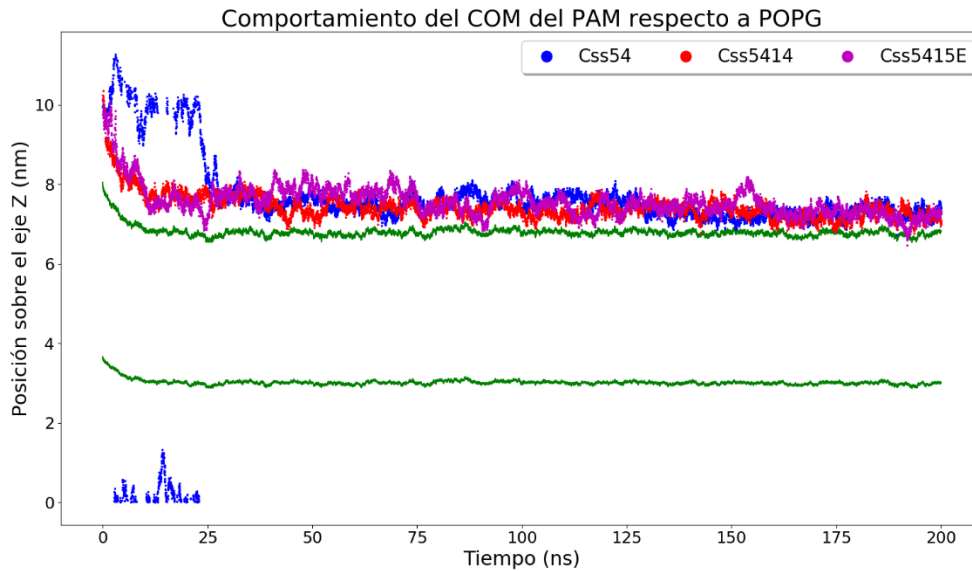
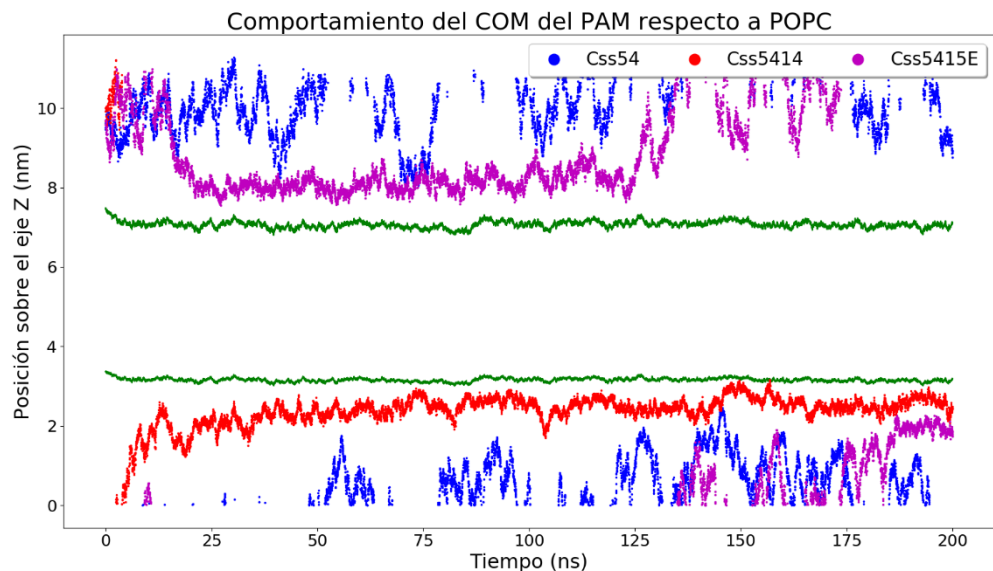
ANEXO III (Tercera réplica)



ANEXO IV (Segunda réplica)



ANEXO IV (Tercera réplica)



ANEXO V (Segunda réplica)

PAM	Membrana	VdW (KJ/mol)	Electrostática (KJ/mol)	Polar (KJ/mol)	SASA (KJ/mol)	Energía de unión (KJ/mol)
C _{ss} 54	POPC	-7.4 ± 18.3	71.2 ± 181.5	63.2 ± 123.5	-1.2 ± 3.8	125.9 ± 143.9
	POPG	-169.2 ± 79.1	-22552.9 ± 3203.8	1452.8 ± 536.8	-29.9 ± 11.4	-21299.2 ± 2873.1
C _{ss} 5415E	POPC	-26.0 ± 39.4	-188.3 ± 583.4	185.5 ± 288.5	-4.2 ± 7.0	-33.1 ± 360.8
	POPG	-87.8 ± 40.9	-20169.2 ± 2753.9	1063.7 ± 509.0	-16.9 ± 6.7	-19210.3 ± 2384.8
C _{ss} 5414	POPC	-33.2 ± 41.3	-243.3 ± 609.0	214.9 ± 276.6	-5.2 ± 6.8	-66.9 ± 406.0
	POPG	-142.8 ± 44.9	-28712.7 ± 2473.4	1811.1 ± 497.4	-25.6 ± 6.3	-27070.0 ± 2156.6
La47	POPC	-33.4 ± 36.3	-395.2 ± 774.8	282.0 ± 345.9	-6.2 ± 7.4	-152.8 ± 495.1
	POPG	-112.3 ± 56.4	-26355.9 ± 3442.0	1463.4 ± 599.1	-22.1 ± 8.9	-25026.8 ± 2981.1
La4715E	POPC	-18.9 ± 29.0	-80.8 ± 558.6	152.7 ± 263.2	-3.6 ± 6.2	49.3 ± 363.4
	POPG	-156.9 ± 48.1	-34089.3 ± 3005.8	2317.8 ± 686.7	-31.5 ± 8.7	-31960.0 ± 2502.9
La4715	POPC	-9.2 ± 20.5	149.2 ± 257.2	72.9 ± 136.5	-1.6 ± 4.5	211.4 ± 210.9
	POPG	-185.5 ± 59.3	-42630.5 ± 3826.4	3180.5 ± 885.0	-34.8 ± 8.4	-39670.3 ± 3095.7

En color salmón energías que no se correlacionan con los datos experimentales. En verde, aquellos que sí coinciden y en naranja aquellos que presentan una tendencia. Únicamente tomando en cuenta los promedios.

ANEXO V (Tercera réplica)

PAM	Membrana	VdW (KJ/mol)	Electrostática (KJ/mol)	Polar (KJ/mol)	SASA (KJ/mol)	Energía de unión (KJ/mol)
C _{ss} 54	POPC	-5.9 ± 13.4	92.8 ± 167.6	49.7 ± 106.8	-0.8 ± 3.5	135.7 ± 154.9
	POPG	-161.4 ± 92.5	-21025.9 ± 3881.3	1267.0 ± 727.1	-28.3 ± 14.5	-19948.7 ± 3316.1
C _{ss} 5415E	POPC	-48.5 ± 42.7	-493.9 ± 633.5	334.3 ± 309.4	-8.1 ± 7.5	-216.1 ± 395.4
	POPG	-135.4 ± 57.2	-21352.9 ± 1890.1	1257.0 ± 457.2	-22.8 ± 8.2	-20254.1 ± 1593.6
C _{ss} 5414	POPC	-124.5 ± 55.1	-1562.3 ± 800.2	818.3 ± 383.2	-19.7 ± 8.3	-888.2 ± 496.5
	POPG	-137.5 ± 52.3	-27024.8 ± 2796.7	1643.6 ± 620.9	-24.7 ± 8.2	-25543.3 ± 2320.0
La47	POPC	-6.4 ± 17.3	141.8 ± 158.5	49.8 ± 86.2	-0.9 ± 3.6	184.4 ± 164.7
	POPG	-108.6 ± 48.3	-27226.1 ± 3407.0	1511.4 ± 566.5	-21.4 ± 8.1	-25844.6 ± 3007.3
La4715E	POPC	-117.6 ± 133.9	-810.3 ± 1193.7	497.9 ± 542.3	-16.4 ± 18.5	-446.4 ± 821.7
	POPG	-137.7 ± 59.6	-32889.6 ± 4395.7	1928.1 ± 843.0	-25.5 ± 10.1	-31124.7 ± 3714.3
La4715	POPC	-14.5 ± 30.1	-18.3 ± 799.4	134.9 ± 304.5	-2.7 ± 6.6	99.3 ± 555.9
	POPG	-157.4 ± 58.2	-38760.4 ± 4888.1	2726.3 ± 940.7	-30.0 ± 9.2	-36221.5 ± 4068.2

En color salmón energías que no se correlacionan con los datos experimentales. En verde, aquellos que sí coinciden y en naranja aquellos que presentan una tendencia. Únicamente tomando en cuenta los promedios.

6. REFERENCIAS

1. Tacconelli E. (Infectious Diseases, D.C., Tübingen University, Germany) and Magrini N. (WHO, EMP Department), *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>, February 2017(Consultado 16 de octubre de 2017).
2. Zhang, L.-j. and R.L. Gallo, *Antimicrobial peptides*. *Current Biology*, 2016. 26(1): p. R14-R19.
3. Andersson, D.I., D. Hughes, and J.Z. Kubicek-Sutherland, *Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides*. *Drug Resist Updat*, 2016. 26: p. 43-57.
4. Koo, H.B. and J. Seo, *Antimicrobial peptides under clinical investigation*. *Peptide Science*, 2019. 111(5): p. e24122.
5. Kim, H., et al., *De novo generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013. 69(1): p. 121-132.
6. Mahlapuu, M., et al., *Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2016. 6: p. 194-194.
7. Arenas, I., et al., *Antimicrobial Activity and Stability of Short and Long Based Arachnid Synthetic Peptides in the Presence of Commercial Antibiotics*. *Molecules*, 2016. 21(2).
8. Ramesh, S., et al., *Short AntiMicrobial Peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents*. *J Pept Sci*, 2016. 22(7): p. 438-51.
9. Wimley, W.C., *Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model*. *ACS chemical biology*, 2010. 5(10): p. 905-917.
10. Velasco-Bolom, J.L., G. Corzo, and R. Garduno-Juarez, *Molecular dynamics simulation of the membrane binding and disruption mechanisms by antimicrobial scorpion venom-derived peptides*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2017: p. 1-15.
11. Media Center, W.H.O., *Fact sheet: Antibiotic resistance*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>, October 2017(Consultado 16 octubre 2017).
12. Munita, J.M. and C.A. Arias, *Mechanisms of Antibiotic Resistance*. *Microbiology spectrum*, 2016. 4(2): p. 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

13. Ageitos, J.M., et al., *Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria*. *Biochem Pharmacol*, 2017. 133: p. 117-138.
14. Takahashi, D., et al., *Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity*. *Biochimie*, 2010. 92(9): p. 1236-41.
15. Dathe, M. and T. Wieprecht, *Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1999. 1462(1–2): p. 71-87.
16. Cherry, M.A., et al., *Peptides with the same composition, hydrophobicity, and hydrophobic moment bind to phospholipid bilayers with different affinities*. *J Phys Chem B*, 2014. 118(43): p. 12462-70.
17. Yeaman, M.R. and N.Y. Yount, *Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance*. *Pharmacological Reviews*, 2003. 55(1): p. 27.
18. Wang, Y., et al., *Comparative molecular dynamics simulations of the antimicrobial peptide CM15 in model lipid bilayers*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1818(5): p. 1402-9.
19. Bhargava, K. and J.B. Feix, *Membrane binding, structure, and localization of cecropin-mellitin hybrid peptides: a site-directed spin-labeling study*. *Biophys J*, 2004. 86(1 Pt 1): p. 329-36.
20. Antony, A. and G. Leslie, *22 - Degradation of polymeric membranes in water and wastewater treatment*, in *Advanced Membrane Science and Technology for Sustainable Energy and Environmental Applications*, A. Basile and S.P. Nunes, Editors. 2011, Woodhead Publishing. p. 718-745.
21. Li, J., et al., *Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design*. *Frontiers in Neuroscience*, 2017. 11(73).
22. Ingólfsson, H.I., et al., *Lipid Organization of the Plasma Membrane*. *Journal of the American Chemical Society*, 2014. 136(41): p. 14554-14559.
23. Sohlenkamp, C. and O. Geiger, *Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016. 40(1): p. 133-159.
24. Atukorale, P.U., et al., *Influence of the glycocalyx and plasma membrane composition on amphiphilic gold nanoparticle association with erythrocytes*. *Nanoscale*, 2015. 7(26): p. 11420-32.
25. Toropova, M.A., et al., *QSAR modeling of the antimicrobial activity of peptides as a mathematical function of a sequence of amino acids*. *Computational biology and chemistry*, 2015. 59 Pt A: p. 126-130.

26. Garcia, F., et al., *Antimicrobial peptides from arachnid venoms and their microbicidal activity in the presence of commercial antibiotics*. J Antibiot (Tokyo), 2013. 66(1): p. 3-10.
27. Baker, D. and A. Sali, *Protein Structure Prediction and Structural Genomics*. Science, 2001. 294(5540): p. 93.
28. Cavasotto, C.N. and S.S. Phatak, *Homology modeling in drug discovery: current trends and applications*. Drug Discovery Today, 2009. 14(13): p. 676-683.
29. Hillisch, A., L.F. Pineda, and R. Hilgenfeld, *Utility of homology models in the drug discovery process*. Drug Discov Today, 2004. 9(15): p. 659-69.
30. Lozano-Aponte, J. and T. Scior, *¿Qué sabe Ud. Acerca de... Dinámica Molecular?* Revista mexicana de ciencias farmacéuticas, 2014. 45: p. 86-88.
31. Hollingsworth, S.A. and R.O. Dror, *Molecular Dynamics Simulation for All*. Neuron, 2018. 99(6): p. 1129-1143.
32. Huggins, D.J., et al., *Biomolecular simulations: From dynamics and mechanisms to computational assays of biological activity*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, 2019. 9(3).
33. Chojnacki, S., et al., *Programmatic access to bioinformatics tools from EMBL-EBI update: 2017*. Nucleic Acids Research, 2017. 45(W1): p. W550-W553.
34. Fiser, A., *Template-Based Protein Structure Modeling*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2010. 673: p. 73-94.
35. Emsley, P., et al., *Features and development of Coot*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. 66(Pt 4): p. 486-501.
36. McLachlan, A., *Rapid comparison of protein structures*. Acta Crystallographica Section A, 1982. 38.
37. Wickham, H. and L. Stryjewski, *40 years of boxplots*. 2011.
38. Yang, J., et al., *The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction*. Nat Methods, 2015. 12(1): p. 7-8.
39. Song, Y., et al., *High resolution comparative modeling with RosettaCM*. Structure (London, England : 1993), 2013. 21(10): p. 10.1016/j.str.2013.08.005.
40. Kufareva, I. and R. Abagyan, *Methods of protein structure comparison*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2012. 857: p. 231-257.
41. Li, S.C. and Y.K. Ng, *Calibur: a tool for clustering large numbers of protein decoys*. BMC Bioinformatics, 2010. 11(1): p. 25.
42. Chen, V.B., et al., *MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2010. 66(Pt 1): p. 12-21.

43. Laskowski, R.A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M., , *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. Journal of Applied Crystallography, 1993. 26: p. 283-291.
44. Klauda, J.B., et al., *Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types*. The Journal of Physical Chemistry B, 2010. 114(23): p. 7830-7843.
45. Best, R.B., et al., *Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone ϕ , ψ and Side-Chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2012. 8(9): p. 3257-3273.
46. Wu, E.L., et al., *CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations*. J Comput Chem, 2014. 35(27): p. 1997-2004.
47. Lee, J., et al., *CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2016. 12(1): p. 405-413.
48. Strandberg, E., et al., *Lipid shape is a key factor for membrane interactions of amphipathic helical peptides*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2012. 1818(7): p. 1764-1776.
49. Wang, J., et al., *The cooperative behaviour of antimicrobial peptides in model membranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2014. 1838(11): p. 2870-2881.
50. Li, J., et al., *Molecular simulations suggest how a branched antimicrobial peptide perturbs a bacterial membrane and enhances permeability*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2013. 1828(3): p. 1112-1121.
51. Guixa-Gonzalez, R., et al., *MEMBPLUGIN: studying membrane complexity in VMD*. Bioinformatics, 2014. 30(10): p. 1478-80.
52. Kumari, R., R. Kumar, and A. Lynn, *g_mmpbsa—A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2014. 54(7): p. 1951-1962.
53. Ferreira de Freitas, R. and M. Schapira, *A systematic analysis of atomic protein–ligand interactions in the PDB*. MedChemComm, 2017. 8(10): p. 1970-1981.
54. Pearson, W.R., *FASTA Search Programs*, in eLS, L.E. John Wiley & Sons, Editor. 2014.
55. Li, H., et al., *Roles of d-Amino Acids on the Bioactivity of Host Defense Peptides*. International journal of molecular sciences, 2016. 17(7): p. 1023.

56. Kucerka, N., M.P. Nieh, and J. Katsaras, *Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1808(11): p. 2761-71.
57. Kucerka, N., et al., *Scattering density profile model of POPG bilayers as determined by molecular dynamics simulations and small-angle neutron and X-ray scattering experiments*. *J Phys Chem B*, 2012. 116(1): p. 232-9.
58. Berendsen, H.J.C., D. van der Spoel, and R. van Drunen, *GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation*. *Computer Physics Communications*, 1995. 91(1): p. 43-56.
59. Seelig, J. and N. Waespe-Sarcevic, *Molecular order in cis and trans unsaturated phospholipid bilayers*. *Biochemistry*, 1978. 17(16): p. 3310-3315.
60. Skjevik, Å.A., et al., *Simulation of lipid bilayer self-assembly using all-atom lipid force fields*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2016. 18(15): p. 10573-10584.
61. Zhao, L., et al., *Molecular Dynamics Simulations of Human Antimicrobial Peptide LL-37 in Model POPC and POPG Lipid Bilayers*. *International journal of molecular sciences*, 2018. 19(4): p. 1186.
62. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: Visual molecular dynamics*. *Journal of Molecular Graphics*, 1996. 14(1): p. 33-38.
63. Talandashti, R., et al., *Molecular Basis for Membrane Selectivity of Antimicrobial Peptide Pleurocidin in the Presence of Different Eukaryotic and Prokaryotic Model Membranes*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2019. 59(7): p. 3262-3276.
64. Wang, Y., et al., *How reliable are molecular dynamics simulations of membrane active antimicrobial peptides?* *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2014. 1838(9): p. 2280-2288.
65. Jafari, M., F. Mehrnejad, and F. Doustdar, *Insight into the interactions, residue snorkeling, and membrane disordering potency of a single antimicrobial peptide into different lipid bilayers*. *PLoS one*, 2017. 12(11): p. e0187216-e0187216.
66. Faya, M., et al., *Antimicrobial cell penetrating peptides with bacterial cell specificity: pharmacophore modelling, quantitative structure activity relationship and molecular dynamics simulation*. *J Biomol Struct Dyn*, 2018: p. 1-11.
67. Nguyen, L.T., et al., *Investigating the cationic side chains of the antimicrobial peptide tritrypticin: hydrogen bonding properties govern its membrane-disruptive activities*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1808(9): p. 2297-303.

68. Dougherty, D.A., *Cation- π Interactions Involving Aromatic Amino Acids*. The Journal of Nutrition, 2007. 137(6): p. 1504S-1508S.
69. Khandelia, H. and Y.N. Kaznessis, *Cation- π interactions stabilize the structure of the antimicrobial peptide indolicidin near membranes: molecular dynamics simulations*. The journal of physical chemistry. B, 2007. 111(1): p. 242-250.
70. Waghu, F.H., et al., *Designing Antibacterial Peptides with Enhanced Killing Kinetics*. Frontiers in microbiology, 2018. 9: p. 325-325.
71. Pandit, K.R. and J.B. Klauda, *Membrane models of E. coli containing cyclic moieties in the aliphatic lipid chain*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2012. 1818(5): p. 1205-1210.
72. Liu, L., Y. Fang, and J. Wu, *Flexibility is a mechanical determinant of antimicrobial activity for amphipathic cationic α -helical antimicrobial peptides*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2013. 1828(11): p. 2479-2486.
73. Amos, S.-B.T.A., et al., *Antimicrobial Peptide Potency is Facilitated by Greater Conformational Flexibility when Binding to Gram-negative Bacterial Inner Membranes*. Scientific Reports, 2016. 6(1): p. 37639.
74. Migoñ, D., et al., *Alanine Scanning Studies of the Antimicrobial Peptide Aurein 1.2*. Probiotics and antimicrobial proteins, 2019. 11(3): p. 1042-1054.
75. Balatti, G.E., et al., *Differential Interaction of Antimicrobial Peptides with Lipid Structures Studied by Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulations*. Molecules, 2017. 22(10).
76. Hollmann, A., et al., *Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide-membrane interactions of three related antimicrobial peptides*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016. 141: p. 528-536.
77. Chen, Y., et al., *Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2007. 51(4): p. 1398-1406.
78. Thevenet, P., et al., *PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides*. Nucleic Acids Res, 2012. 40(Web Server issue): p. W288-93.
79. Mól, A.R., M.S. Castro, and W. Fontes, *NetWheels: A web application to create high quality peptide helical wheel and net projections*. bioRxiv, 2018: p. 416347.
80. Goddard, T.D., et al., *UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis*. 2018. 27(1): p. 14-25.

81. Bi, X., et al., *Investigation of the role of tryptophan residues in cationic antimicrobial peptides to determine the mechanism of antimicrobial action*. J Appl Microbiol, 2013. 115(3): p. 663-72.
82. Rice, A. and J. Wereszczynski, *Probing the disparate effects of arginine and lysine residues on antimicrobial peptide/bilayer association*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2017. 1859(10): p. 1941-1950.
83. Arias, M., et al., *Improving the Activity of Trp-Rich Antimicrobial Peptides by Arg/Lys Substitutions and Changing the Length of Cationic Residues*. Biomolecules, 2018. 8(2).
84. Mura, M., et al., *The effect of amidation on the behaviour of antimicrobial peptides*. European biophysics journal : EBJ, 2016. 45(3): p. 195-207.
85. Taheri, B., et al., *Substitution of lysine for isoleucine at the center of the nonpolar face of the antimicrobial peptide, piscidin-1, leads to an increase in the rapidity of bactericidal activity and a reduction in toxicity*. Infect Drug Resist, 2019. 12: p. 1629-1647.
86. Yin, L.M., et al., *Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions*. J Biol Chem, 2012. 287(10): p. 7738-45.
87. M.J. Abraham, D.v.d.S., E. Lindahl, B. Hess, and the GROMACS and d. team, *GROMACS User Manual version 5.1.4*. www.gromacs.org, 2016.
88. Heinig, M. and D. Frishman, *STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins*. Nucleic acids research, 2004. 32(Web Server issue): p. W500-W502.
89. Hintze, B.J., et al., *Molprobit's ultimate rotamer-library distributions for model validation*. Proteins, 2016. 84(9): p. 1177-1189.
90. Williams, C.J., et al., *MolProbit: More and better reference data for improved all-atom structure validation*. Protein science : a publication of the Protein Society, 2018. 27(1): p. 293-315.