



**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Monterrey

**Estudio de la interacción de inhibidores de canales
mecanosensibles con membranas lipídicas mediante
dinámica molecular**

Tesis que presenta:

Carolina Siller Cedillo

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Ingeniería y Física Biomédicas

Co-Directores de tesis:

Dr. Daniel Paulo Sánchez Herrera

Dr. Ángel David Reyes Figueroa

Apodaca, Nuevo León

Noviembre del 2024

Agradecimientos

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de varias personas e instituciones a las que me gustaría mostrar mi agradecimiento.

Primeramente me gustaría agradecer al CINVESTAV Monterrey por brindarme las herramientas necesarias para poder llevar a cabo este proyecto, así como al CONAHCYT por la beca recibida en estos dos años de trabajo.

Así mismo, quisiera agradecer a mis directores de tesis el Dr. Daniel Paulo Sánchez y el Dr. Ángel David Reyes por su contribución en este trabajo de tesis, su tiempo y su asesoramiento constante.

Un sincero agradecimiento a mis amigas, en especial a Diana y Arantxa, que estuvieron conmigo en los momentos de estrés y alegría durante este largo camino. Su apoyo, confianza, soporte y cariño han sido invaluable. Cada una de ustedes ha contribuido a mi fortaleza y ánimo de una manera u otra. Gracias por ser mi punto de apoyo y por siempre brindarme un lugar seguro para desahogarme.

Gracias infinitas a mis padres, por su amor incondicional y su apoyo moral. Su fe en mí, incluso en los momentos más difíciles, ha sido el pilar de este logro. También expreso mi gratitud a mi hermana, quien siempre me brindó su tiempo para escucharme y apoyarme. Sin ustedes, todo esto no habría sido posible.

Y por último, me agradezco a mi misma por nunca rendirme y siempre dar lo mejor, ya que sin mi arduo trabajo y dedicación este trabajo no sería posible.

Índice

1. Resumen	11
2. Abstract	12
3. Introducción	13
4. Antecedentes	15
4.1. Sistema nervioso	15
4.1.1. Sistema Nervioso Periférico	15
4.1.2. Tipos de neuronas	16
4.1.3. Neuronas sensoriales en el ganglio de la raíz dorsal	16
4.2. Mecanotransducción	17
4.2.1. Canales mecanosensibles	19
4.2.2. Canales Piezo	20
4.3. Inhibidores de canales mecanosensibles	20
4.3.1. Toxina GsMTx-4	21
4.3.2. Mecanismo de interacción de la toxina GsMTx-4	23
4.4. Composición de las membranas plasmáticas	25
4.4.1. Glicolípidos	25
4.4.2. Función de los glicolípidos en el sistema nervioso	26
4.4.3. Diferencias entre los glicolípidos y otros lípidos encontrados en mem- branas celulares	27
5. Hipótesis	28
6. Objetivos	28
6.1. Objetivo general	28
6.2. Objetivos específicos	28
7. Metodología	29
7.1. Estrategia experimental	29

7.1.1.	Modelar las membranas mediante la interfaz gráfica de usuario basada en web con el campo de fuerza CHARMM	30
7.1.2.	Generar el campo de fuerza para la toxina GsMTx-4	31
7.2.	Simulación de dinámica molecular	32
7.2.1.	Preparación del sistema	32
7.2.2.	Minimización de energía	32
7.2.3.	Equilibración del sistema	33
7.2.4.	Producción del sistema	34
7.3.	Análisis de las propiedades del sistema	35
8.	Resultados	38
8.1.	Simulación de dinámica molecular de los sistemas	38
8.2.	Área por lípido y ancho de membrana	44
8.3.	Perfil de densidad	46
8.4.	Función de distribución radial	53
8.5.	Parámetro de orden	59
8.6.	Centro de masa	62
8.7.	Difusión lateral	66
9.	Discusión	68
10.	Conclusiones	76
11.	Perspectivas	78
12.	Anexos	79
13.	Bibliografía	82

Índice de figuras

1.	Principales tipos de neuronas del Sistema Nervioso Periférico.	17
2.	Pasos del proceso de mecanotransducción dentro de la célula mediada por los canales mecanosensibles.	18
3.	Ejemplo de tres moléculas que han sido descritas como inhibidores de los canales mecanosensibles.	22
4.	Estructura de la toxina GsMTx-4 utilizada para las simulaciones. Lado izquierdo vista lateral y lado derecho vista inferior. El triptófano (TRP) se presentan en color azul, los residuos hidrófobicos en color verde (GLY, LEU, PHE), los básicos en color cian (LYS y ARG), los polares en color rosa (CYS, ASN, SER) y los residuos ácidos en color rojo (ASP, GLU). . .	24
5.	Estructura general de los esfingolípidos grupo al cual pertenece la galactosilceramida. Los esfingolípidos cuentan con tres partes importantes: un residuo de azúcar en la cabeza hidrofílica, una cadena de esfingosina y una cadena de ácidos grasos.	26
6.	Representación del modelo experimental a realizar. La metodología general consiste en crear los sistemas de POPC, DPGS y la mezcla de ambos para posteriormente insertar la toxina y llevar a cabo las simulaciones de dinámica molecular.	29
7.	Imagen representativa de como se encuentran los modelos de membrana simulados en presencia de una toxina GsMTx-4 antes de iniciar la simulación de dinámica molecular. A) Vista lateral de la membrana de POPC con una toxina en el medio. B) Vista lateral de la membrana de DPGS con una toxina en el medio. C) Vista lateral de la membrana conformada por la mezcla de POPC y DPGS con una toxina en el medio.	38

8.	Imagen representativa de como se encuentran los modelos de membrana simulados en presencia de seis toxinas GsMTx-4 antes de iniciar la simulación de dinámica molecular. A) Vista lateral de la membrana de POPC con seis toxinas en el medio. B) Vista lateral de la membrana de DPGS con seis toxinas en el medio. C) Vista lateral de la membrana conformada por la mezcla de POPC y DPGS con seis toxinas en el medio.	39
9.	Comparativa de los sistemas con una molécula de toxina simulados a 500 ns y a 1 μ s. A) Vista lateral del sistema de POPC con una toxina a los 500 ns de simulación y a 1 μ s de simulación. B) Vista lateral del sistema de DPGS con una toxina a los 500 ns de simulación y a 1 μ s de simulación. C) Vista lateral del sistema de la mezcla de POPC y DPGS con una toxina a los 500 ns de simulación y a 1 μ s de simulación.	40
10.	Comparativa de los sistemas con seis moléculas de toxinas simulados a 500 ns y a 1 μ s. A) Vista lateral del sistema de POPC con seis toxinas a los 500 ns de simulación y a 1 μ s de simulación. B) Vista lateral del sistema de DPGS con seis toxinas a los 500 ns de simulación y a 1 μ s de simulación. C) Vista lateral del sistema de la mezcla de POPC y DPGS con seis toxinas a los 500 ns de simulación y a 1 μ s de simulación.	41
11.	Vista superior de las capas de la membrana mezcla donde se encuentra interaccionando la toxina. A) Sistema de la mezcla de lípidos donde se encuentra interaccionando una sola toxina a los 500 ns (izquierda) y a 1 μ s (derecha) B) Sistema de la mezcla de lípidos donde se encuentran interaccionando seis toxinas, cuatro con la capa superior (izquierda) y dos con la capa inferior (derecha) a 1 μ s de tiempo de simulación.	43

12.	Gráfica del promedio del área por lípido \pm la desviación estándar de los tres sistemas y de los diferentes grupos experimentales: sin toxina, con una toxina y con 6 toxinas. Se realizaron dos pruebas diferentes para conocer si existía diferencia significativa entre los grupos la primera siendo la prueba de ANOVA seguida por una prueba de Tuckey; los asteriscos representan que existe diferencia significativa entre los grupos. En la membrana conformada por la mezcla de lípidos en el ANOVA se obtuvo un p-value de 0.008 y en la prueba de Tuckey un p-value de 0.011 entre el grupo sin toxina y el grupo de una toxina, y un p-value de 0.028 entre el grupo con una toxina y el grupo con seis toxinas.	45
13.	Gráfica del promedio del ancho de membrana \pm la desviación estándar de los tres sistemas y de los diferentes grupos experimentales: sin toxina, con una toxina y con 6 toxinas. Se realizaron dos pruebas diferentes para conocer si existía diferencia significativa entre los grupos la primera siendo la prueba de ANOVA seguida por una prueba de Tuckey; los asteriscos representan que existe diferencia significativa entre los grupos. En la membrana de la mezcla de lípidos en el ANOVA se obtuvo un p-value de 0.018 y en la prueba de Tuckey se obtuvo un p-value de 0.015 entre el grupo de una toxina y el grupo de seis toxinas.	46
14.	Perfil de densidad de las membranas de POPC. A) Sin toxina. B) Con una toxina. C) Con 6 toxinas.	48
15.	Perfil de densidad de las membranas de DPGS. A) Sin toxina. B) Con una toxina. C) Con 6 toxinas.	49
16.	Perfil de densidad de las membranas compuestas por la mezcla de POPC y DPGS. A) Sin toxina. B) Con una toxina. C) Con 6 toxinas.	50
17.	Perfil de densidad de las toxinas en los diferentes sistemas de membrana. A) Con una toxina. B) Con 6 toxinas.	52
18.	Función de distribución radial entre diferentes átomos de la región polar de los lípidos A) Entre los grupos fosfato del sistema de POPC. B) Entre el carbono C3 de la galactosa del sistema de DPGS.	53

19.	Función de distribución radial entre diferentes átomos de la región polar de los lípidos que conforman la membrana mezcla. A) Entre los grupos fosfato del POPC. B) Entre el carbono C3 de la galactosa del DPGS C) Entre los grupos fosfato y carbono C3 de la galactosa de los lípidos POPC y DPGS respectivamente.	54
20.	Distribución radial entre el aminoácido triptófano presente en la toxina y las cabezas lipídicas de DPGS y POPC en las 3 membranas. A) Sistemas con una sola toxina. B) Sistemas con 6 toxinas.	57
21.	Distribución radial entre el aminoácido triptófano presente en la toxina y las moléculas de agua en el medio. A) Sistemas con una sola toxina. B) Sistemas con 6 toxinas.	58
22.	Parámetro de orden de una de las cadenas de ácidos grasos de POPC y de esfingosina de DPGS. A) Cadena de ácidos grasos de POPC. B) Cadena de esfingosina de DPGS.	60
23.	Parámetro de orden de una de las cadenas de ácidos grasos de POPC y de esfingosina de DPGS que componen la membrana mezcla. A) Cadena de ácidos grasos del POPC que se encuentra en la membrana mezcla. B) Cadena de esfingosina de DPGS que se encuentra en la membrana mezcla.	61
24.	Centro de masa de la toxina GsMTx-4 a lo largo de la simulación y de los grupos funcionales de las cabezas hidrofílicas de los lípidos que componen las membranas. A) Membrana de POPC pura. B) Membrana de DPGS pura. C) Membrana compuesta por la mezcla de ambos lípidos.	63
25.	Centro de masa de las 6 toxina GsMTx-4 a lo largo de la simulación y de los grupos funcionales de las cabezas hidrofílicas de los lípidos que componen las membranas. A) Membrana de POPC. B) Membrana de DPGS. C) Membrana compuesta por la mezcla de ambos lípidos.	65

26.	Gráfica del promedio de la difusión lateral \pm la desviación estándar de los lípidos en los diferentes sistemas de membranas. Se realizaron dos pruebas diferentes para conocer si existía diferencia significativa entre los grupos, la primera siendo la prueba de ANOVA seguida por una prueba de Tuckey; los asteriscos representan que existe diferencia significativa entre los grupos. En la membrana de la mezcla de lípidos para el lípidos POPC en el ANOVA se obtuvo un p-value de 0.001 y en la prueba de Tuckey se obtuvo un p-value de 0.001 entre el grupo sin toxina y de seis toxina y un p-value de 0.020 entre el grupo de una toxina y el de seis toxinas; mientras que para el lípido de DPGS en el ANOVA se obtuvo un p-value de 6.73e-05 y en la prueba de Tuckey se obtuvo un p-value de 0.020 entre el grupo sin toxina y de una toxina, un p-value de 0.003 entre el grupo sin toxina y el de seis toxinas y un p-value de 0.0001 entre el grupo de una toxina y el de seis toxinas.	67
27.	Imagen representativa de los lípidos POPC y DPGS que componen las membranas simuladas y los átomos que los conforman.	79
28.	Imagen representativa de los lípidos POPC y DPGS que componen las membranas simuladas circulando en verde los átomos que conforman las cabezas hidrofílicas, de morado la parte media y de rojo los átomos que componen las cadenas hidrofóbicas.	79
29.	Parámetro de orden de las cadenas de ácidos grasos de POPC y de DPGS. A) Cadena de ácidos grasos del POPC. B) Cadena de ácidos grasos de DPGS.	80
30.	Parámetro de orden de las cadenas de ácidos grasos de POPC y de DPGS que componen la membrana mezcla. A) Cadena de ácidos grasos del POPC que se encuentra en la membrana mezcla. B) Cadena de ácidos grasos del DPGS que se encuentra en la membrana mezcla.	81

Índice de tablas

1.	Descripción de los modelos de membrana generados para la simulación de dinámica molecular.	31
2.	Promedio del área por lípido de los sistemas formados por POPC, DPGS y la mezcla de ambos lípidos.	44
3.	Promedio del ancho de membrana de los sistemas formados por POPC, DPGS y la mezcla de ambos lípidos.	46

1. Resumen

La toxina GsMTX-4 es un inhibidor no-específico de los canales PIEZO los cuales son los responsables de llevar a cabo la mecanotransducción. Se ha reportado que estas toxinas interactúan con neuronas IB4+, las cuales se caracterizan por presentar grupos glicosilados en su estructura molecular; debido a esto se buscó demostrar que la presencia de glicolípidos en las membranas de estas neuronas afectaba directamente la unión de esta toxina. Partiendo de membranas modelo que contuvieran en su estructura fosfatidilcolinas (POPC) y galactosilceramidas (DPGS), se obtuvo que la diferencia en las cabezas lipídicas sí afecta la unión de la toxina, ya que ésta presenta una interacción profunda con las membranas que contienen DPGS, mientras que con las que contienen POPC se presenta una interacción superficial. Los análisis de las propiedades mecánicas de las membranas como lo son la distribución radial, la densidad de la toxina y el centro de masa consolidan la preferencia de GsMTx-4 por interactuar con las cabezas lipídicas de DPGS, sobre todo cuando ésta se encuentra en una misma membrana con POPC. De igual manera, al agregar seis toxinas al medio en el que se encuentran las membranas, se observa que en algunos casos existe la formación de agregados; para el modelo formado únicamente de POPC, las toxinas prefieren interactuar entre ellas antes que con la membrana, en el caso del sistema DPGS puro, las toxinas no forman agregados sino que se internalizan en la membrana, por último, la bicapa conformada por ambos tipos de lípidos, aunque sí se presenta formación de agregados por algunas toxinas, estas a su vez también interactúan con la membrana de manera profunda; el observar este tipo de comportamientos nos acerca más a entender el mecanismo de acción de esta toxina y como esto llega a afectar el proceso de la mecanotransducción.

2. Abstract

The GsMTX-4 toxin is a non-specific inhibitor of PIEZO channels, which are responsible for mechanotransduction. It has been reported that these toxins interact with IB4+ neurons, which are characterized by the presence of glyco groups in their structure. Therefore, the aim was to demonstrate that the presence of glycolipids in the membranes of these neurons directly affects the binding of this toxin. Using model membranes containing phosphatidylcholine (POPC) and galactosylceramides (DPGS), it was found that the difference in lipid head groups does affect toxin binding, as there is a deeper interaction with membranes containing DPGS, while membranes with POPC show only a superficial interaction. The analysis of mechanical properties of the membranes, such as radial distribution function, toxin density, and center of mass, confirm the preference of GsMTx-4 interacting with the lipid heads of DPGS, especially when it is in the same membrane as POPC. Additionally, when six toxins are added, it is observed that in some cases, protein aggregation occurs. In the pure POPC models, the toxins prefer to interact with each other rather than with the membrane. For the system with only DPGS, the toxins do not form aggregates but are internalized into the membrane. The bilayers containing both lipids, although some toxins do form aggregates, these also interact deeply with the membrane. Observing these behaviors helps us better understand the mechanism of action of this toxin and how it affects the process of mechanotransduction.

3. Introducción

El sistema sensorial es la parte aferente del sistema nervioso periférico responsable de procesar y transmitir los estímulos captados del ambiente; la transmisión de esta información es llevada a cabo por las neuronas sensoriales, las cuales se encuentran en el ganglio de la raíz dorsal y se encargan de acarrear mensajes sensoriales captados por diferentes tipo de receptores desde las terminales del sistema nervioso periférico, hasta el sistema nervioso central, para generar una respuesta específica (Koop y Tadi. 2023). Una de las actividades mediadas por el sistema sensorial es la mecanotransducción, la cual se describe como la habilidad de los organismos vivos para detectar las fuerzas mecánicas ejercidas por el ambiente y poder convertirlas en estímulos para generar una respuesta biológica; esta habilidad es crucial para que los seres vivos puedan interactuar con el medio que los rodea, así como para detectar sensaciones de dolor y poder reaccionar ante posibles afectaciones al organismo (Szczot *et al.* 2021).

Las fuerzas mecánicas son transformadas a estímulos por medio de los canales iónicos mecanosensibles, los cuales se encuentran embebidos en la membrana plasmática. La activación de estos canales por los estímulos mecánicos depolarizan la membrana y permiten que la información recibida del ambiente se propague hasta alcanzar el sistema nervioso central (Delmas *et al.* 2011). Los canales iónicos mecanosensitivos más estudiados actualmente son los canales iónicos pertenecientes a las familias Piezo y TRP, los cuales se encuentran principalmente en las neuronas sensoriales y son activados cuando la célula es afectada por una fuerza mecánica, estos canales iónicos son esenciales para la regulación de la excitabilidad neuronal (Tang *et al.* 2022).

El estudio de este tipo de canales en áreas como la farmacología es importante para el desarrollo de nuevas terapias contra el dolor, es por ello que en los últimos años se han descubierto una amplia variedad de inhibidores de canales mecanosensibles, entre los cuales se destaca la toxina GsMTX-4, la cual es un péptido de 34 aminoácidos que pertenece a la familia de toxinas aisladas del veneno de la araña *Grammostola spatulata*, esta toxina es un inhibidor importante de los canales cationicos mecanosensitivos (MCS), que en particular inhibe la acción de los canales pertenecientes a la familia Piezo y TRP (Gnanasambandam *et al.* 2017). Una de las características de éste y otros inhibidores

de canales mecanosensitivos es que no actúan directamente sobre los canales sino que penetran o interaccionan con la membrana plasmática, y es la interacción con los lípidos que se encuentran en esta, lo que evita que los canales cumplan su función (Tang *et al.* 2022).

Debido a la importancia de las membranas plasmáticas en la mecanotransducción y su inhibición, surge la pregunta de si la composición de los lípidos que conforman la membrana puede llegar a afectar los procesos previamente descritos. El sistema nervioso es uno de los tejidos que cuenta con una alta concentración de glicolípidos en las membranas de sus células, sin embargo, estos fosfolípidos siguen siendo muy poco estudiados y no se conoce por completo su importancia (Hussain *et al.* 2019). En este estudio se busca resolver la pregunta de si la presencia de los glicolípidos en las membranas lipídicas puede llegar a afectar la interacción con GsMTx-4 con estas. El estudio de estos sistemas complejos puede llegar a ser difícil de realizar de manera experimental y es por ello que se parte del uso de herramientas computacionales, como lo es la simulación de dinámica molecular, para generar aproximaciones que describan como se comporta cada uno de los elementos que lo conforman y poder acercarse a un entendimiento más completo.

4. Antecedentes

4.1. Sistema nervioso

El sistema nervioso es de suma importancia debido al papel que desempeña en todos los aspectos de la vida y la salud; este sistema se encarga de transmitir las señales entre el cerebro y el resto de los órganos del cuerpo y es el responsable de controlar activamente la habilidad de moverse, respirar, pensar, observar, entre otros procesos importantes para el bienestar de los seres vivos (NIH. 2018). El sistema nervioso se comprende principalmente de dos partes:

- El sistema nervioso central, el cuál engloba el cerebro y la médula espinal.
- El sistema nervioso periférico, que engloba los nervios que salen y entran desde la médula espinal y se extienden a todas partes del cuerpo.

Las principales células que se encuentran en el sistema nervioso y que permiten que éste desempeñe su papel son las neuronas; en el cerebro humano podemos encontrar alrededor de 100 mil millones de neuronas. Estas se conforman de un cuerpo celular llamado soma, donde se encuentra el núcleo, así como de dos tipos de extensiones, el axón y las dendritas, las cuales permiten la comunicación entre neuronas para poder llevar a cabo todos los procesos biológicos necesarios para la supervivencia de los seres vivos (NCI. s.f.).

Las neuronas se comunican entre ellas a través de impulsos eléctricos los cuales viajan a lo largo del axón, al final del axón la señal eléctrica se convierte en una señal química la cuál es liberada a través de mensajeros químicos, llamados neurotransmisores, estos neurotransmisores se mueven por medio de la sinapsis hasta la membrana de la neurona vecina y mediante la activación de canales iónicos vuelven a transformar la señal química a una señal eléctrica para continuar con la transmisión del impulso. Las membranas plasmáticas de las neuronas así como los receptores que se encuentran anclados en estas son importantes para poder llevar a cabo este proceso (NIH. 2018).

4.1.1. Sistema Nervioso Periférico

Como se mencionó anteriormente, el sistema nervioso se divide en dos partes, en este trabajo nos enfocaremos principalmente en las neuronas que conforman el sistema

nervioso periférico (SNP), este sistema se constituye principalmente de los nervios que van desde el sistema nervioso central hasta todas las partes del cuerpo y es el principal encargado de comunicar ambas partes para poder llevar a cabo los procesos fisiológicos. A su vez, el sistema nervioso periférico se subdivide en dos partes, el sistema sensorial o aferente y el sistema motor o eferente. Mientras el primero se conforma de nervios que conectan el sistema nervioso central con la piel y los demás órganos del organismo, el último se conforma principalmente de nervios que conectan el sistema nervioso central con los músculos (NCI. s.f.).

4.1.2. Tipos de neuronas

En el sistema nervioso existen una amplia variedad de neuronas las cuales se dividen dependiendo de las acciones que controlan y realizan. Entre la variedad de actividades que realiza el sistema nervioso estas se pueden clasificar en tres funciones principales las cuales son:

- Función sensorial
- Función integrativa
- Función motora

De igual manera podemos clasificar a las neuronas del SNP dependiendo de la función en la que participen. En la figura 1 se observa la morfología de las principales neuronas del SNP mostrando las diferencias estructurales que existen entre estas tres (NCI. s.f.).

4.1.3. Neuronas sensoriales en el ganglio de la raíz dorsal

Las neuronas sensoriales forman la parte aferente del sistema nervioso periférico y son las encargadas de transmitir los impulsos nerviosos recibidos del exterior por la piel o los originados en los órganos internos hasta el sistema nervioso central. Entre los fenómenos internos y externos que son capaces de transmitir estas neuronas se encuentran la temperatura, el tacto, el volumen de los órganos, el dolor y el peligro potencial o existente en el ambiente (Koop y Tadi. 2023).

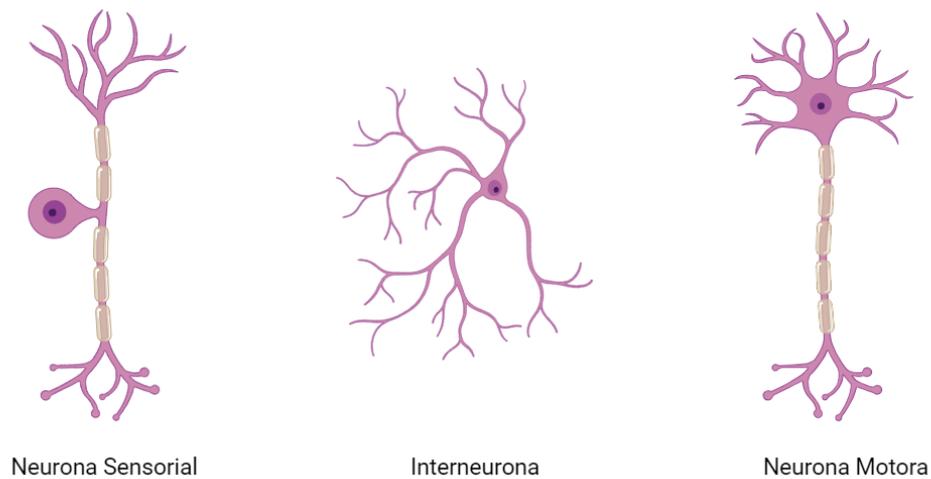


Figura 1: Principales tipos de neuronas del Sistema Nervioso Periférico.

Los cuerpos celulares o somas de las neuronas sensoriales se ubican principalmente en el ganglio de la raíz dorsal donde se encargan de transmitir la información sensorial (Haberberger *et al.* 2019). Las neuronas sensoriales que se encuentran en el ganglio de la raíz dorsal son críticas para mantener la homeostasis del organismo ya que censan los cambios en el ambiente e inician el proceso de respuesta (Ahimsadasan *et al.* 2022). Estas neuronas tienen la habilidad de diferenciar y procesar las diversas señales sensoriales que reciben, esta habilidad es conferida debido a la presencia de distintos tipos de receptores en sus membranas plasmáticas, cada uno de estos receptores les permite captar y transmitir diferentes señales provenientes del ambiente (Krassioukov. 2002). Los receptores y canales iónicos presentes en estas células son esenciales para la regulación de la excitación neuronal la cuál después genera y transmite el potencial de acción que viaja por el axón mielinizado, haciendo conexiones hasta llegar al sistema nervioso central.

4.2. Mecanotransducción

Se conoce como mecanotransducción a la capacidad que tienen los organismos vivos de percibir las fuerzas mecánicas de su ambiente y poder transformarlas a una respuesta biológica. A nivel celular, estas fuerzas mecánicas son causadas principalmente por cambios en la matriz extracelular o en células vecinas dentro de los tejidos. El proceso de mecanotransducción le permite a las células adaptarse a su entorno físico ya que detecta

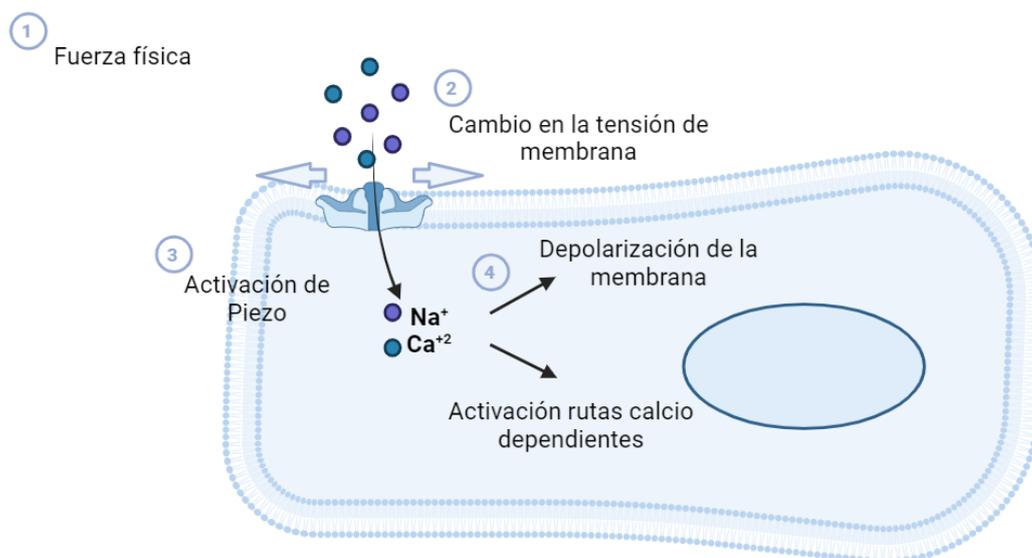


Figura 2: Pasos del proceso de mecanotransducción dentro de la célula mediada por los canales mecanosensibles.

las modificaciones que pueden llegar a afectar al microambiente en el que se encuentran (Martino *et al.* 2018, Tschumperlin. 2011).

El estudio de la mecanotransducción se enfoca principalmente en las neuronas sensoriales, debido a que el proceso empieza en las terminaciones nerviosas de estas neuronas donde existen estructuras celulares, como los canales iónicos, que permiten que las fuerzas mecánicas sean rápidamente transformadas en señales bioquímicas; estas señales pueden ser cambios en la concentración del calcio intracelular o la activación de rutas metabólicas mediante la generación de mensajeros intracelulares (Delmas *et al.* 2011). Por medio de la mecanotransducción las neuronas sensoriales son capaces de detectar una amplia variedad de estímulos mecánicos y mediar funciones fisiológicas básicas como lo son el sentido del tacto, el dolor y propiocepción. Entre los estímulos detectados se encuentran la tensión cortante, la tensión de rotura y la tensión de compresión, así como la rigidez o elasticidad del tejido en el que se encuentran las células (Szczot *et al.* 2021).

A nivel molecular, la mecanotransducción se basa en los cambios conformacionales inducidos por fuerzas mecánicas en las proteínas mecanosensibles, los cuales son sujetos a fuerzas moleculares, que resulta en la apertura de los canales iónicos de la membrana o a la alteración de otros tipos de receptores para dar paso a la activación de vías de

señalización. Este proceso permite que se lleven a cabo un amplio rango de procesos celulares importantes como lo son la migración, proliferación, diferenciación y la apoptosis, y es crucial para el desarrollo de los órganos y la homeostasis. Debido a su importancia los defectos en la mecanotransducción pueden llegar a causar una amplia variedad de enfermedades como lo son distrofias musculares, cardiomiopatías e incluso la progresión del cáncer o metástasis (Jaalouk y Lammerding. 2009).

4.2.1. Canales mecanosensibles

El proceso de mecanotransducción depende de los canales iónicos mecanosensibles para iniciar la depolarización de la membrana y poder propagar el potencial de acción generado por el estímulo hasta el sistema nervioso central. Los canales mecanosensitivos tienen una función importante en las células eucariontes, ya que permiten llevar a cabo funciones biológicas como lo son el tacto, el oído y la regulación cardiovascular. Al ser activados por estímulos mecánicos en las membranas celulares estos canales convierten este estímulo en señales intercelulares energéticas, osmóticas o químicas (Delmas *et al.* 2011). Estos canales mecanosensitivos se encuentran distribuidos por todo el cuerpo incluyendo la piel, tendones, músculos, vísceras, entre otros, siendo los más reconocidos los encontrados en la piel debido al amplio rango de estímulos que son capaces de detectar.

Actualmente existen dos modelos principales para explicar la mecanotransducción: el modelo de la fuerza por los lípidos y el modelo de la fuerza por la proteína, sin embargo en los últimos años las investigaciones se han inclinado más por el primero, debido a que se ha comprobado que la función de estos canales está íntimamente ligada a los lípidos que conforman la membrana plasmática de las células. El modelo basado en los lípidos, propone que la fuerza mecánica es aplicada directamente en la membrana de las neuronas sensoriales y esto ocasiona que exista un desajuste hidrófobico entre los lípidos que conforman la membrana y los dominios transmembranales de la proteína del canal iónico, para poder ajustarse a este desbalance la proteína sufre un cambio conformacional, permitiendo que el canal se abra y de lugar al paso de los iones entre el interior y exterior de la célula generando una reacción ante el estímulo mecánico aplicado (Ridone *et al.* 2019). Ridone *et al.* (2018) demostraron por medio de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear y técnicas de patch clamp, que existe una relación entre el perfil de

presión transmembranal y la activación de los canales mecanosensibles, evidenciando que las interacciones lípido-proteína influyen en la función de estos canales.

4.2.2. Canales Piezo

En los últimos años uno de los principales avances en el área de la neurobiología es el descubrimiento de los canales mecanosensibles de la familia Piezo, el reconocimiento de estos canales iónicos capaces de detectar el estrés mecánico le otorgo a Ardem Patapoutian el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2021 (Tang *et al.* 2022). Estos canales se encargan de transducir los estímulos mecánicos recibidos del exterior de las neuronas sensoriales en impulsos eléctricos que viajan hasta el sistema nervioso central y juegan un papel importante en la regulación de una amplia variedad de procesos fisiológicos. Esta familia de canales iónicos cuenta con dos miembros hasta el momento, Piezo1 y Piezo2, los cuales son los principales tipos de sensores de fuerzas moleculares en células de mamíferos. Mientras que Piezo 1 es ampliamente expresada en una gran variedad de tejidos y órganos, el canal Piezo2 se encuentra principalmente anclado a las membranas de las neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal, donde realiza funciones importantes como la percepción del tacto y el dolor (Shin *et al.* 2021).

Se ha observado que una mala función de estos canales puede ocasionar una amplia variedad de condiciones patológicas como lo son la osteoporosis, la encefalomiелitis autoinmune o incluso hasta el cáncer (Tang *et al.* 2022); por lo cual su estudio en el ámbito farmacológico es importante. El utilizar estos canales como objetivo de terapias ha presentado un gran potencial para el tratamiento de un amplio rango de enfermedades, validando así su uso como receptores blanco para drogas o fármacos (Ridone *et al.* 2019).

4.3. Inhibidores de canales mecanosensibles

Como se mencionó anteriormente el estudio de estos canales es de gran relevancia farmacológica y por ende también la tienen las moléculas capaces de inhibir o regular su función. Actualmente sólo se conocen pocas moléculas capaces de inhibir a ese tipo de canales y que se han utilizado en el estudio y caracterización de éstos. Entre estas moléculas se incluyen el ion gadolinio, la toxina GsMTx-4 aislada del veneno de tarántula, el rojo de rutenio, la proteína beta-amiloide y los ácidos grasos saturados y poliinsaturados (Figura

3)(Alcaino et al. 2017). Estas moléculas son conocidas como antagonistas no-específicos de los canales mecanosensibles, debido a que de manera general, realizan su inhibición al interaccionar y modificar las propiedades de la membrana plasmática, modificando indirectamente los canales (Tang *et al.* 2022).

Reyes-Pardo y Sánchez-Herrera (2019) realizaron un estudio donde probaron 3 moléculas antagonistas de los canales mecanosensibles: el ion gadolinio, el rojo de rutenio y la toxina GsMTx-4. En este estudio se observó que la interacción de estos inhibidores no-específicos de los canales mecanosensibles es directamente con la membrana lipídica, lo que ocasiona la desactivación de los canales. Sin embargo, el tipo de interacciones que presentan cada uno de estos inhibidores con la membrana varía dependiendo de las propiedades moleculares de cada inhibidor, a partir de los resultados obtenidos, y considerando las propiedades de cada una de las moléculas, se propone que el gadolinio es capaz de inhibir a estos canales debido a que su forma catiónica trivalente le permite interaccionar con los lípidos cargados negativamente de la membrana, de igual manera el rojo de rutenio interactúa con la membrana por medio de los residuos de azúcar de las glicoproteínas y glicolípidos. Por otro lado, la toxina GsMTx-4 presenta un caso particular debido a que como forma parte de la familia de toxinas que presentan un dominio de nudo inhibidor de cisteína (ICK) se cree que es capaz de integrarse en la membrana y así realizar la inhibición de los canales, sin embargo, esta es una interacción que hasta el momento no se ha podido comprobar y por lo que esta toxina es particularmente interesante y ha sido sujeto de estudios importantes.

4.3.1. Toxina GsMTx-4

La toxina GsMTx-4 es un péptido obtenido del veneno de la araña *Grammostola spatulata* y se caracteriza por ser un conocido inhibidor de los canales catiónicos mecanosensibles, entre los cuales se encuentran los pertenecientes a las familias Piezo y TRP; este péptido está compuesto por 34 aminoácidos y pertenece a la familia de toxinas que presentan el dominio de nudo inhibidor de cisteína (ICK) (Gnanasambandam *et al.* 2017). ICK es un motivo estructural caracterizado por tener tres puentes disulfuro que se organizan de tal manera que dos de estos enlaces forman una estructura de anillo por la cual pasa el tercer enlace. Este dominio es un arreglo molecular muy estable y es debido a esto

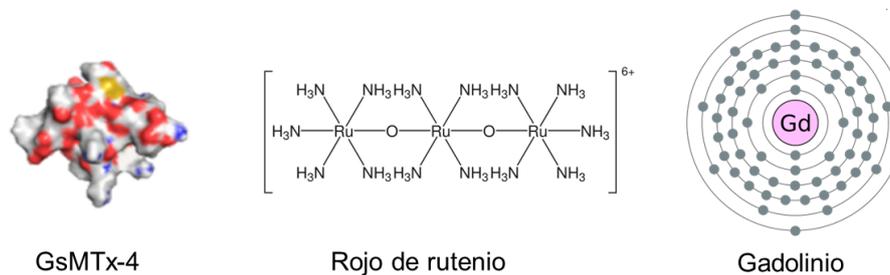


Figura 3: Ejemplo de tres moléculas que han sido descritas como inhibidores de los canales mecanosensibles.

que se ha conservado en una amplia variedad de péptidos que se encuentran en el veneno de diferentes especies (Trim *et al.* 2021). Al igual que los demás péptidos pertenecientes a esta familia GsMTx-4 es una molécula pequeña de alrededor de 4 kDa y anfipática, sin embargo, algo que distingue a esta toxina de las demás pertenecientes a la familia ICK es su alta potencia para inhibir los canales mecanosensitivos, ya que cuenta con una IC₅₀ de 2 μM (Mulhal *et al.* 2023), y el hecho de que esta inhibición no es estereoespecífica, ya que se ha observado que tanto GsMTx-4 como su enantiómero (enGsMTx-4) son capaces de inhibir a estos canales, lo que sugiere que para la función de GsMTx-4 es más importante la distorsión de la membrana plasmática que el reconocimiento específico molecular de la proteína del canal (Nishizawa y Nishizawa. 2007). De igual manera una de las características principales de esta molécula es que presenta 6 residuos de lisina en su estructura y esto le confiere una alta carga positiva (+5e), sin embargo a pesar de su alta carga positiva los estudios no muestran que GsMTx-4 presente preferencia por los lípidos aniónicos sobre los zwitteriónicos, mientras que otros péptidos ICK con menor carga positiva si llegan a tener una preferencia hacia los lípidos aniónicos (Gnanasambandam *et al.* 2017). Debido a estas características es que GsMTx-4 se ha vuelto uno de los inhibidores mecanosensibles de mayor interés en la actualidad.

Bae *et al.* (2011) mediante la realización de experimentos de patch clamp en la configu-

ración outside out en células HEK293 transfectadas con el canal Piezo1 demostraron que las corrientes eléctricas generadas como respuesta a los pulsos de presión eran inhibidas debido a la presencia de GsMTx-4 en el medio. A partir de estos resultados los autores concluyeron que concentraciones micromolares de GsMTx-4 son capaces de inhibir los canales mecanosensibles PIEZO1 y PIEZO2 sin embargo los resultados obtenidos no les permitió determinar el mecanismo por el cual esta toxina es capaz de realizar la inhibición.

Posteriormente Reyes-Pardo y Sánchez-Herrera (2019) confirmaron que la interacción de la toxina GsMTx-4 con los lípidos que conforman las membranas afectan las propiedades mecánicas de estas, lo que a su vez podría alterar la apertura de los canales mecanosensibles; los autores observaron que la presencia de este péptido y otros inhibidores en el medio comprometen la membrana plasmática de las neuronas sensoriales al observar un incremento en el valor del módulo de Young, lo cual indica que la elasticidad de la membrana ha disminuido debido a las interacciones con estas moléculas. Sin embargo, al comparar los efectos de esta toxina con los de los otros inhibidores de canales mecanosensibles como el gadolinio y el rojo de rutenio, observaron que para éstos últimos dos, al aumentar la concentración de éstos, también aumenta el valor del módulo de Young; pero para la toxina GsMTx-4 se observa un comportamiento diferente, ya que a una concentración baja de 2.5 μM se observa un aumento en la rigidez de la membrana comparado con el control, no obstante, al aumentar la concentración a rangos de entre 5-10 μM , se observa que hay un decaimiento en el valor del módulo de elasticidad. Estos resultados indican que la interacción entre GsMTx-4 y la membrana es diferente a las interacciones de los otros dos inhibidores.

4.3.2. Mecanismo de interacción de la toxina GsMTx-4

Nishizawa y Nishizawa (2007) describen el mecanismo de interacción de GsMTx-4 con membranas lipídicas conformadas de fosfatidilcolinas a través de modelos de simulación de dinámica molecular. En este estudio concluyen que existen dos modos de interacción entre GsMTx-4 y las membranas: el modo superficial y el profundo. En el primero, todos los residuos cargados positivamente de la toxina interaccionan de manera superficial con la parte de los lípidos que se encuentra en la parte externa de la bicapa; mientras que en el modo profundo los residuos de lisina K-8 y K-28 de la toxina son capaces de interaccionar

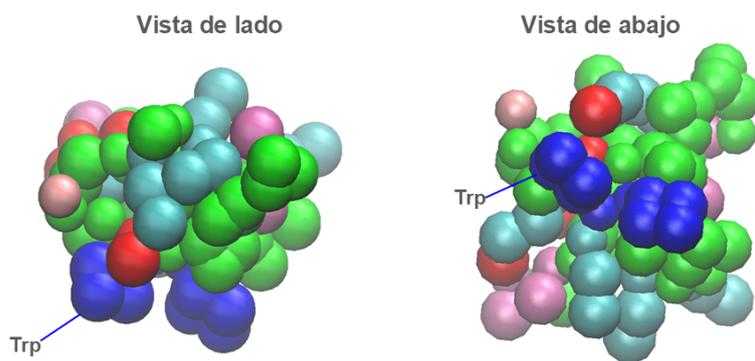


Figura 4: Estructura de la toxina GsMTx-4 utilizada para las simulaciones. Lado izquierdo vista lateral y lado derecho vista inferior. El triptófano (TRP) se presentan en color azul, los residuos hidrófobicos en color verde (GLY, LEU, PHE), los básicos en color cian (LYS y ARG), los polares en color rosa (CYS, ASN, SER) y los residuos ácidos en color rojo (ASP, GLU).

con los oxígenos pertenecientes a los grupos carbonilos de los lípidos que se encuentran en la parte interna de la bicapa.

De igual manera Nishizawa *et al.* (2015) describieron la importancia que tienen los residuos de lisina para que se pueda llevar a cabo la interacción de la toxina, ya que al mutar estos residuos por ácido glutámico y comparar sus interacciones con membranas de fosfatidilcolina por medio de simulaciones de dinámica molecular, encontraron que los residuos de lisina favorecen el ángulo de inclinación, la profundidad de penetración, el equilibrio entre las uniones y la interacción energética con las cabezas lipídicas.

Por último, Reyes-Pardo y Sánchez-Herrera (2019) reportaron que la interacción de esta toxina con las membranas se presentaba particularmente en neuronas IB4+, estas neuronas son neuronas sensoriales que se caracterizan por tener una membrana en cuya superficie están presentes carbohidratos, como la α -D galactosa encontrada en ciertos glicolípidos, y esto es lo que permite que se una la isolectina B4, la cual se usa como marcador para identificar células que contengan glicolípidos o glicoproteínas en su membrana (Stucky, 2007). Hasta el momento los estudios de dinámica molecular realizados para explicar el mecanismo de interacción de GsMTx-4 con membranas sólo se han realizado con

membranas modelo conformadas de fosfatidilcolinas, por lo que en este trabajo se busca observar si la composición de la membrana puede llegar a afectar la interacción de la toxina con la bicapa, más específicamente si la presencia de glicolípidos en las membranas modelo interfiere con esta interacción.

4.4. Composición de las membranas plasmáticas

Las membranas plasmáticas están compuestas tanto de lípidos como de proteínas, siendo su estructura principal una bicapa de fosfolípidos que tiene como función ser una barrera entre la célula y el ambiente, así como entre los compartimentos subcelulares (Harayama y Riezman. 2018); de igual manera en esta bicapa se encuentran proteínas transmembranales que llevan a cabo funciones específicas, como lo son el transporte selectivo de moléculas y el reconocimiento célula-célula (Cooper. 2000). Las membranas plasmáticas de las células animales están conformadas por 4 fosfolípidos principales, los cuales son: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y esfingomiélinea, estos lípidos constituyen más de la mitad de los componentes de la membrana; de igual manera en menor cantidad, se encuentran otros tipos de lípidos como los fosfatidilinositol, los glicolípidos y el colesterol. Algo a resaltar es que la bicapa lipídica está formada por una capa exterior y una capa interior, aunque los lípidos anteriormente mencionados se encuentran distribuidos en ambas capas, para la exterior se observa que hay un mayor número de fosfatidilcolinas, esfingomiélinea y glicolípidos, mientras que para la capa interior se compone principalmente de fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol (Cooper. 2000).

4.4.1. Glicolípidos

Las neuronas se caracterizan por ser uno de los pocos tejidos que contiene una alta concentración de glicolípidos en sus membranas, sin embargo aunque los glicolípidos son unas de las clases de lípidos más complejas, también son una de las menos estudiadas. Estos lípidos se caracterizan por tener un residuo de azúcar en su cabeza, siendo las más comunes la glucosa y galactosa, estas se encuentran unidas a una cadena de hidrocarburos, a un glicerol o a la esfingosina, sin embargo la mayoría de los glicolípidos encontrados en células animales se encuentran unidos a una esfingosina y son conocidos

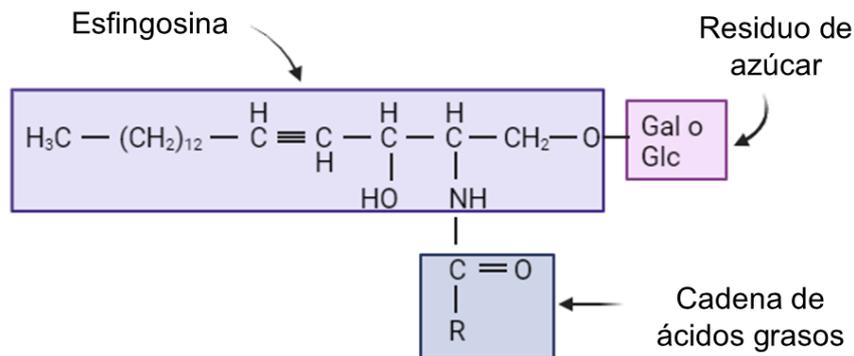


Figura 5: Estructura general de los esfingolípidos grupo al cual pertenece la galactosilceramida. Los esfingolípidos cuentan con tres partes importantes: un residuo de azúcar en la cabeza hidrofílica, una cadena de esfingosina y una cadena de ácidos grasos.

como esfingolípidos (Figura 5). Algunos tipos de esfingolípidos son la esfingomielina y los galactocerebrosidos; éstos se encuentran principalmente en las membranas de las neuronas y en la vaina de mielina que recubre los axones, desarrollan un papel importante para la transmisión de estímulos y el correcto funcionamiento de las neuronas (Hussain *et al.* 2019).

4.4.2. Función de los glicolípidos en el sistema nervioso

Existe una amplia variedad de glicolípidos y cada uno realiza un papel importante en los seres vivos. Los esfingolípidos y glicoesfingolípidos se encuentran en altas concentraciones en el sistema nervioso, debido a que son constituyentes fundamentales de las membranas neuronales donde se ha observado que tienen función estructural y de señalización, que permite que se lleven a cabo procesos biológicos importantes como son la comunicación célula-célula, adhesión celular, transducción de señales y el acomodo de proteínas. Aunque usualmente estos lípidos se presentan en pocas cantidades en las membranas plasmáticas, en ciertos tejidos y células altamente especializadas como lo son las células epiteliales, neuronas y mielinas su concentración molar alcanza hasta un 30% (Róg *et al.* 2007), de igual manera se ha observado que en las neuronas, el perfil de concentración de estos lípidos cambia continuamente conforme el cerebro del organismo se va desarrollando, lo

cual indica que los esfingolípidos y glicoesfingolípidos se ven involucrados en la diferenciación y el mantenimiento de las funciones neuronales. Entre los glicoesfingolípidos más comunes se encuentran las galactosilceramidas (GalCer), las cuales constituyen el 12% de concentración molar en la materia blanca del cerebro (Olsen y Færgeman. 2017).

4.4.3. Diferencias entre los glicolípidos y otros lípidos encontrados en membranas celulares

Otro de los lípidos que encontramos de manera esencial en todas las membranas celulares son los fosfolípidos pertenecientes a la familia de fosfatidilcolinas, estos lípidos constituyen un tercio de los lípidos que se encuentran en las membranas celulares y debido a esto son de gran importancia para mantener la estructura de las células. Lo que diferencia a los fosfolípidos de los glicolípidos son principalmente diferencias estructurales que permiten que cada uno realice una función diferente en las membranas plasmáticas (Hall *et al.* 2010). Una de las principales diferencias estructurales entre estos dos tipos de lípidos es la capacidad de formar puentes de hidrógeno con las moléculas adyacentes, la cual es mayor en los glicoesfingolípidos debido a que el carbohidrato presente en su estructura, le confiere seis sitios donadores de hidrógenos en sus grupos amino e hidroxilo, comparado con otros lípidos de membrana como son la esfingomielina y fosfatidilcolina, este número es significativamente alto, ya que la esfingomielina sólo cuenta con dos sitios donadores, mientras que los fosfatidilcolina no presenta sitios donadores. La formación de estos puentes de hidrógeno da como resultado membranas más gruesas y cohesivas (Saeedimagine *et al.* 2019).

5. Hipótesis

La presencia de glicolípidos en las membranas plasmáticas de las neuronas sensoriales afecta la unión de la toxina GsMTx-4.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Estudiar como la presencia de glicolípidos en las membranas modelo afecta a la unión de la toxina GsMTx-4.

6.2. Objetivos específicos

- Generar modelos de membranas lípidicas por medio de dinámica molecular.
- Comparar las interacciones de GsMTx-4 en modelos de membranas conformadas por glicolípidos y fosfatidilcolinas.
- Analizar como la presencia de GsMTx-4 cambia las propiedades de las membranas.

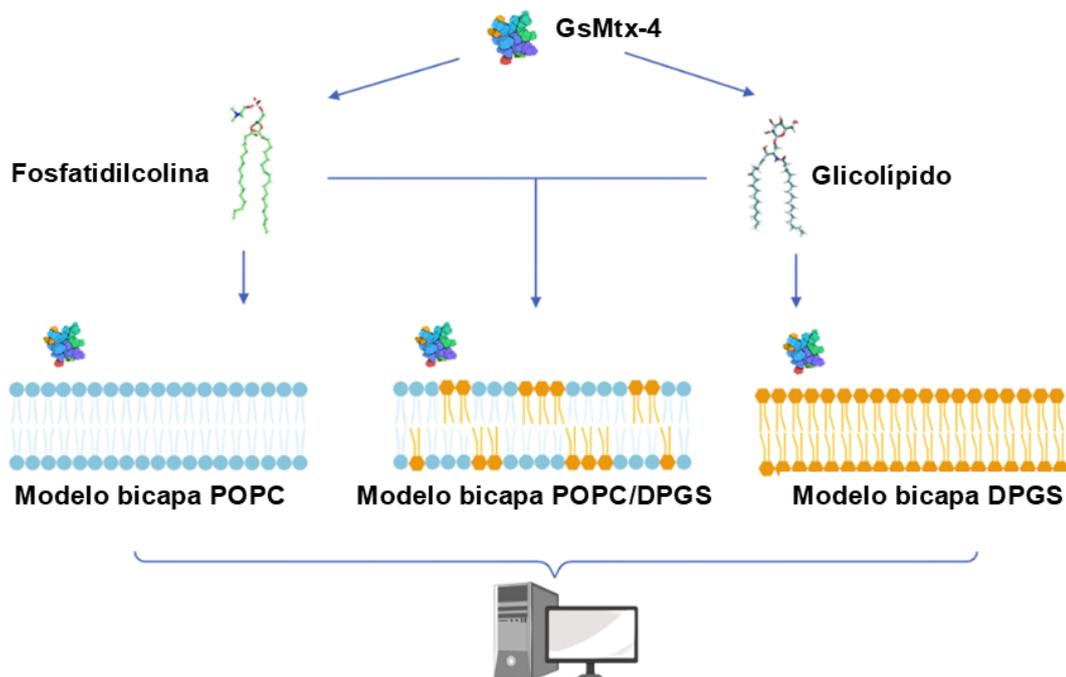


Figura 6: Representación del modelo experimental a realizar. La metodología general consiste en crear los sistemas de POPC, DPGS y la mezcla de ambos para posteriormente insertar la toxina y llevar a cabo las simulaciones de dinámica molecular.

7. Metodología

7.1. Estrategia experimental

En este estudio se busca describir si existe un cambio en el mecanismo de acción de GsMTx-4 dependiendo de la composición lipídica de las membranas, específicamente de si existe una diferencia cuando se presentan glicolípidos en las membranas. Para esto se partió de 3 modelos de bicapas: una compuesta únicamente de palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC) debido a que son los tipos de lípidos que se presentan en mayor cantidad en las membranas plasmáticas, otra únicamente de palmitoilgalactosilcerebrosido (DPGS), debido a que suelen presentarse en mayor concentración en las membranas de las neuronas y una conformada por estos dos lípidos, para conocer si la mezcla de ambos lípidos interfiere en la interacción con la membrana (Figura 6).

De igual manera para conocer si la interacción de la toxina con la membrana se ve afectada dependiendo del número de toxinas que se encuentren en el medio se realizaron simulaciones de dinámica molecular donde se introdujeron seis toxinas al medio y se

comparo su comportamiento con el de las simulaciones anteriormente realizadas.

7.1.1. Modelar las membranas mediante la interfaz gráfica de usuario basada en web con el campo de fuerza CHARMM

Se generaron 3 membranas a partir del modelado de grano grueso de Martini 2 utilizando diferentes concentraciones lipídicas, como se presenta en la tabla 1, de POPC y DPGS. Estas membranas fueron generadas por el programa CHARMM-GUI utilizando la opción *Martini Maker* y posteriormente la opción de *Bilayer Builder*. CHARMM-GUI es una interfaz gráfica basada en web que permite automatizar el proceso de generar bicapas lipídicas con o sin proteínas ancladas en estas (Jo *et al.* 2009), en este programa se especificaron el tipo y número de lípidos que forman la membrana que se busca generar, así como la forma de la caja en donde se ensamblará el sistema y la cantidad de moléculas de agua a utilizar; a partir de estos parámetros el programa fue capaz de determinar un aproximado del tamaño del sistema a modelar y procedió a generar la bicapa. De igual manera para neutralizar el sistema, el programa fue capaz de agregar una cantidad apropiada de iones basándose en una concentración previamente establecida por el usuario. Posteriormente la bicapa lipídica fue generada por medio del método de reemplazo, este método utiliza pseudoátomos similares a los lípidos para determinar la posición de éstos en el sistema y luego reemplaza estos pseudoátomos por los lípidos que conformaran el sistema (Jo *et al.* 2007); cuando la membrana a generar está compuesta de más de un tipo de lípido el acomodo de éstos se realiza de manera aleatoria. Por último, cada uno de los componentes generados se ensambló para formar el sistema que se busca simular, debido al costo computacional CHARMM-GUI no es capaz de realizar la equilibración y producción del sistema, en cambio proporciona los archivos de entrada para realizar estos procesos en GROMACS.

Para las 3 membranas se utilizó el campo de fuerza MARTINI 2.2 así como el modelo de una esfera no polar del agua. En el modelo de grano grueso pequeños grupos de átomos (3-4 átomos pesados) son agrupados en esferas que interactúan entre ellas por medio de potenciales empíricos. Las membranas fueron hidratadas con una capa de agua de 2.25 nm de grosor y se utilizó una concentración de 150mM de NaCl en forma de iones. Al terminar el ensamblaje de los sistemas, la hidratación de los sistemas de POPC, DPGS y

POPC/DPGS fue de 19, 21 y 20 moléculas de agua por cada lípido respectivamente.

Tabla 1: Descripción de los modelos de membrana generados para la simulación de dinámica molecular.

Membrana	Modelo	Composición
DPGS	Grano grueso	2048 DPGS
POPC	Grano grueso	2048 POPC
DPGS/POPC	Grano grueso	1024 DPGS/1024 POPC

7.1.2. Generar el campo de fuerza para la toxina GsMTx-4

Las coordenadas moleculares de la toxina GsMTx-4 fueron obtenidas del Protein Data Bank (ID:1TYK) a partir de lo reportado por Oswald *et al.* (2002) y se modificó el archivo PDB para eliminar las moléculas de agua presentes debido al proceso de cristalización al que se expuso el péptido para poder conocer su estructura tridimensional. Posteriormente a partir de este archivo por medio del código Martinize.py, escrito en el lenguaje de programación Python y proporcionado por MARTINI (Marrink *et al.* 2007), se generó la estructura y topología necesaria del péptido para realizar la simulación en grano grueso.

Una vez generados y equilibrados los sistemas, se colocaron las toxinas en la fase acuosa de cada una de las membranas modelo, alineando el plano de la molécula con el plano de la membrana.

De acuerdo a lo discutido por Reyes-Pardo y Sánchez-Herrera (2019), conforme aumenta la concentración de la toxina, su interacción con la membrana puede variar debido a que aumentaría la probabilidad de que las moléculas de toxinas interaccionen entre ellas mismas y esto ocasiona que interaccionen menos con la membrana, haciendo de esta forma que ya no presente un alto nivel de tensión. Para corroborar esto de manera computacional, se plantearon dos modelos experimentales para analizar como la concentración de GsMTX-4 puede afectar en la interacción de la toxina con las diferentes membranas, los cuales fueron: un sistema con una toxina en el medio y un sistema con seis toxinas en el medio.

7.2. Simulación de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular consistieron en cuatro pasos principales: la preparación del sistema, minimización de la energía, equilibración del sistema y producción del sistema. El paso de preparación fue realizado previamente con ayuda del programa CHARMM-GUI y los archivos obtenidos en este paso fueron utilizados en GROMACS versión 2019.6 (Lindahl *et al.* 2020) para realizar los demás pasos de la simulación.

7.2.1. Preparación del sistema

Habiendo previamente generado los modelos de membrana y la topología de la toxina, se insertó el péptido en el medio donde se encuentra la membrana, para esto se utilizó el comando *gmx insert molecule*, el cual permite sustituir las moléculas de agua que se encuentran en el medio por la molécula seleccionada para insertar, la cual en este caso es la proteína GsMTx-4.

Cómo se mencionó anteriormente para verificar si el aumento de toxinas en el medio afecta su interacción con la membrana se llevaron a cabo diferentes simulaciones variando el número de toxinas insertadas. Las primeras tres membranas modelo fueron simuladas con una sola toxina en el medio y posteriormente estas mismas membranas se simularon insertando ahora seis toxinas en el medio.

7.2.2. Minimización de energía

Una vez que se cuenta con el sistema solvatado, neutralizado y ensamblado se debe de asegurar que éste no presente una geometría inapropiada o choques estéricos y para esto la estructura debe de ser relajada por un proceso llamado minimización de energía (Lemkul. 2018).

Para la minimización de energía del sistema se partió del archivo de extensión *pdb* obtenido de CHARMM-GUI que contiene las coordenadas del sistema, este archivo se convirtió a un archivo de extensión *gro* para poder ser trabajado en GROMACS. Aunque el objetivo de la minimización es llegar a una molécula que se encuentre en el mínimo de energía global esto a nivel computacional es complicado y costoso, por lo que los algoritmos utilizados llegan a un mínimo local lo suficientemente estable para evitar que

existan choques estéricos entre los átomos y que esto permita realizar la simulación del sistema (Gautam. 2021). El algoritmo utilizado para llevar a cabo la minimización de energía es conocido como *steepest descent* o descenso más empinado en español, el cuál calcula el mínimo de energía al alterar las coordenadas del sistema en un rango de tiempo determinado, lo que se le conoce como paso, el algoritmo decide el tamaño del paso dependiendo de la energía potencial de superficie inicial y lo va cambiando conforme avanza la minimización hasta alcanzar una energía mínima lo suficientemente estable para generar la simulación (Zimmerman. 1991).

Al terminar este paso se obtuvieron 4 archivos de salida importantes: los archivos de extensión log,edr, trr y gro, que contienen la información de todos los parámetros utilizados y procesos que se llevaron a cabo durante la minimización de energía, un archivo binario que contiene todos los términos de energía colectados por GROMACS durante el análisis, la trayectoria del sistema y las coordenadas de la estructura después de realizar la minimización de energía, respectivamente.

Para verificar que la minimización de energía se haya realizado de manera exitosa, se realizó un análisis del archivo de extensión edr que contiene la información del potencial de energía que se alcanzó en cada paso de la minimización, para llevar a cabo el análisis de este archivo primero se generó un archivo de extensión xvg para posteriormente graficar los datos obtenidos utilizando la herramienta Xmgrace. La minimización de energía se realizó de manera correcta ya que fue posible continuar sin problema los demás pasos.

7.2.3. Equilibración del sistema

El paso de minimización de energía proporciona una estructura razonable en términos de la geometría y orientación del sistema, sin embargo para poder realizar la simulación debe ser llevada a cabo en condiciones similares a lo experimental. Para poder llevar a cabo este paso se hizo uso de los ensambles termodinámicos también conocidos como ensambles estadísticos, los cuales son un conjunto de sistemas termodinámicos que tienen en común ciertos atributos macroscópicos (Han. 2016).

La equilibración se llevó a cabo en dos fases, cada una realizada en un ensamble termodinámico diferente. En la primera fase se utilizó el ensamble canónico o NVT, donde tres parámetros del sistema se encuentran constantes durante el tiempo de simulación,

estos parámetros son el número de partículas (N), el volumen (V) y lo más importante la temperatura (T), este paso estabilizó la temperatura del sistema. La segunda fase permitió estabilizar la presión, utilizando un ensamble isotérmico-isobárico o NPT, donde el sistema presenta una temperatura constante lo que lo vuelve isotérmico y una presión constante por lo tanto es isobárico. Este ensamble asegura que el sistema tenga la densidad correcta para poder realizar el paso de la producción, así mismo permite representar la realidad experimental ya que éstos suelen realizarse a una presión atmosférica y temperatura ambiente (Zheng *et al.* 2018).

Para el ensamble NPT los parámetros utilizados fueron una presión de 1 bar que concuerda con la presión normal de la células y una temperatura de 340 K, la cual es considerada una temperatura alta para una célula animal, sin embargo en la dinámica molecular para obtener membranas en fase fluida similares a las membranas plasmáticas de las células se debe de tomar en cuenta la temperatura de transición de los lípidos utilizados, aquí debido a que se utilizaron dos lípidos diferentes se va a trabajar con la temperatura de transición más alta el cual es el caso de la temperatura para DPGS, la cual según lo que reporta López *et al.* (2013) es de 330 K y para asegurar que todos los lípidos se encontraran en fase fluida se trabajó con una temperatura 10 grados K más elevada.

El tiempo determinado para realizar estas simulaciones es menor que el tiempo necesario para realizar la minimización y la producción del sistema ya que sólo se busca que las partículas de agua y los iones se equilibren alrededor del sistema. Para verificar que este paso se haya realizado de manera adecuada se graficaron los archivos de extensión *edr* donde se observó como cambia tanto la temperatura como la presión del sistema durante el tiempo de simulación obteniendo que estas se encuentran entre los rangos posteriormente preestablecidos.

7.2.4. Producción del sistema

Éste es el último paso en la simulación donde ya se cuenta con un sistema bien definido y equilibrado, por lo que sólo falta recolectar los datos de interés acerca del sistema. Las diferencias entre el paso de equilibración y producción son mínimas: en este paso no se presentaron restricciones en las posiciones de los átomos, se realizó en un ensamble NPT,

utilizando los parámetros previamente establecidos, y la simulación se realizó en un mayor tiempo, el cuál en este caso fue de 1 μ s por sistema, exceptuando el sistema mezcla, el cual se corrió una simulación de 2 μ s ya que los resultados del análisis a 1 μ s sugerían que este sistema todavía no se encontraba en equilibrio (Kukol. 2008).

Al terminar la simulación se obtuvo un archivo de extensión trr que contiene la trayectoria del sistema; esta trayectoria describe el movimiento y comportamiento del sistema cuando se encuentra en las condiciones establecidas anteriormente y es a partir de esta trayectoria que se partió para realizar el análisis de las propiedades del sistema. Para visualizar el resultado final de las simulación se utilizaron softwares como VMD (Humphrey *et al.* 1996), donde se cargan los archivos que contienen tanto las coordenadas finales del sistema así como la trayectoria de éste.

7.3. Análisis de las propiedades del sistema

Una vez realizada la simulación se procedió a hacer un análisis del sistema obtenido, entre las propiedades analizadas se encuentran: el área por lípido, el ancho de membrana, el parámetro de orden, el perfil de densidad, la función de distribución radial, la difusión lateral y el centro de masa. Para realizar estos análisis se utilizaron principalmente los archivos que contienen tanto las coordenadas del sistema como la trayectoria de éste a través del tiempo. El análisis de las propiedades del sistema se realizó a partir de los datos obtenidos en los últimos 100 ns de simulación.

El área por lípido se obtuvo multiplicando las dimensiones x/y de la caja de simulación y dividiéndolo por el número de lípidos presentes en cada una de las capas de la membrana. El ancho de membrana se calculó como la distancia entre los fosfatos de las cabezas lipídicas en el perfil de densidad electrónica. Los cálculos del área por lípido como el ancho de membrana se realizaron usando la librería *lipophilic* en el programa Python, que permitió identificar el número de lípidos en cada capa.

El orden de las cadenas lipídicas se obtuvo por medio del parámetro de orden, éste es una medida de orientación relativa de los enlaces C-H con respecto a la normal de la bicapa lipídica y se representa con la ecuación:

$$S_C = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta_i - 1 \rangle$$

Donde θ es el ángulo entre la normal de la bicapa y el vector que une a C-H. Para calcular este parámetro se utilizó el script `do-order-gmx` proporcionado por MARTINI (Marrink *et al.* 2007) y escrito en el lenguaje Python, con el cual a partir de los archivos de trayectoria `xtc` y las coordenadas del sistema se logró calcular el orden que presentan los carbonos que se encuentran presentes en las colas de los lípidos.

El perfil de densidad se define como el medir la probabilidad de que un electrón se encuentre en una ubicación específica. Para este análisis se calculó la distribución z de los electrones promediada en el tiempo de simulación, y esto puede ser evaluado con precisión debido a que se conocen todas las posiciones atómicas del sistema (Moradi *et al.* 2019.). Para este análisis se tomaron en cuenta los átomos que conforman las cabezas lipídicas, la parte media de los lípidos y las colas lipídicas.

La función de distribución radial es uno de los parámetros más importantes al estudiar membranas lipídicas, sobre todo cuando estas están siendo probadas con una droga o toxina, éste calcula la probabilidad de encontrar cierta molécula a una distancia determinada de la molécula estudiada (Kabedev, Hossain y Larsson. 2024.). En este caso se estudió la distancia entre las cabezas lipídicas, más específicamente entre los átomos PO4 para POPC y C3 para DPGS (Figuras 27 y 28 de la sección Anexos), tanto en las membranas compuestas únicamente de estos lípidos como en la mezcla; así mismo también se midió la distancia que existe entre estos átomos y el aminoácido triptófano que se encuentra en la estructura de GsMTx-4 y por último se midió la distancia entre este aminoácido y las moléculas de agua que se encuentran cercanas a éste.

La difusión lateral es un proceso estudiado en las membranas plasmáticas donde los lípidos que componen estas tienden a moverse de manera lateral siempre y cuando éstos no dependan de una interacción directa con alguno de los otros componentes de la membrana, esto es debido al comportamiento fluido que presentan la mayoría de las membranas. Para calcular la difusión lateral de una membrana simulada con dinámica molecular se utiliza la siguiente ecuación:

$$D_T = \lim_{x \rightarrow \infty} \frac{1}{4tN} \sum_{i=1} \langle [\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(o)]^2 \rangle$$

Donde r_i es la posición del centro de masa de la molécula i a un tiempo t . Al realizar el seguimiento de las posiciones de las moléculas que se encuentran en ambas capas de

las membranas se puede calcular el coeficiente de difusión lateral de cada una de estas (Moradi, Nowroozi y Shahlaei. 2019). Aquí se calculó y gráfico el valor de la difusión lateral para los lípidos POPC y DPGS tanto en las membranas formadas únicamente por éstos así como en la mezcla.

Por último se gráfico el centro de masa de la toxina o toxinas y como éste cambiaba conforme avanzaba la simulación. El centro de masa se refiere al promedio de posiciones de las masas de todos los átomos que componen una molécula (GROMACS, *s.f.*); por lo cual el calcular y graficar este valor nos permitirá observar de forma gráfica donde se encuentra la toxina y si ésta se encuentra interaccionando con alguna de las capas que componen a la membrana. Se debe de aclarar que para calcular la densidad, la distribución radial, la difusión lateral y el centro de masas se utilizaron los comandos específicos de GROMACS los cuales se pueden encontrar en la documentación de GROMACS en <https://manual.gromacs.org/>.

8. Resultados

8.1. Simulación de dinámica molecular de los sistemas

Se simularon los tres diferentes tipos de membrana como se muestra en la figura 7, donde se observan los tres diferentes sistemas una vez que se realizó la equilibración de las membranas y se insertó una toxina en el medio. A diferencia de las membranas de sólo POPC y DPGS, la membrana de la mezcla de lípidos presenta una marcada curvatura en su estructura, la cual podría implicar que las interacciones que existen entre los dos lípidos pueden causar curvatura en la bicapa.

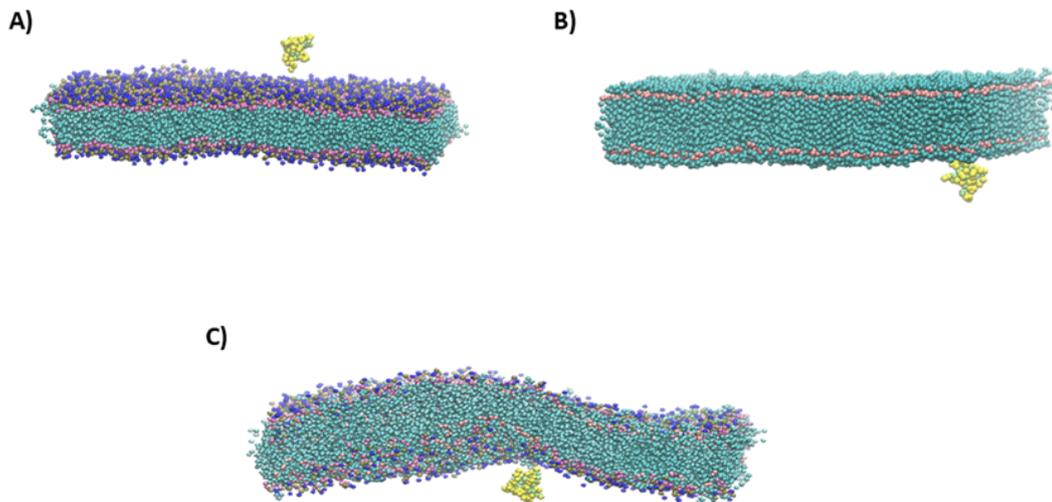


Figura 7: Imagen representativa de como se encuentran los modelos de membrana simulados en presencia de una toxina GsMTx-4 antes de iniciar la simulación de dinámica molecular. A) Vista lateral de la membrana de POPC con una toxina en el medio. B) Vista lateral de la membrana de DPGS con una toxina en el medio. C) Vista lateral de la membrana conformada por la mezcla de POPC y DPGS con una toxina en el medio.

Por otro lado en la figura 8 se observan los tres diferentes sistemas pero ahora incluyendo 6 moléculas de toxina en el medio, insertando tres toxinas por cada una de las capas de la membrana, superior e inferior, de tal forma que se encuentren lo más cercanas posibles.

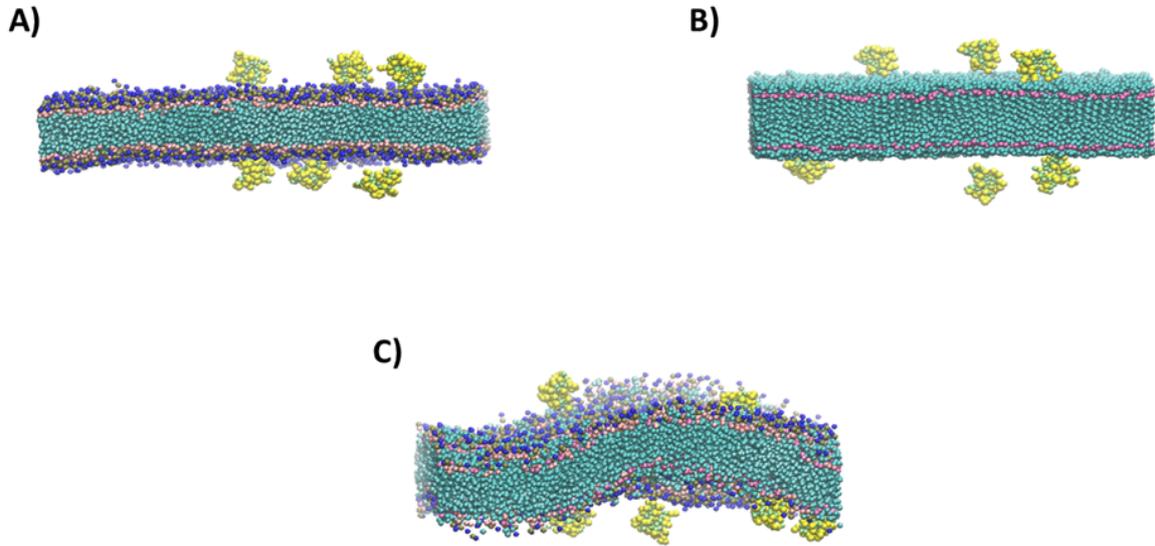


Figura 8: Imagen representativa de como se encuentran los modelos de membrana simulados en presencia de seis toxinas GsMTx-4 antes de iniciar la simulación de dinámica molecular. A) Vista lateral de la membrana de POPC con seis toxinas en el medio. B) Vista lateral de la membrana de DPGS con seis toxinas en el medio. C) Vista lateral de la membrana conformada por la mezcla de POPC y DPGS con seis toxinas en el medio.

En las figuras 9 y 10 se visualizan los sistemas a la mitad del tiempo de simulación y al final de ésta para los casos de una y seis moléculas de toxinas respectivamente. Para los sistemas con una sola toxina (Figura 9) se encontró que la toxina interacciona de manera más profunda con la membrana formada por la mezcla de lípidos, seguida de la membrana de DPGS puro y por último con la membrana de POPC, posteriormente estas observaciones fueron corroboradas al realizar los análisis de las propiedades de la membranas.

Por otro lado, para los sistemas con 6 toxinas (Figura 10) se observó que en la membrana de POPC puro las toxinas tienen una mayor interacción entre ellas formando un agregado, el cuál interacciona de forma superficial con la membrana, mientras que para el sistema de mezcla de lípidos aunque a lo largo de la simulación si se llegan a observar agregados, éstos son menos y algunas de las toxinas se encuentran interactuando de forma individual con la membrana en un interacción profunda y para la bicapa de DPGS no

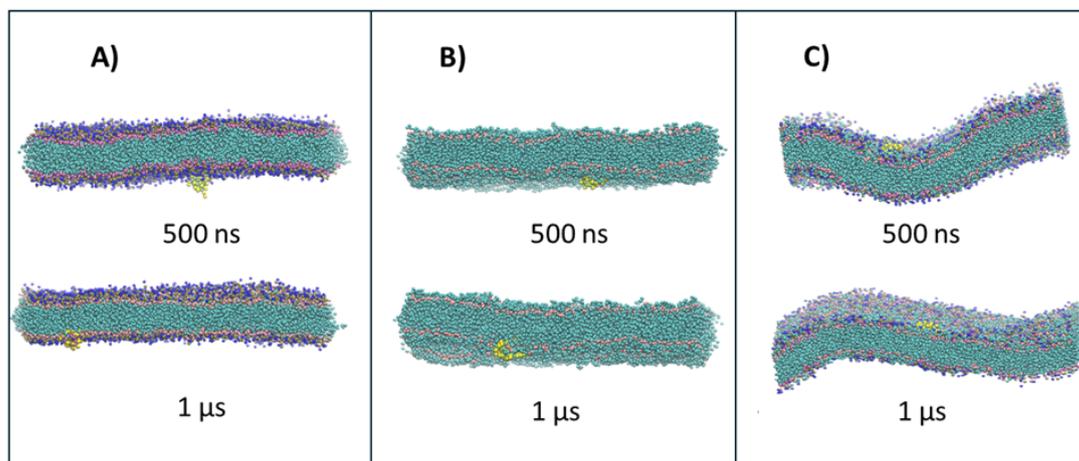


Figura 9: Comparativa de los sistemas con una molécula de toxina simulados a 500 ns y a 1 μ s. A) Vista lateral del sistema de POPC con una toxina a los 500 ns de simulación y a 1 μ s de simulación. B) Vista lateral del sistema de DPGS con una toxina a los 500 ns de simulación y a 1 μ s de simulación. C) Vista lateral del sistema de la mezcla de POPC y DPGS con una toxina a los 500 ns de simulación y a 1 μ s de simulación.

se observan agregados y cada una de las toxinas interacciona de manera profunda con la membrana.

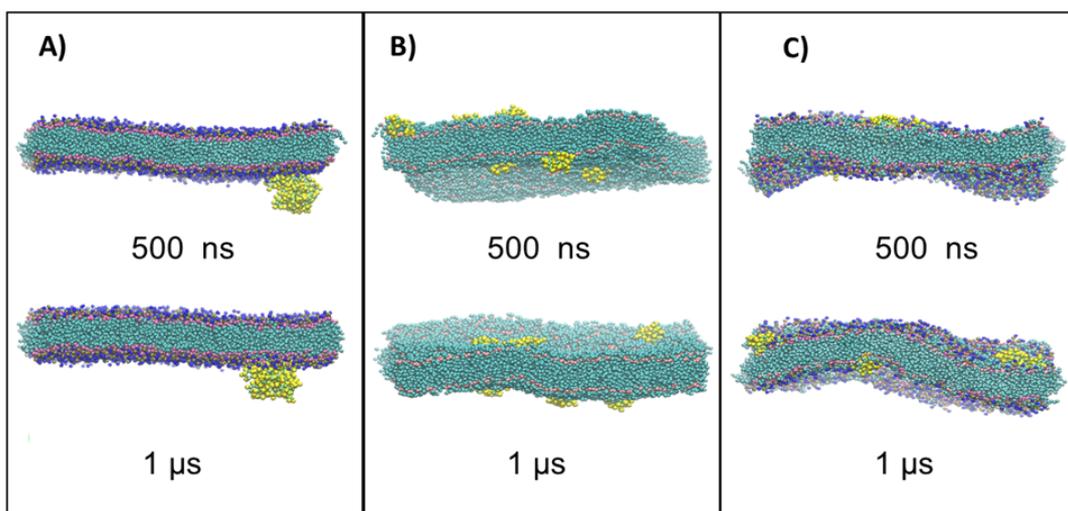


Figura 10: Comparativa de los sistemas con seis moléculas de toxinas simulados a 500 ns y a 1 μ s. A) Vista lateral del sistema de POPC con seis toxinas a los 500 ns de simulación y a 1 μ s de simulación. B) Vista lateral del sistema de DPGS con seis toxinas a los 500 ns de simulación y a 1 μ s de simulación. C) Vista lateral del sistema de la mezcla de POPC y DPGS con seis toxinas a los 500 ns de simulación y a 1 μ s de simulación.

En la figura 11 se muestra una vista superior de la capa de la membrana donde se puede apreciar con que tipo de lípido se encuentra interactuando principalmente la toxina en las capas de la membrana formada por la mezcla de lípidos, aquí los lípidos de DPGS se representan en color morado y los lípidos de POPC en color azul. La figura 11A corresponde a la simulación del sistema con una sola toxina donde ésta se encuentra interaccionando únicamente con la capa inferior de la membrana y se puede observar que a lo largo de la simulación esta toxina tiende a encontrarse rodeada de lípidos de DPGS. Lo mismo sucede para el sistema que contiene seis toxinas, figura 11B, donde la imagen del lado izquierdo corresponde a la capa superior de la membrana y se puede observar como las cuatro toxinas que se encuentran interaccionando con la membrana también son rodeadas principalmente por lípidos DPGS, este comportamiento se presenta de igual manera en la interacción de las dos toxinas con la capa inferior de la membrana en la imagen del lado derecho.

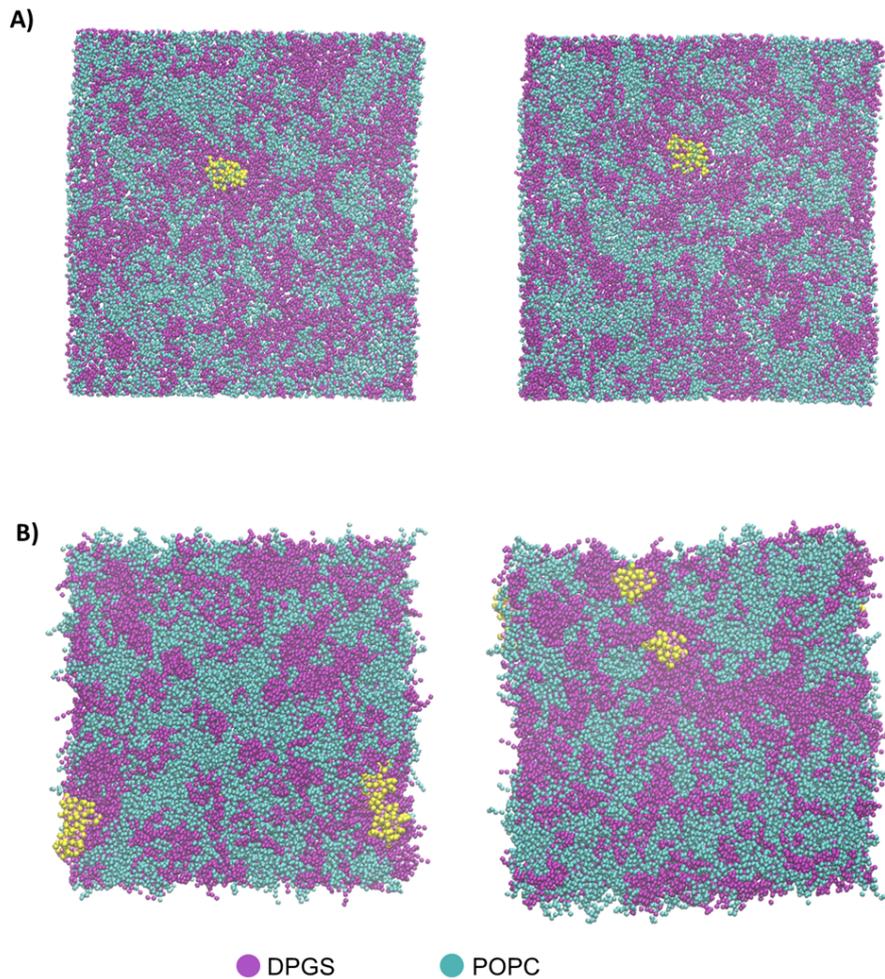


Figura 11: Vista superior de las capas de la membrana mezcla donde se encuentra interactuando la toxina. A) Sistema de la mezcla de lípidos donde se encuentra interactuando una sola toxina a los 500 ns (izquierda) y a 1 μ s (derecha) B) Sistema de la mezcla de lípidos donde se encuentran interactuando seis toxinas, cuatro con la capa superior (izquierda) y dos con la capa inferior (derecha) a 1 μ s de tiempo de simulación.

8.2. Área por lípido y ancho de membrana

Para determinar el efecto que tiene en las membranas la inclusión de las toxinas, se obtuvo el parámetro de área superficial que ocupa cada lípido en la capa de la membrana. En la figura 12 y tabla 2 se muestran los resultados del análisis de área por lípido de las tres membranas, en unidades de nm^2 , calculado para cada una de las variaciones de los tres tipos de membranas. En la gráfica se muestra cada una de las diferentes membranas con sus respectivos 3 grupos experimentales: sin toxina, con una toxina y con seis toxinas. Para conocer si existía diferencia significativa entre los grupos experimentales se realizó primero una prueba de ANOVA y en caso de obtener un p-value menor a 0.05, que indica que si existe diferencia en alguno de los grupos, se realiza una prueba de Tuckey para comparar cada grupo y conocer cuales son los que presentan diferencia significativa entre si; se marcó con asterisco los grupos que presentaban diferencias significativas según lo obtenido en la prueba de Tuckey. Para realizar estos análisis se tomo como grupo muestra los valores obtenidos en los últimos 100 ns del tiempo de la simulación. El sistema donde se observó diferencia significativa fue en la membrana formada por la mezcla de lípidos, aquí los grupos que presentan diferencia significativa entre sí según la prueba de Tuckey son el grupo de sin toxina y el grupo de seis toxinas.

Tabla 2: Promedio del área por lípido de los sistemas formados por POPC, DPGS y la mezcla de ambos lípidos.

Membrana	Sin toxina	Una toxina	Seis toxinas
POPC	0.693 ± 0.0034	0.693 ± 0.0039	0.693 ± 0.0030
DPGS	0.571 ± 0.0042	0.572 ± 0.0060	0.572 ± 0.0041
DPGS/POPC	0.581 ± 0.0113	0.594 ± 0.0089	0.579 ± 0.0104

De igual manera se obtuvo el parámetro del ancho de las membranas los cuales se muestran en la figura 13 y tabla 3. En esta gráfica se muestran los valores del promedio del ancho de membrana, en unidades de nm , correspondientes a cada una de las membranas modeladas. Al igual que en la figura anterior en cada membrana se cuenta con tres grupos experimentales: sin toxina, con una toxina y con seis toxinas. Para conocer si existe

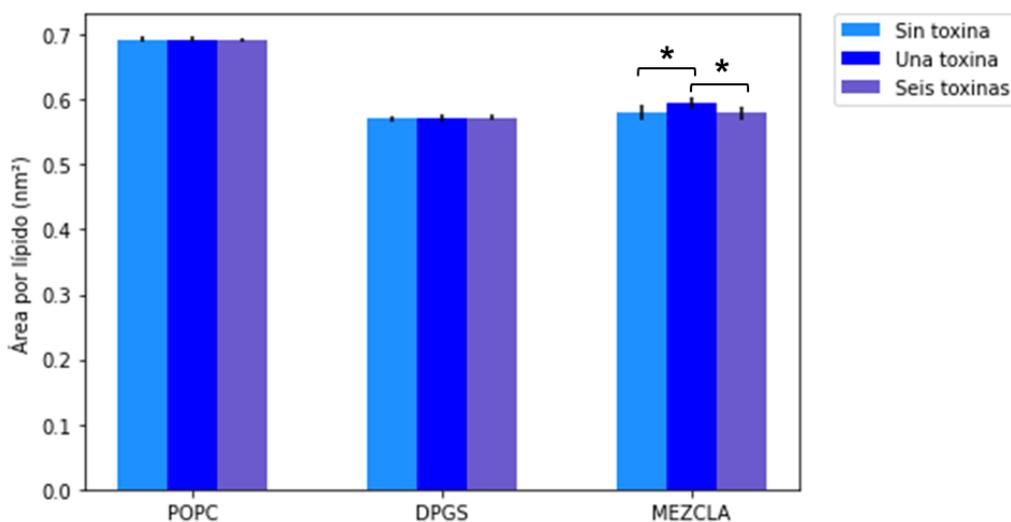


Figura 12: Gráfica del promedio del área por lípido \pm la desviación estándar de los tres sistemas y de los diferentes grupos experimentales: sin toxina, con una toxina y con 6 toxinas. Se realizaron dos pruebas diferentes para conocer si existía diferencia significativa entre los grupos la primera siendo la prueba de ANOVA seguida por una prueba de Tuckey; los asteriscos representan que existe diferencia significativa entre los grupos. En la membrana conformada por la mezcla de lípidos en el ANOVA se obtuvo un p-value de 0.008 y en la prueba de Tuckey un p-value de 0.011 entre el grupo sin toxina y el grupo de una toxina, y un p-value de 0.028 entre el grupo con una toxina y el grupo con seis toxinas.

diferencia significativa entre los tres grupos experimentales se realizó una prueba ANOVA y en caso de que se obtuviera un p-value menor a 0.05 se procedió a realizar una prueba de Tuckey la cual permitió identificar cual de los tres grupos presentaba la diferencia significativa con respecto a los demás; al igual que en el parámetro anterior para estos análisis se tomo como grupo muestra los valores obtenidos en los últimos 100 ns del tiempo de la simulación. Los resultados obtenidos muestran que existe una diferencia significativa entre los grupos de una toxina y de seis toxinas para el sistema conformado por la mezcla de lípidos.

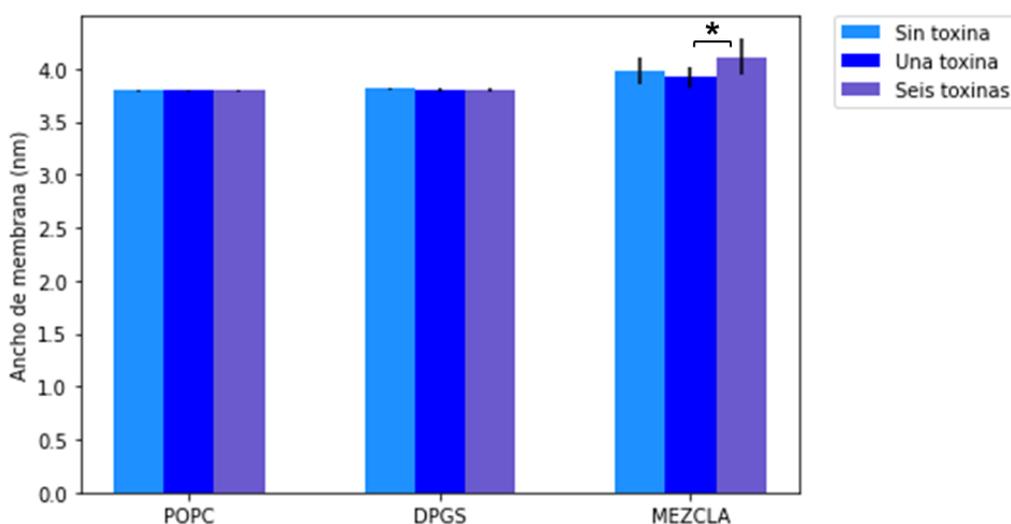


Figura 13: Gráfica del promedio del ancho de membrana \pm la desviación estándar de los tres sistemas y de los diferentes grupos experimentales: sin toxina, con una toxina y con 6 toxinas. Se realizaron dos pruebas diferentes para conocer si existía diferencia significativa entre los grupos la primera siendo la prueba de ANOVA seguida por una prueba de Tuckey; los asteriscos representan que existe diferencia significativa entre los grupos. En la membrana de la mezcla de lípidos en el ANOVA se obtuvo un p-value de 0.018 y en la prueba de Tuckey se obtuvo un p-value de 0.015 entre el grupo de una toxina y el grupo de seis toxinas.

Tabla 3: Promedio del ancho de membrana de los sistemas formados por POPC, DPGS y la mezcla de ambos lípidos.

Membrana	Sin toxina	Una toxina	Seis toxinas
POPC	3.79 \pm 0.014	3.79 \pm 0.014	3.79 \pm 0.014
DPGS	3.81 \pm 0.014	3.80 \pm 0.019	3.80 \pm 0.014
DPGS/POPC	3.98 \pm 0.132	3.92 \pm 0.101	4.11 \pm 0.170

8.3. Perfil de densidad

Las figuras 14, 15 y 16 muestran los resultados obtenidos al graficar el perfil de densidad de las tres membranas, cada una con sus respectivos tres grupos de sin toxina (A), con una toxina (B) y con seis toxinas (C). En estas gráficas el eje horizontal se muestran

las coordenadas de la caja de simulación donde se encuentra el sistema, siendo el 0 el principio de la caja y dependiendo del tamaño de ésta las coordenadas pueden llegar hasta valores de 10 o 12 nm y en el eje vertical se muestran los valores de densidad. Aquí se midió la densidad de las cabezas lipídicas, las cuales para POPC se conforman de una colina y un grupo fosfato y para DPGS por una galactosa, representadas en color verde; la parte media del lípido, que para POPC se encuentra conformada por un glicerol y para DPGS los átomos de oxígeno que conectan las cabezas hidrofílicas con las cadenas hidrofóbicas, representada en color morado; las colas lipídicas, que están formadas por átomos de carbono, representadas en color rojo; las moléculas de agua, representadas en color azul y la toxina, representada en color marrón. Para visualizar de manera gráfica los átomos que conforman estos lípidos redirigirse a las figuras 27 y 28 de la sección de Anexos. Como la membrana mezcla presenta dos lípidos diferentes aquí las cabezas lipídicas de POPC se encuentran representadas en color verde y las de DPGS en color azul claro; la parte media de POPC se representa de color morado y la de DPGS en color azul y por último las colas lipídicas de POPC se representan en color rojo y las de DPGS en color café; al igual que en los otros sistemas la toxina se visualiza en color amarillo, para este sistema no se graficaron las moléculas de agua. Este análisis muestra un comportamiento esperado para las membranas de POPC y DPGS puro (figuras 14 y 15), donde se observa que la mayor densidad de los átomos que componen las cabezas lipídicas se encuentran en la parte exterior de las bicapas, ya que son hidrofílicas, seguidos por los picos de densidad para los átomos que componen la parte media del lípido y por último el perfil de densidad de los carbonos que componen las colas lipídicas, donde también se observa una disminución total del perfil de densidad de las moléculas de agua debido a que esta es la parte hidrofóbica de la membrana; de igual manera este comportamiento se mantiene sin importar la cantidad de toxina en el medio.

Para el caso de la mezcla (figura 16) observamos una tendencia donde la densidad para los átomos que componen las cabezas de los lípidos de DPGS tiende a encontrarse en mayor proporción en una de las capas de la membrana; también se observa que cuando una sola toxina está presente en el medio, los picos tienden a cambiar, encontrando el mayor pico de densidad de las cabezas y parte media de DPGS en la capa donde se encuentra interaccionando la toxina y el mayor pico de densidad de las cabezas y parte

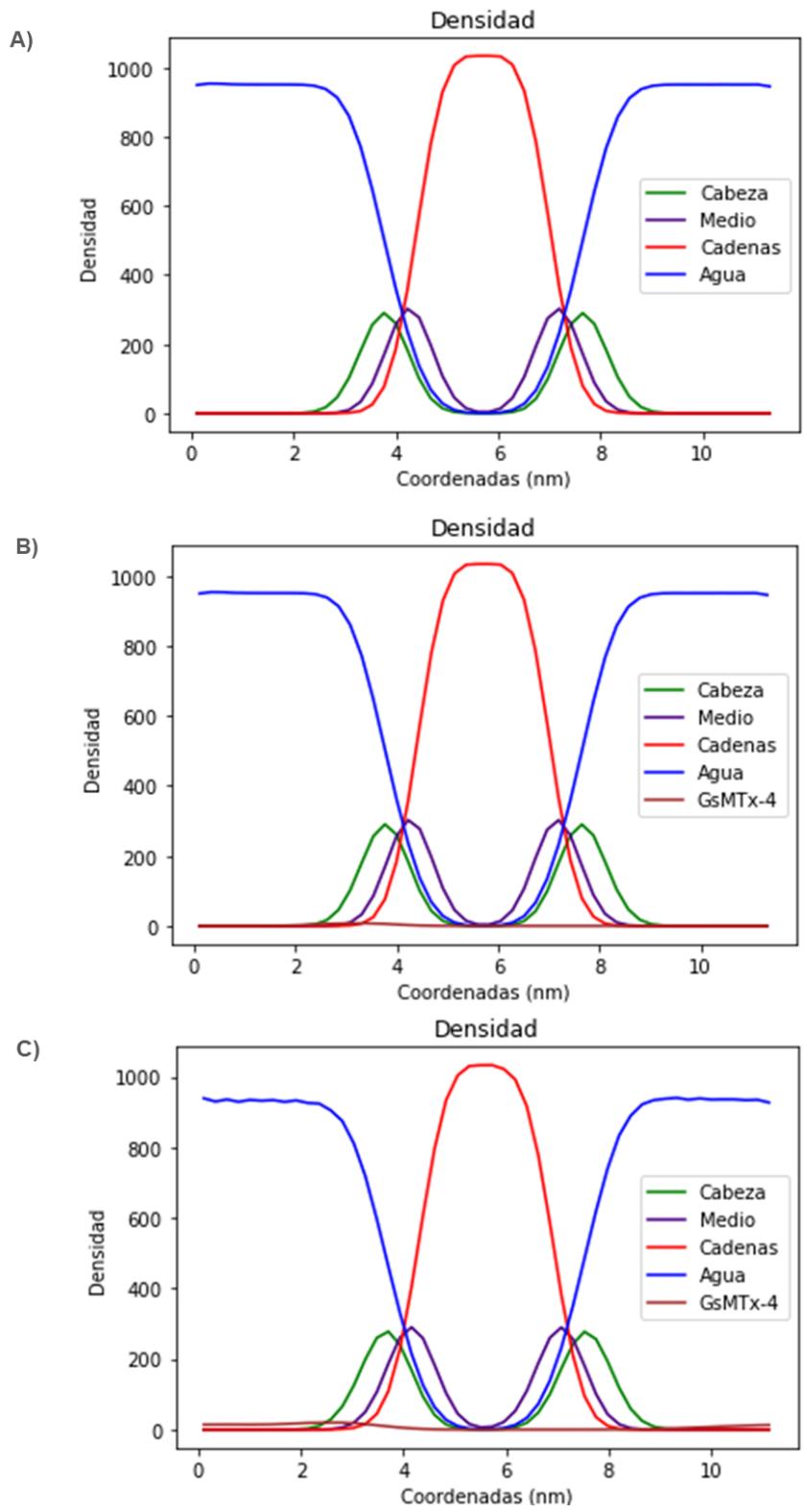


Figura 14: Perfil de densidad de las membranas de POPC. A) Sin toxina. B) Con una toxina. C) Con 6 toxinas.

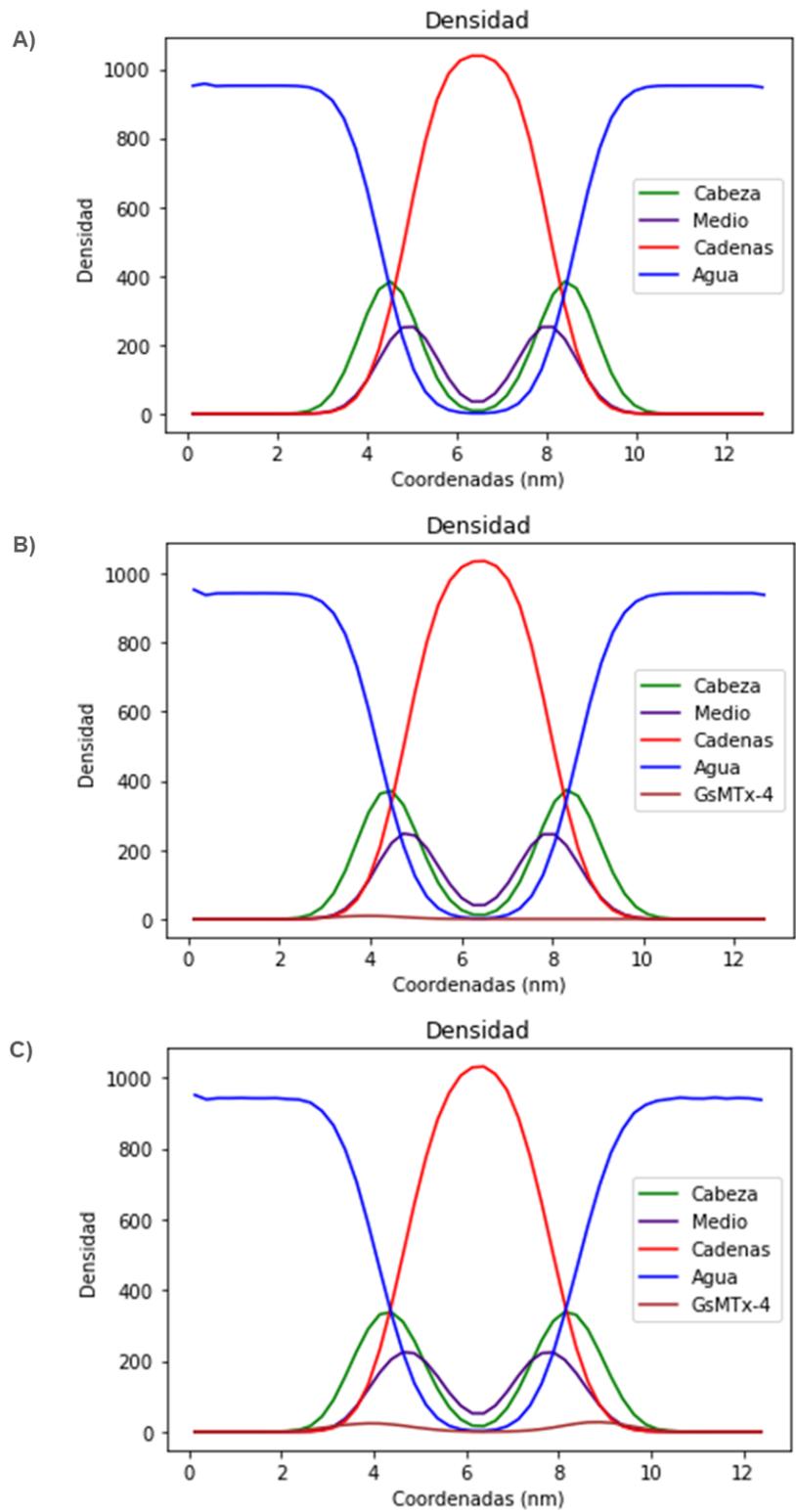


Figura 15: Perfil de densidad de las membranas de DPGS. A) Sin toxina. B) Con una toxina. C) Con 6 toxinas.

media de POPC en la capa opuesta.

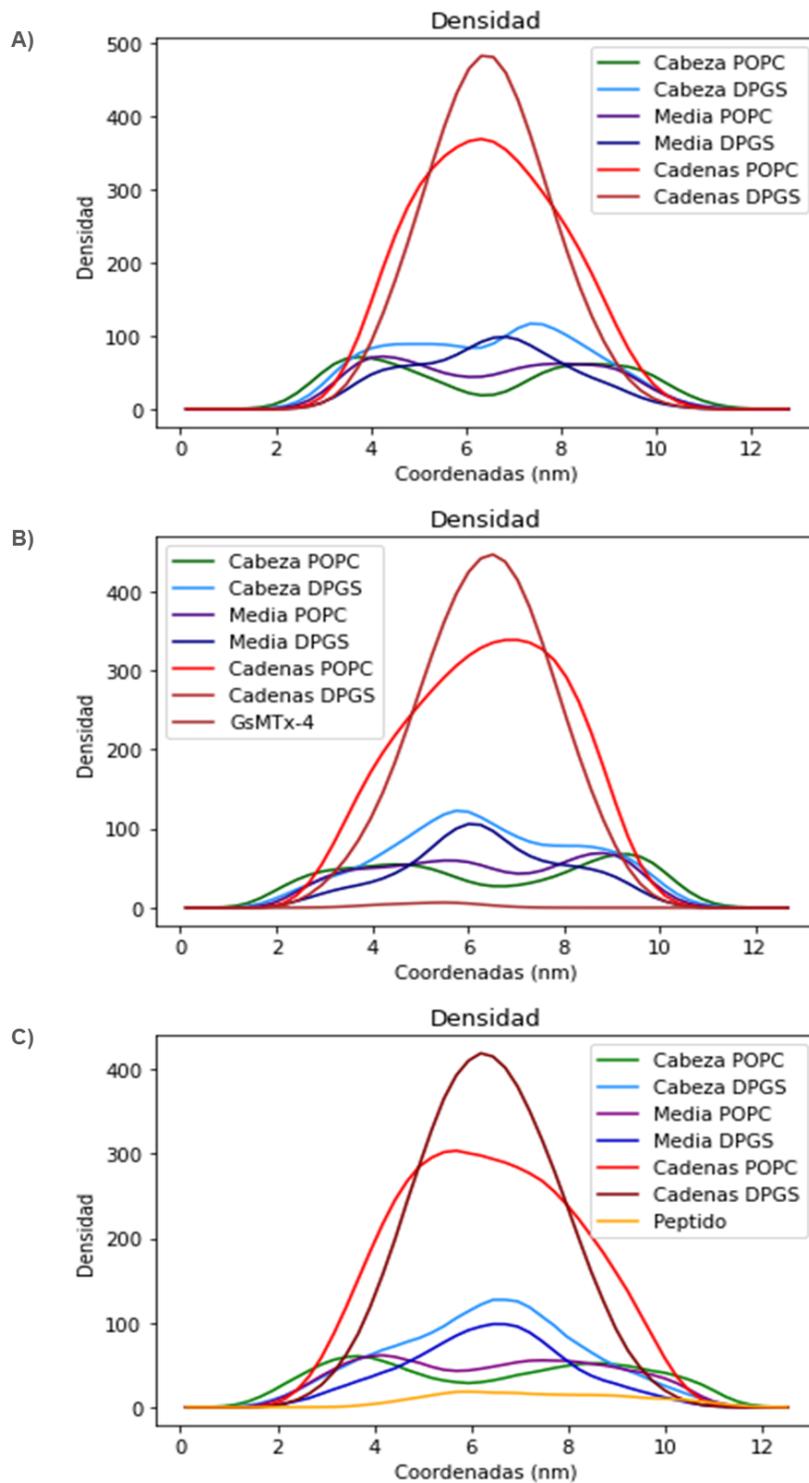


Figura 16: Perfil de densidad de las membranas compuestas por la mezcla de POPC y DPGS. A) Sin toxina. B) Con una toxina. C) Con 6 toxinas.

En la figura 17 se graficó la densidad de las toxinas en cada sistema, de color verde

las toxinas que se encuentran en la membrana de POPC, azul las de DPGS y rojo las de la membrana mezcla. La figura 17A se presenta el valor de la densidad de la toxina para los tres modelos, para la membrana mezcla y de DPGS puro se observan picos de densidad en coordenadas cercanas al centro de la membrana siendo el pico de la membrana mezcla el valor de densidad más cercano a la parte media de la membrana, por otro lado para la bicapa de POPC puro, el pico de densidad se observa en coordenadas cercanas a la parte de las cabezas lipídicas; estos valores indican qué tan profundo se encuentra interaccionando la toxina con la membrana, corroborando lo anteriormente mencionado en la sección 8.1 sobre como GsMTx-4 tiende a interaccionar con mayor profundidad con el sistema de la mezcla, seguido por el sistema de DPGS puro y el POPC puro, el cual sólo interacciona de manera superficial. Al contar con 6 moléculas de toxina en el medio (figura 17B), se observa un comportamiento similar en las membranas mezcla y DPGS, sin embargo aquí se observan dos picos, debido a que en cada capa se encuentran 3 toxinas, para DPGS, o 2 y 4 toxinas en las capas de la membrana mezcla. No obstante como se mencionó anteriormente para el sistema de POPC, las toxinas tienden a formar un solo agregado, por lo cual sólo se visualiza un pico de densidad, debido al tamaño del agregado y al hecho de que el sistema se simuló utilizando condiciones de frontera periódicas, se dio que una de las toxinas en ocasiones pasaba al otro lado de la caja de simulación, lo cual se puede observar en la figura 17B, ya que pareciera que el pico de densidad para la membrana de POPC termina en las coordenadas que corresponden al lado de la caja donde se encuentra la otra capa.

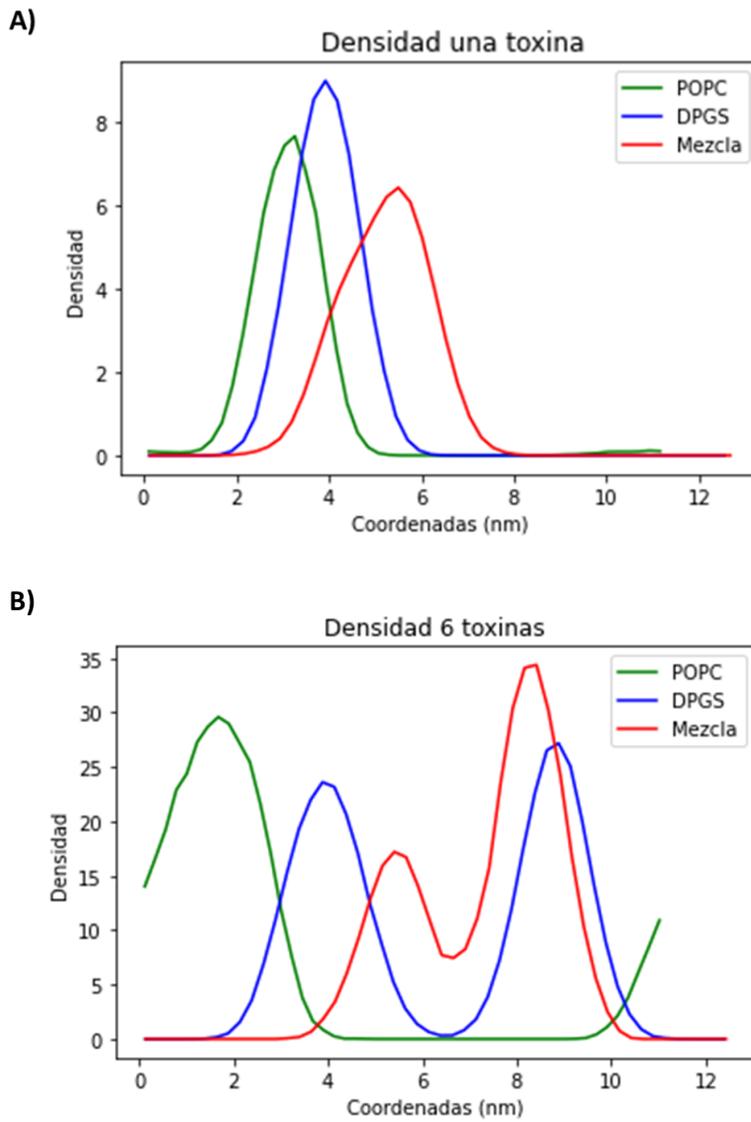


Figura 17: Perfil de densidad de las toxinas en los diferentes sistemas de membrana. A) Con una toxina. B) Con 6 toxinas.

8.4. Función de distribución radial

Para la función de distribución radial se analizaron las interacciones entre los lípidos tomando en cuenta los átomos que componen las cabezas hidrofílicas de ambos lípidos: el grupo fosfato (PO4) para el caso de POPC y el carbono en la posición 3 de la galactosa (C3) para el DPGS (figura 18 y 19). Para estos resultados se graficó en el eje horizontal la distancia promedio en nm que existe entre los dos átomos a analizar y en el eje vertical la función de distribución radial.

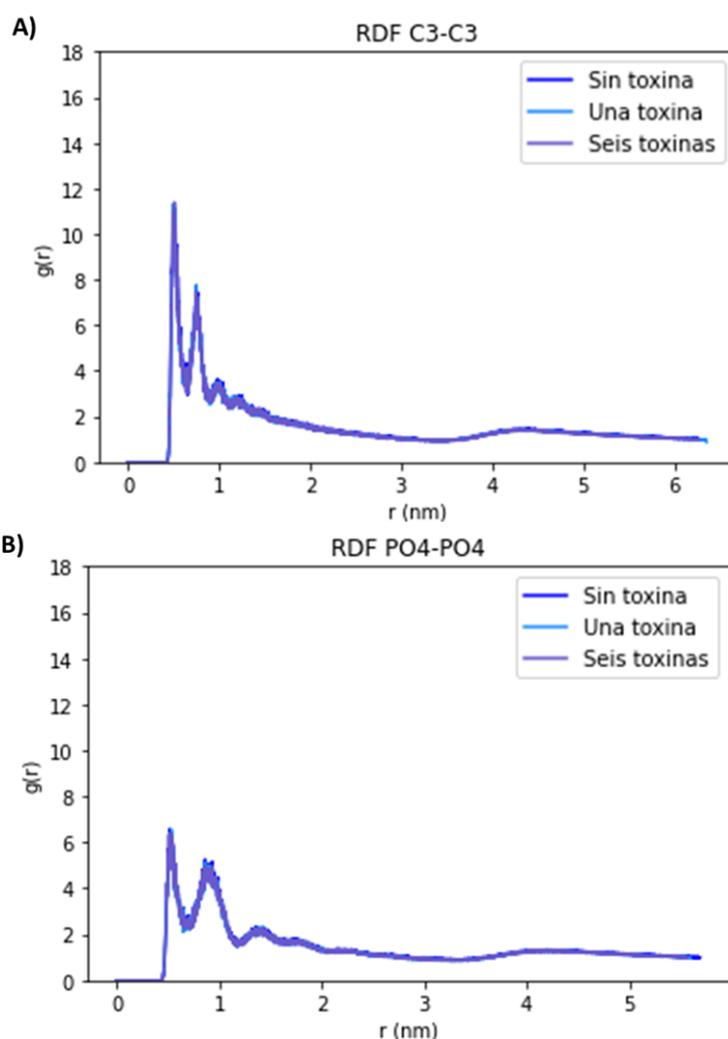


Figura 18: Función de distribución radial entre diferentes átomos de la región polar de los lípidos A) Entre los grupos fosfato del sistema de POPC. B) Entre el carbono C3 de la galactosa del sistema de DPGS.

La figura 18 muestran la interacción entre las cabezas de POPC y las cabezas de

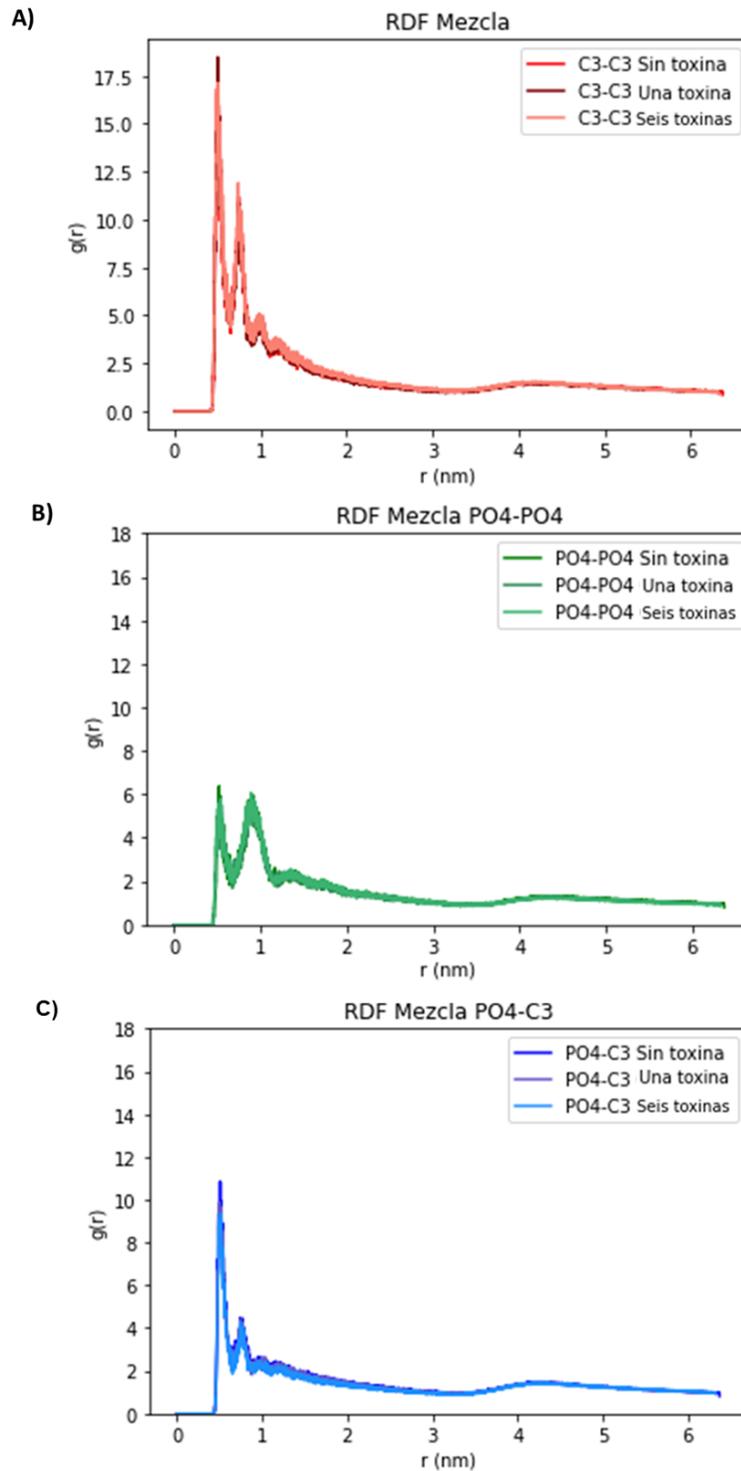


Figura 19: Función de distribución radial entre diferentes átomos de la región polar de los lípidos que conforman la membrana mezcla. A) Entre los grupos fosfato del POPC. B) Entre el carbono C3 de la galactosa del DPGS C) Entre los grupos fosfato y carbono C3 de la galactosa de los lípidos POPC y DPGS respectivamente.

DPGS, observando que en los tres sistemas se presentan 2 picos bien definidos en los primeros nm y conforme se aumenta la distancia se observan picos con menor definición. Se puede observar que la presencia de la toxina, ya sea una sola o seis moléculas de esta, no producen cambios en las interacciones entre lípidos en estos dos sistemas puros.

En la figura 19 observamos los resultados obtenidos para todas las posibles interacciones de la membrana mezcla de manera desglosada por interacción para una mejor apreciación, entre POPC-POPC en color verde, DPGS-DPGS en rojo y DPGS-POPC en azul. Aquí el mayor pico le corresponde a la interacción entre las cabezas de DPGS-DPGS para los tres grupos: sin toxina, con una toxina y con seis toxinas; seguido del pico que representa la interacción entre DPGS-POPC y por último el pico de menor altitud corresponde al valor obtenido para la interacción POPC-POPC. Así mismo, al comparar con lo obtenido en los sistemas puros se observan que los picos de interacción entre DPGS son superiores para la mezcla, mientras que para POPC el primer pico es de igual tamaño pero se observa un aumento en el segundo pico de la membrana mezcla.

De igual manera, este parámetro también se utilizó para analizar las interacciones entre los lípidos de las membranas y la toxina, donde se tomo como referencia al aminoácido triptófano (TRP), que se encuentra en la estructura de GsMTx-4, debido a su naturaleza hidrofóbica para medir estas interacciones (figura 20), aquí se obtuvo que aunque se encuentren 1 o 6 toxinas en el medio, estas presentan una mayor interacción con las cabezas de DPGS de la membrana mezcla, seguido de las cabezas de DPGS de la membrana pura y una menor interacción con las cabezas lipídicas de POPC en la membrana conformada sólo de este lípido; en la gráfica no se muestran las interacciones entre TRP y la cabeza de POPC de la mezcla debido a que se obtuvieron valores muy bajos que no se llegaban a apreciar. Por último, se analizó la interacción de la toxina con las moléculas de agua (figura 21), utilizando de igual manera el aminoácido triptófano de la toxina, ya que si presenta una mayor interacción con el medio no está interaccionando profundamente con la membrana; aquí se obtuvo lo contrario a lo anterior, ya que se observó que el sistema que presentaba mayor interacción de la toxina con las moléculas de agua era el de POPC puro, mientras que para el caso de los sistemas de DPGS y mezcla se presenta una interacción menor. Los resultados obtenidos tanto en la figura 20 como en la figura 21 concuerdan con lo obtenido anteriormente en el análisis de perfil de densidad, lo observado en las figuras 9 y 10, y refuerzan la idea de que la interacción de las toxinas es más profunda en la membrana mezcla, seguida por la membrana de DPGS y sólo interacciona de manera superficial con la membrana de POPC.

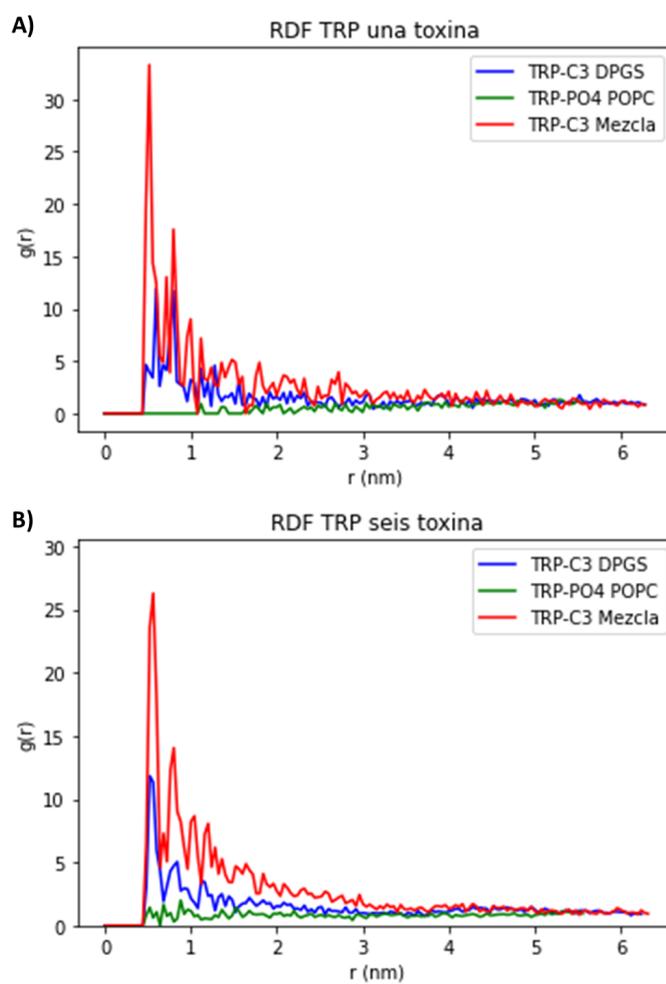


Figura 20: Distribución radial entre el aminoácido triptófano presente en la toxina y las cabezas lipídicas de DPGS y POPC en las 3 membranas. A) Sistemas con una sola toxina. B) Sistemas con 6 toxinas.

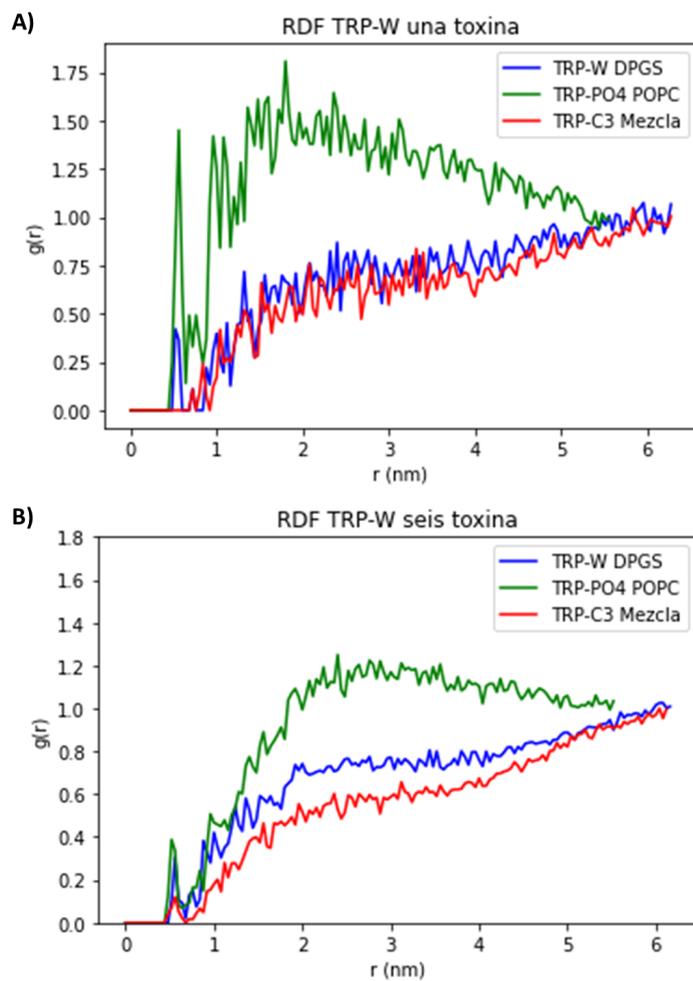


Figura 21: Distribución radial entre el aminoácido triptófano presente en la toxina y las moléculas de agua en el medio. A) Sistemas con una sola toxina. B) Sistemas con 6 toxinas.

8.5. Parámetro de orden

En la figura 22 se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis del parámetro de orden de una de las cadenas de ácidos grasos de POPC y la cadena de esfingosina de DPGS, donde en el eje horizontal se presentan el número de cuentas de carbonos que conforman las colas lipídicas y en el eje vertical los valores obtenidos del cálculo del parámetro de orden de cada una. Aquí sólo se discute los resultados obtenidos para estas cadenas debido a que son los que muestran las diferencias entre los grupos, sin embargo los resultados de las otras cadenas de ácidos grasos para ambos lípidos se muestran en la parte de anexos.

Para la membrana de POPC se observa un comportamiento decreciente, siendo los carbonos más cercanos a las cabezas hidrofílicas los que presentan un mayor parámetro de orden, mientras que los carbonos más cercanos al centro de la bicapa llegan a valores más cercanos al 0 lo que habla de un menor orden; por otro lado, para la membrana de DPGS los carbonos más cercanos a la cabeza hidrofílica, muestran un valor bajo debido a la presencia de un doble enlace en su estructura, sin embargo los siguientes carbonos presentan un valor más ordenado, y aunque aquí también se observa una tendencia decreciente en los valores cuando los carbonos se encuentran más cercanos al centro de la membrana, aunque el parámetro de orden no llega a decaer tanto como en el caso de la membrana de POPC. Para los sistemas con una toxina y con seis toxinas, se observó una disminución del valor del parámetro de orden, en el caso de los sistemas de POPC esta disminución se vio principalmente en los átomos cercanos a la cabeza hidrofílica en contraste con los átomos más cercanos a la región hidrofóbica, donde esta tendencia se invierte; mientras que para los sistemas de DPGS se observó una disminución en el parámetro de orden en todas las cuentas de carbonos con respecto al grupo sin toxina.

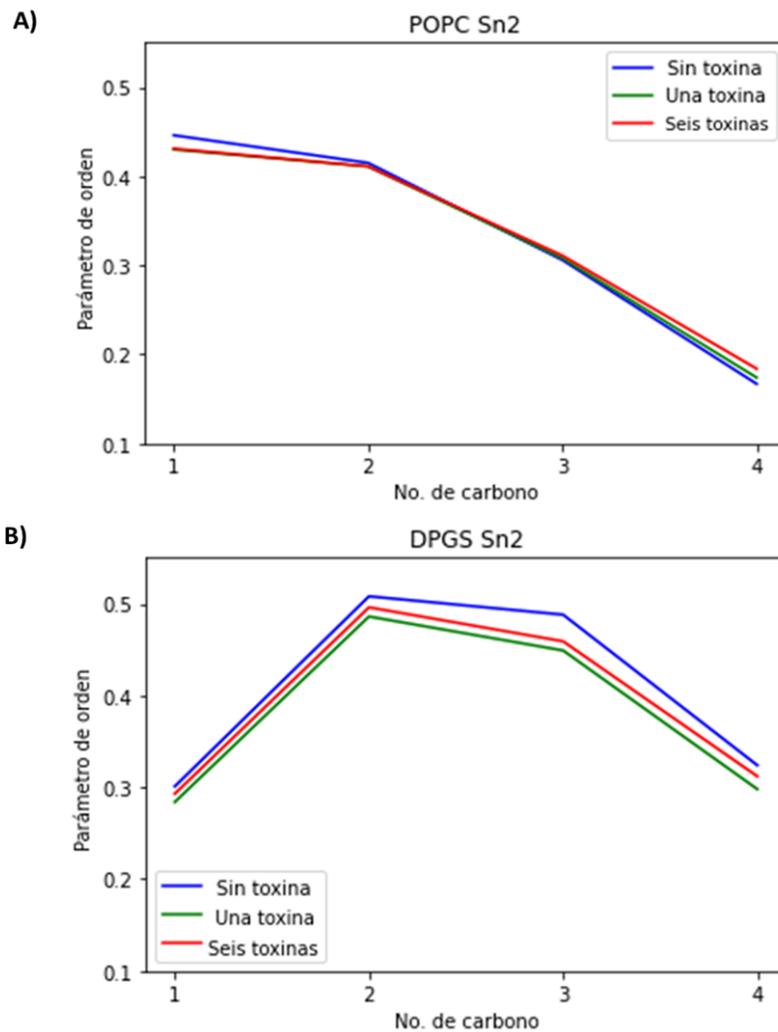


Figura 22: Parámetro de orden de una de las cadenas de ácidos grasos de POPC y de esfingosina de DPGS. A) Cadena de ácidos grasos de POPC. B) Cadena de esfingosina de DPGS.

Para el caso de la membrana compuesta por la mezcla de lípidos (figura 23), de igual forma se calculó el parámetro de orden para ambos lípidos, y aunque en ambos se observó un comportamiento similar a lo descrito anteriormente por parte de las colas lipídicas, aquí se presenta una disminución más marcada en los valores del parámetro de orden de las colas lipídicas en los sistemas donde están presentes una toxina y seis toxinas con respecto al sistema sin toxinas.

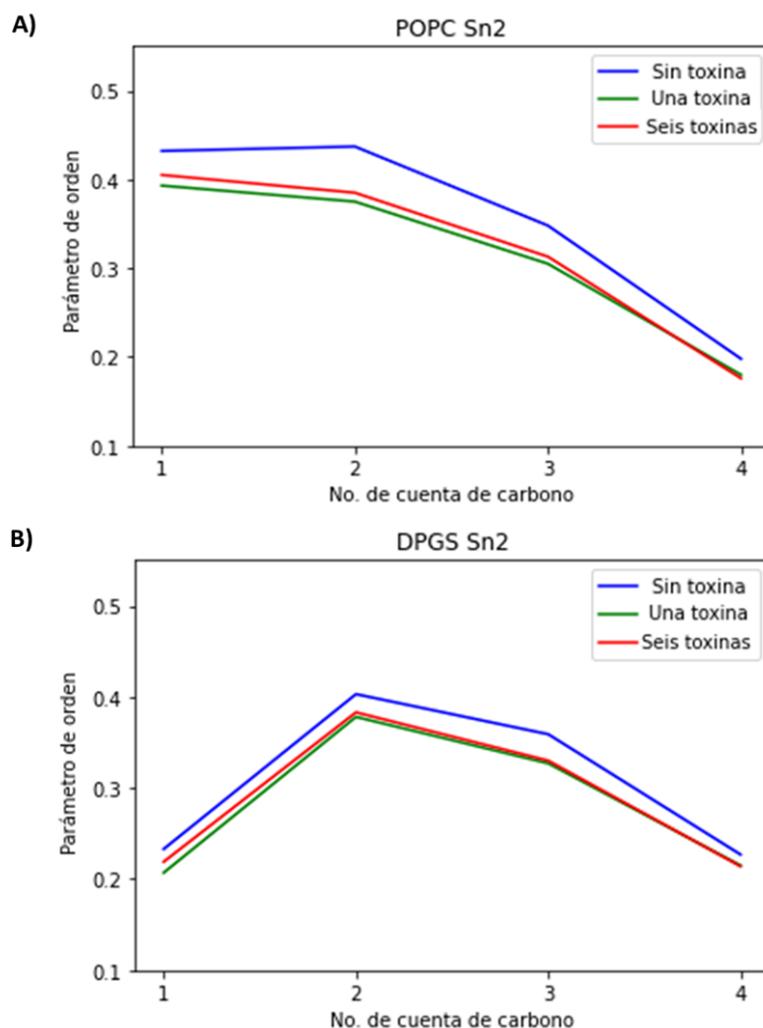


Figura 23: Parámetro de orden de una de las cadenas de ácidos grasos de POPC y de esfingosina de DPGS que componen la membrana mezcla. A) Cadena de ácidos grasos del POPC que se encuentra en la membrana mezcla. B) Cadena de esfingosina de DPGS que se encuentra en la membrana mezcla.

8.6. Centro de masa

En la figura 24 se observan los resultados obtenidos del análisis de la localización del centro de masa de una sola toxina durante el tiempo de simulación para los sistemas estudiados. En las gráficas, en el eje horizontal se presenta el tiempo de simulación y en el eje vertical la posición de las moléculas con respecto al plano ortogonal formado por la superficie de la membrana. En las figuras 24A y 24B, la línea de color rojo representa el centro de masa de las cabezas hidrofílicas de POPC y DPGS respectivamente, mientras que para el caso de la figura 24C que corresponde a la membrana formada por la mezcla de los lípidos, se presentan dos líneas aunque estas de igual manera sólo representan una de las capas de la membrana, ya que, la línea de color rojo representa el centro de masa de las cabezas hidrofílicas de POPC mientras que la negra representa el de las cabezas de DPGS, por lo cual, en las tres figuras se muestra únicamente la capa de membrana con la que está interaccionando la toxina, representada en color azul.

En la membrana de POPC (figura 24A) se observa a la toxina interaccionar solamente con la parte más externa de las cabezas hidrofílicas de la membrana, en cambio para la membrana de DPGS (figura 24B), la toxina interacciona con las cabezas hidrofílicas pero también se observa que en ocasiones durante la simulación se encuentra en posiciones dentro de la membrana, por último en la membrana conformada por la mezcla de lípidos (figura 24C), la toxina se encuentra internalizada en la membrana durante casi todo el tiempo de simulación e interaccionando con el DPGS.

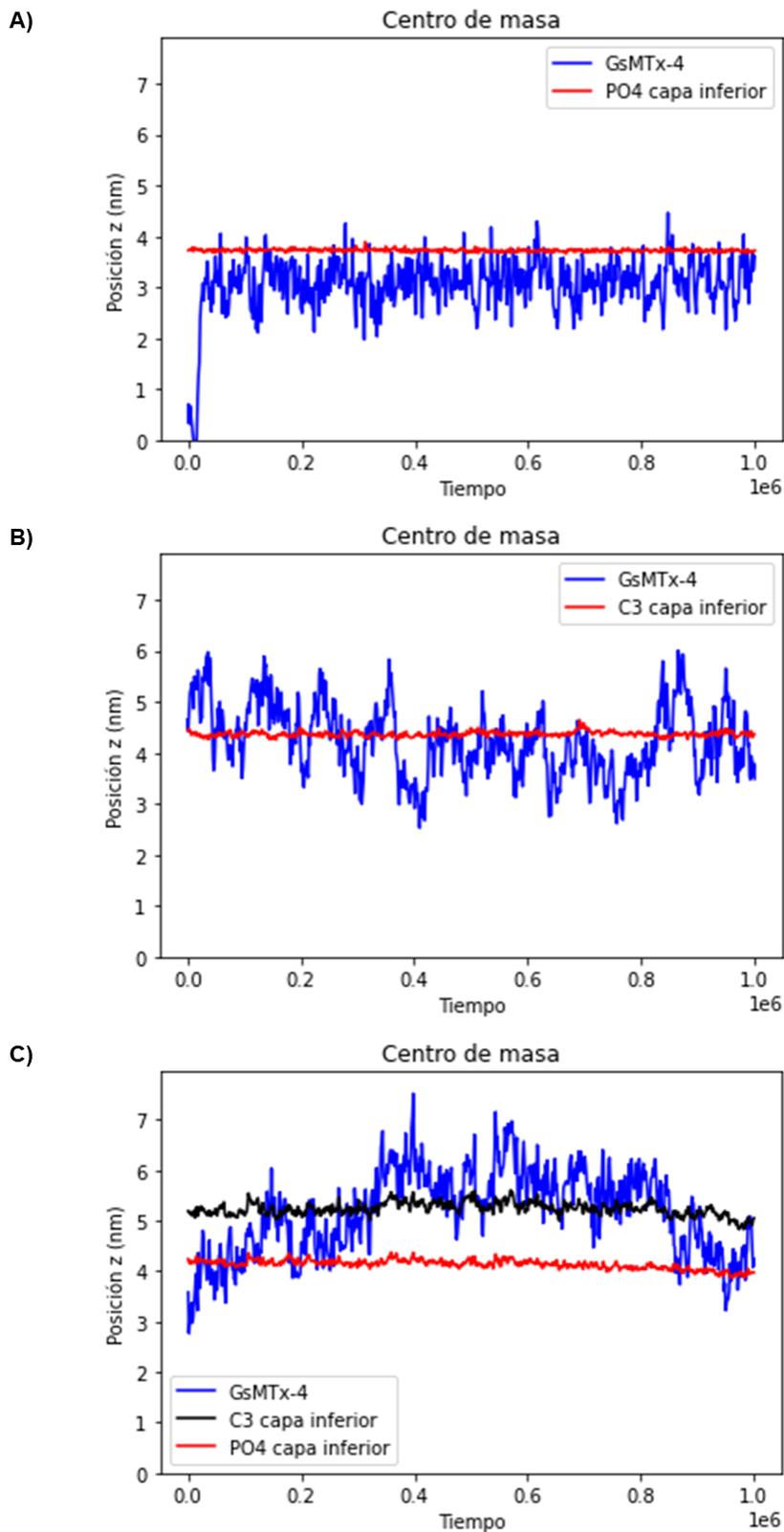


Figura 24: Centro de masa de la toxina GsMTx-4 a lo largo de la simulación y de los grupos funcionales de las cabezas hidrofílicas de los lípidos que componen las membranas. A) Membrana de POPC pura. B) Membrana de DPGS pura. C) Membrana compuesta por la mezcla de ambos lípidos.

La figura 25 muestra las gráficas correspondientes al centro de masa de los sistemas con seis toxinas, aquí de igual manera el eje horizontal representa el tiempo de simulación y el eje vertical la posición de las moléculas con respecto al plano ortogonal formado por la superficie de la membrana. Las líneas negra y gris oscuro que se observan en la figura 25A y 25B representan el centro de masa de las cabezas hidrofílicas de POPC y DPGS respectivamente; se observan dos líneas debido a que las toxinas, en el caso de algunos sistemas, se encuentran interaccionando con ambas capas de la bicapa, en la figura 25C las líneas de color negro y gris oscuro representan las cabezas hidrofílicas de DPGS, mientras que las líneas grises claro representan las cabezas de POPC, aquí cada capa de la membrana es representada por una línea negra y otra gris. Cada una de las toxinas se encuentra representada en un color diferente para observar como se encuentran interaccionando con la membrana. En el sistema de POPC podemos observar como las toxinas se encuentran principalmente interaccionando entre ellas en lugar de con la membrana y sólo algunas de las toxinas que forman este agregado, como es el caso de las toxinas 3 y 6, se encuentran interaccionando de manera superficial con la membrana, similar al comportamiento del sistema de POPC con una toxina, para el sistema de DPGS se observan 3 toxinas interactuando con la capa superior y 3 con la capa inferior, estas toxinas interaccionan principalmente con las cabezas hidrofílicas de DPGS, sin embargo también llegan a interaccionar de manera más profunda con la membrana durante la simulación y por otro lado en el sistema de la membrana conformada por la mezcla de lípidos, para la capa que cuenta con 4 toxinas se observa que estas primero interaccionan entre ellas formando lo que sería un agregado y posteriormente este agregado se internaliza en la membrana, y en la capa donde sólo se colocaron dos toxinas estas se encuentran interaccionando de manera profunda con la membrana desde el inicio de la simulación.

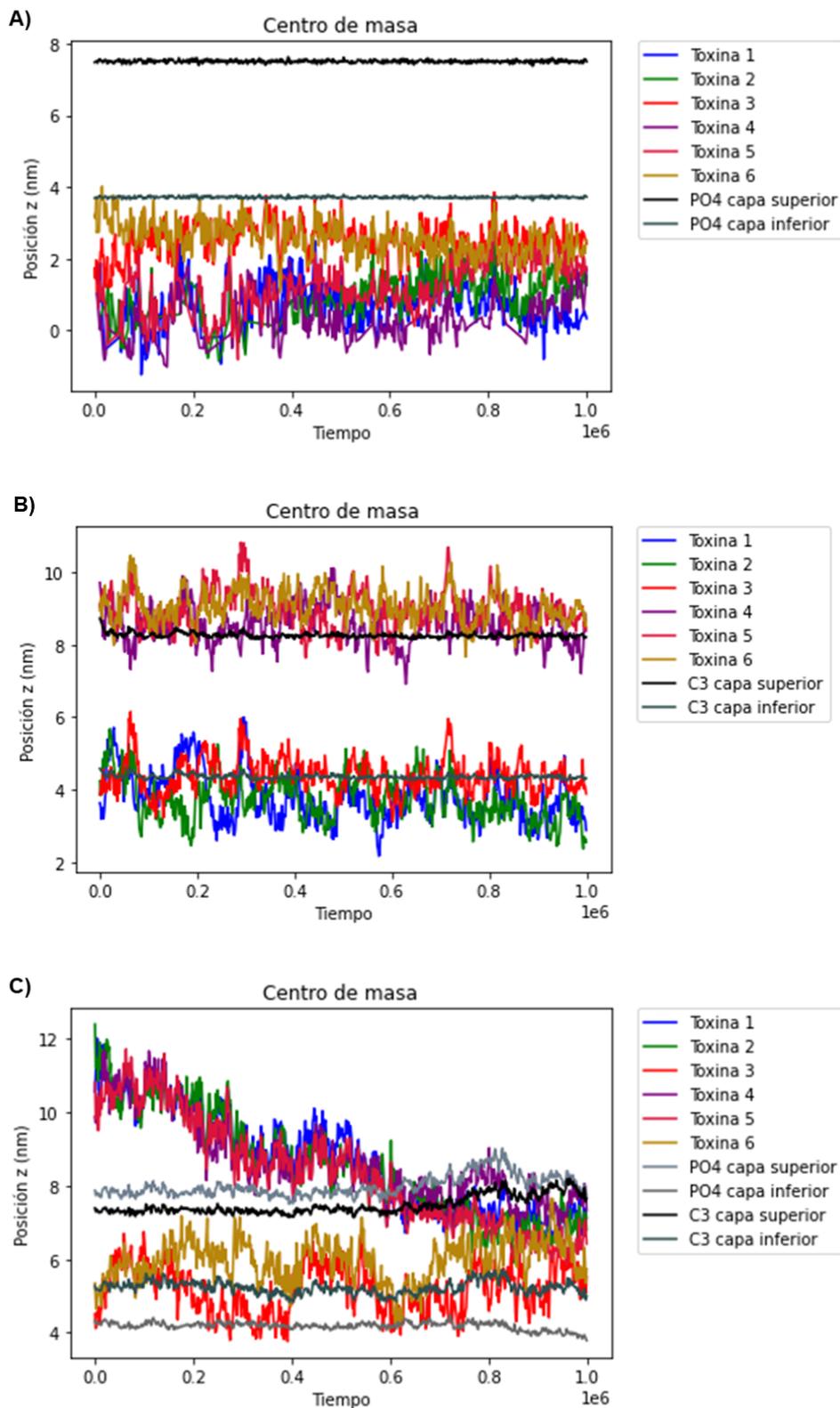


Figura 25: Centro de masa de las 6 toxina GsMTx-4 a lo largo de la simulación y de los grupos funcionales de las cabezas hidrofílicas de los lípidos que componen las membranas. A) Membrana de POPC. B) Membrana de DPGS. C) Membrana compuesta por la mezcla de ambos lípidos.

8.7. Difusión lateral

Los resultados obtenidos del análisis de la difusión lateral de los lípidos dentro de la membrana se muestran en la figura 26 donde en el eje horizontal corresponde a los lípidos que componen cada una de las membranas estudiadas y el eje vertical a los valores de difusión lateral en unidades de $1e^{-5}cm^2/s$. De igual manera para cada membrana se muestran los tres grupos: el sin toxina, con una toxina y el de seis toxinas.

Se observa que los lípidos que presentan una mayor difusión lateral son los POPC de la membrana pura conformada por éste y los lípidos con menor difusión lateral son los DPGS de la membrana pura conformada por éste. En la membrana con la mezcla de lípidos, se observa que al interaccionar estos dos lípidos se presenta una disminución de la difusión del POPC y un aumento en la del DPGS. De igual manera, al realizar el análisis estadístico de ANOVA se encontró que en los grupos de los lípidos que conforman la membrana mezcla existían diferencias significativas por lo que se procedió a realizar una prueba de Tuckey para conocer cuales grupos experimentales eran los que presentaban diferencia significativa entre si, y se encontró que para el lípido POPC la diferencia significativa se presentaba entre los grupos experimentales de sin toxina y con seis toxinas, y los grupos de una toxina y seis toxinas; por otro lado para el lípido de DPGS presente en la membrana mezcla se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales.

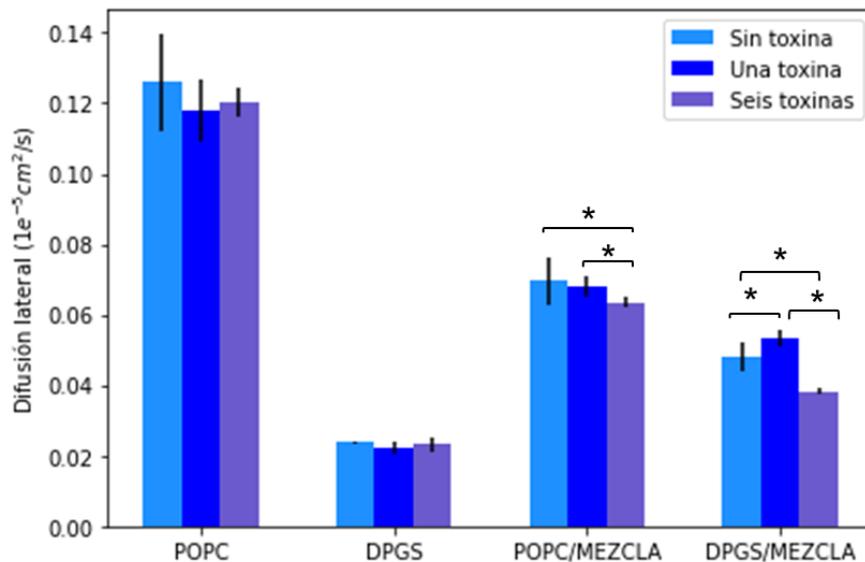


Figura 26: Gráfica del promedio de la difusión lateral \pm la desviación estándar de los lípidos en los diferentes sistemas de membranas. Se realizaron dos pruebas diferentes para conocer si existía diferencia significativa entre los grupos, la primera siendo la prueba de ANOVA seguida por una prueba de Tuckey; los asteriscos representan que existe diferencia significativa entre los grupos. En la membrana de la mezcla de lípidos para el lípidos POPC en el ANOVA se obtuvo un p-value de 0.001 y en la prueba de Tuckey se obtuvo un p-value de 0.001 entre el grupo sin toxina y de seis toxina y un p-value de 0.020 entre el grupo de una toxina y el de seis toxinas; mientras que para el lípido de DPGS en el ANOVA se obtuvo un p-value de $6.73e-05$ y en la prueba de Tuckey se obtuvo un p-value de 0.020 entre el grupo sin toxina y de una toxina, un p-value de 0.003 entre el grupo sin toxina y el de seis toxinas y un p-value de 0.0001 entre el grupo de una toxina y el de seis toxinas.

9. Discusión

El estudio de la mecanotransducción así como la inhibición de esta es importante dentro de la farmacología para el desarrollo de fármacos para el tratamiento del dolor. Es por ello que conocer y entender el comportamiento de la toxina GsMTx-4, uno de los principales inhibidores de los canales mecanosensibles, ha sido la prioridad de este proyecto. Como se reportó por Reyes-Pardo y Sánchez-Herrera (2019) la interacción de GsMTx-4 con la membrana presenta un mecanismo de acción diferente a las demás moléculas conocidas por ser inhibidoras de la mecanotransducción; debido a la preferencia que presenta esta toxina por interactuar con membranas IB+4 se planteó el estudiar si la presencia de glicolípidos en la membrana podría estar afectando la unión de esta toxina y si esto se encontraba relacionado con la diferencia en el mecanismo de interacción para inhibir de esta molécula. A partir de los sistemas obtenidos al final de las simulaciones de dinámica molecular realizadas (Figura 9 y Figura 10) muestran que la membrana con la cual las toxinas interactúan de manera más profunda son aquellas membranas compuestas por la mezcla de lípidos (Figuras 9C y 10C), mientras que con la membrana de DPGS, las toxinas interactúan en mayor manera con las cabezas hidrofílicas y la parte media de los lípidos y para la membrana de POPC las toxinas sólo interactúan de manera superficial con la parte más externa de los lípidos, lo cual posteriormente fue confirmado con los análisis de perfil de densidad de las toxinas (Figura 17) y de función de distribución radial (Figura 20), esto no sólo concuerda con lo reportado por Reyes-Pardo y Sánchez-Herrera (2019), donde se observó que la toxina prefiere interactuar con membranas IB4+ que contenían grupos glicos en su estructura, sino que también concuerda con lo reportado por Nishizawa y Nishizawa (2007) donde al realizar simulaciones de dinámica molecular con membranas de POPC y DPPC observaron que la toxina GsMTx-4 presenta dos modos de unión a la membrana: el modo superficial y el modo profundo, estos modos de interacción también se observan en los sistemas obtenidos en este trabajo siendo el modo superficial el que se presenta en el sistema de POPC y el profundo el que se presenta en el sistema conformado por la mezcla de lípidos, mientras que para el sistema de DPGS puro, parecería que se tiene un punto intermedio entre estos dos modos de interacción; de igual manera estos autores reportan que la interacción más favorable energéticamente entre la

toxina y la membrana de POPC es la interacción superficial, por lo que éstos concuerda con que en ningún momento de las simulaciones las toxinas se encuentran interaccionando de manera profunda con la membrana de POPC. Así mismo en las simulaciones realizadas se identificó la formación de agregados de toxinas en el sistema de POPC donde las seis toxinas que se insertaron al inicio de la simulación presentaron una preferencia a interaccionar ente sí antes de interaccionar con la membrana, esta tendencia de la toxina GsMTx-4 a formar agregados a cierta concentración fue reportada por Nishizawa *et al.* (2015), en donde reportaron que se observó que al estar presentes dos toxinas en el medio de un sistema con una membrana de POPC se forman dímeros, los cuales una vez acoplados éstos persisten hasta el final de la simulación, lo cual coincide con lo observado en este trabajo, en donde desde el principio y hasta el final de la simulación se observa el agregado de las seis toxinas; de igual manera se podría argumentar que la formación de estos agregados podría explicar en parte las diferencias en el mecanismo de acción de la toxina que se reporta en Reyes-Pardo y Sánchez-Herrera (2019). Se debe destacar que este tipo de agregados no fue observado para el sistema formado por DPGS solamente y que en el sistema conformado por la mezcla de lípidos, si llega a presentarse la formación de algunos agregados, aunque éstos son formados por un menor número de toxinas y logran interaccionar de manera profunda con la membrana a diferencia del agregado observado en el sistema de POPC, este resultado de igual manera confirma la preferencia de las toxinas por interaccionar con sistemas que contienen glicolípidos y también concuerda con Nishizawa *et al.* (2015), donde se observó que cuando la toxina interaccionaba de manera profunda en la membrana no se presenciaba la formación de dímeros de la toxina insertada en el medio.

Al realizar los respectivos análisis de las propiedades mecánicas de estas membranas, se observó que los valores de área por lípido y ancho de membrana variaban dependiendo del lípido o lípidos que las conformaban. Para el área por lípido, comparativamente se obtuvieron valores más altos en la membrana de POPC, seguido de la membrana conformada por la mezcla de lípidos y el menor valor correspondiendo a la membrana de DPGS, esto concuerda con lo reportado por Saeedimazine *et al.* (2019) donde se menciona que debido a la interacción que existe entre las cabezas lipídicas de las galactosilceramidas estas tienden a formar membranas más compactas lo que lleva a una disminución en el valor del

área por lípido, de igual manera estos autores reportan que cuando este tipo de moléculas se encuentran presentes en membranas compuestas de una variedad de lípidos se observa que su presencia causa una influencia en la membrana, generando una leve disminución de los valores de área por lípido sobre todo en membranas que se conforman también de POPC. Hall, Róg y Vattulainen (2011) también reportan que otra de las características de las galactosilceramidas es que estas tienden a interactuar entre si al formar puentes de hidrógeno, lo cual ocasiona que si existe otro lípido en la membrana, como es el caso del POPC en nuestras simulaciones, las galactosilceramidas o DPGS tienden a interdigitarse en la membrana empujando así a los demás lípidos hacia la parte exterior, resultando esto en membranas más anchas lo cual como podemos observar se corrobora en este estudio, ya que el valor de ancho de membrana de la membrana conformada por la mezcla de lípidos es mayor al de los otros dos sistemas. A este fenómeno también se le atribuye la razón de que las membranas de la mezcla de ambos lípidos forme una estructura curvada a diferencia de las otras dos membranas conformadas por un solo tipo de lípido, sin embargo al no haber estudios donde se utilice específicamente una cantidad 50/50 de ambos lípidos no lo podemos contrastar con reportes en la literatura.

De igual manera para ambos parámetros se observó que había una diferencia significativa en el caso de los valores del sistema mezcla para los tres grupos de sin toxina, con una toxina y con seis toxinas. Para el parámetro de área por lípido se observaron diferencias significativas entre los grupos, esto puede estar ligado a que como se reporta en Nishizawa y Nishizawa (2007), cuando la toxina GsMTx-4 se encuentra interactuando de manera profunda con la membrana en ocasiones esta interacción dependiendo de la profundidad de esta, puede estar en contacto con las colas de la capa opuesta y esto genera que exista una deformación en la membrana que puede llegar a ocasionar cambios como el acomodo de las colas lipídicas y el ancho de membrana. La membrana conformada por una mezcla de los dos lípidos es con la que más profundamente interactúan las toxinas, seguida por la membrana conformada solamente de DPGS, la diferencia en los valores del área por lípido y ancho de membrana puede deberse a que se está presentando este fenómeno y se están observando deformaciones en la membrana, siendo estas más notorias en la membrana mezcla debido a la profundidad de la interacción de la toxina. En el caso de las membrana de POPC no se observan cambios en el área por lípido ni en el ancho de membrana, lo

cual puede deberse a que en esta membrana la interacción de las toxinas es sólo superficial, ya que como se reporta en Nishizawa *et al.* (2015), donde al estudiar la interacción de GsMTx-4 con una membrana de POPC, se observó que este tipo de interacciones no causaban cambios en las propiedades mecánicas de la membrana como lo es el ancho de membrana.

El valor del perfil de densidad también nos demuestra que las membranas de DPGS tienden a ser más compactas debido a que se observa que al comparar el posicionamiento de las cabezas lipídica en el sistema puro de POPC y el sistema puro de DPGS, en este último las cabezas lipídicas tienden a encontrarse más cercanas al centro de la membrana lo cual nos habla del compactamiento de las bicapas; de igual manera para el caso de la membrana formada por la mezcla de lípidos, observamos una tendencia donde la densidad de los lípidos de DPGS tiende a encontrarse principalmente en una capa de la membrana, así mismo algo que se observa en las tres gráficas de densidad de la mezcla (figura 16) es que el pico que corresponde a la densidad de los átomos que componen los lípidos de DPGS se encuentra más cercana al centro de la membrana en comparación con las gráficas de la membrana de DPGS puro, esto puede deberse a que como se mencionó anteriormente, cuando estos lípidos se encuentran interaccionando con POPC tienden a empujarlos hacia el exterior de la membrana, sin embargo este suceso lleva a que los lípidos de DPGS a su vez sean empujados hacia el centro de la membrana, causando un fenómeno conocido como interdigitación, que se refiere a que las colas hidrofóbicas de DPGS se encuentran interaccionando con las colas hidrofóbicas de la monocapa opuesta Hall *et al.* (2010).

De igual manera el valor de la densidad de la toxina (figura 17) concuerda con lo antes mencionado al discutir las simulaciones obtenidas y permite afirmar que cuando sólo hay una toxina en el medio, ésta tiende a interaccionar con mayor profundidad con el sistema conformado por la mezcla de lípidos, seguido por el sistema de DPGS puro y con el sistema de POPC puro sólo interacciona de manera superficial; mientras que al aumentar a 6 moléculas de toxinas en el medio se observa que para los sistemas de la mezcla de lípidos y de DPGS, estas interaccionan con la membrana de manera profunda y en el sistema de POPC puro las toxinas tienden a formar agregados entre si y sólo una de las toxinas que componen este agregado interacciona de manera superficial con la membrana. Este comportamiento se vuelve a comprobar al analizar la función de distribución radial

del aminoácido triptófano que se encuentra en GsMTx-4 y los átomos que conforman las cabezas lipídicas, el fosfato para POPC y uno de los carbonos del anillo de la galactosa para DPGS. En donde se observa que la interacción de la toxina es mayor con los lípidos DPGS, más específicamente con los átomos que componen la interfaz de las cabezas lipídicas de éstos, este resultado indica que la estructura de la cabeza lipídica influye en el como interacciona y como se posiciona la toxina en la membrana, lo cual si lo comparamos con lo reportado por Nishizawa y Nishizawa (2007), donde al observar la interacción de GsMTx-4 con POPC y DPPC, se reporta que la composición de la cadena lipídica también afecto la interacción de la toxina, podríamos asumir que aunque la toxina GsMTx-4 está descrita como un inhibidor no específico, si podría estar presentando una especificidad relativa al preferir unirse a ciertos lípidos que conforman la membrana plasmática y es por eso que en el caso de neuronas prefiere interaccionar con las IB4+.

Así mismo, al analizar la función de distribución radial de los átomos que componen las cabezas lipídicas en relación a si mismas para cada membrana, se obtuvo que la mayor interacción se presenta entre las cabezas de DPGS, tanto en la membrana formada por la mezcla de lípidos, como en la membrana compuesta únicamente de este tipo de lípido, lo cual a su vez concuerda con lo reportado por Kapla *et al.* (2011) acerca del comportamiento de los glicolípidos, ya que el anillo de la galactosa en su estructura le permite formar una alta cantidad de puentes de hidrógeno en comparación con otros lípidos como es el caso del POPC, aunque el DPGS tiende a interactuar y formar estos puentes de hidrógeno entre sí también se ha reportado que en membranas modelo donde se encuentra a su vez el POPC, éstos tienden a interaccionar formando más puentes entre POPC y DPGS que entre dos POPC, por lo cual se ve una mayor interacción entre las cabezas lipídicas de éstos dos que entre las de POPC.

A partir del análisis del parámetro de orden, la conducta observada por las colas lipídicas concuerda con lo reportado experimentalmente por Hall, Róg y Vattulainen (2011), donde en membranas modelo compuestas por diferentes lípidos, entre ellos POPC y DPGS, se observa que debido a la naturaleza de ambos, las colas de POPC tienden a estar más desordenadas presentando valores más bajos del parámetro de orden y sobre todo en los carbonos mas cercanos al centro de la membrana; mientras que para DPGS debido al doble enlace presente al inicio de la cadena de la esfingosina, se observan valores bajos

que representan desorden, sin embargo en los demás carbonos se observan valores más ordenados, incluso en las regiones más cercanas a la parte media de la membrana éstos no presentan valores tan cercanos al cero. Este comportamiento es dado debido a que, como ya se menciono anteriormente, las interacciones entre los lípidos de DPGS tienden a generar sistemas más ordenado y esto es lo que causa que las bicapas obtenidas sean más compactas. De igual manera, Saeedimazine *et al.* (2019) reportan que en una membrana conformada tanto por POPC como por DPGS, la presencia de este último tiende a reducir la dinámica de las colas de POPC, generando así que se presente un mayor parámetro de orden para estas, lo cual se puede apreciar en este trabajo al comparar las figuras 22A y 23A, donde para el grupo sin toxinas se observan valores más altos del parámetro de orden cuando el POPC se encuentra en la membrana mezcla, sin embargo, al comparar las figuras 22B y 23B, observamos que DPGS también sufre un cambio en la dinámica de sus colas al presentar una reducción en el parámetro de orden, lo cual indicaría que la interacción con POPC también afecta el comportamiento de estos lípidos. Así mismo, se observan diferencias significativas entre los grupos de sin toxina, con toxina y con seis toxinas; para los sistemas de POPC (figura 22A) se observa una disminución del parámetro de orden en los átomos de las colas cercanos a la cabeza lipídica en los grupos a los cuales se les introdujo la toxina; para el caso de DPGS (figura 22B), la disminución del parámetro de orden se observó en todos los átomos de carbonos, siendo el sistema más ordenado el que no contenía toxina y los menos ordenados el de una toxina y el de seis toxinas respectivamente. Para el caso de la membrana conformada por la mezcla de ambos lípidos, se observa una disminución del orden de las colas lipídicas cuando están presentes las toxinas y en los dos lípidos que conforman la membrana; estos resultados demuestran que al unirse la toxina a las membranas cambia una de las propiedades mecánicas más importantes que es el orden de las cadenas hidrocarbonadas, desordenando los sistemas donde se encuentra, habiendo un mayor desorden en los sistemas donde se encuentra interaccionando a mayor profundidad, lo cual podría encontrarse relacionada a que, como se mencionó anteriormente, Nishizawa y Nishizawa (2007) observaron que la interacción profunda de la toxina con las membranas llega a causar deformaciones en estas, lo cual podría estar causando el observar la mayor disminución del orden de las colas en el sistema de la mezcla de lípidos, sin embargo se debe recalcar que hasta el momento no existe infor-

mación en la literatura que reporte la medición de este parámetro cuando está GsMTx-4 interaccionando con la membrana, por lo cual los valores obtenidos por nosotros no se pueden comparar con otros estudios.

El seguimiento del centro de masa a lo largo de las simulaciones permite observar de forma clara como están interaccionando las membranas con la toxina, para la membrana de POPC la interacción de una sola toxina es similar a la gráfica reportada por Nishizawa *et al.* (2015), ya que en ambas se observa una interacción superficial de la toxina con las cabezas de POPC y en ningún momento a lo largo de la simulación se observa que el centro de masa de la toxina GsMTx-4 esté cercano al centro de la membrana, a diferencia de cómo se observa en los demás sistemas donde en ocasiones la toxina se encuentra más cercana al centro de la membrana y en otras ocasiones más cercano a la parte superficial, como es el caso de la membrana de DPGS, en donde todo el tiempo de simulación la toxina se encuentra dentro de la membrana, y en el caso de la membrana conformada por la mezcla de lípidos, sin embargo para estos dos sistemas no hay reportes en la literatura de estudios con GsMTx-4 por lo cual no se puede comparar con otros resultados, cabe aclarar que lo observado en ambos sistemas, tanto el de DPGS como la mezcla de lípidos, concuerda con lo reportado por Gnanasambandam *et al.* (2017), donde se menciona que una de las características de las moléculas que pertenecen a la familia ICK, como es el caso de la toxina GsMTx-4, es que estas tienden a internalizarse en las membranas al momento de interaccionar con esta. Para el caso de los sistemas con seis toxinas no hay ningún reporte en la literatura con la que se pueda comparar estos resultados, aunque a partir de nuestros resultados se puede observar que los tres sistemas concuerdan con lo que se ha reportando, que es la formación del agregado en la membrana de POPC, el cual presenta una interacción superficial, así mismo la membrana con la que interaccionan a mayor profundidad las toxinas es la membrana conformada por la mezcla de lípidos, en donde se observa que para el final de la simulación los centros de masa de las toxinas se encuentran casi en el centro de la membrana.

Por último, evaluando los resultados obtenidos sobre la difusión lateral, podemos decir que los lípidos de POPC tienen un mayor movimiento lateral mientras que los lípidos DPGS casi no presentan movimiento lateral entre si, en contraste, al encontrarse ambos lípidos en mezcla, la interacción entre ellos influye en su movimiento ocasionando que

la difusión lateral del POPC disminuya y que la del DPGS aumente; esto concuerda con lo reportado por Hall, Róg y Vattulainen (2011), donde se observa que uno de los principales efectos al agregar galactoceramidas en membranas de POPC es la disminución del movimiento lateral debido a las interacciones que presentan estos lípidos con el POPC. De igual manera en la membrana conformada por la mezcla de los lípidos se presentaron diferencias significativas en la difusión lateral entre los sistemas sin toxina, con una toxina y con seis toxinas. Para el lípido DPGS que es el que observamos más interacciona con la toxina en la membrana formada por la mezcla de lípidos, se observa que en el sistema de una toxina, este lípido presenta mayor difusión lateral en comparación con el sistema sin toxina, lo cual se puede deber a que las moléculas de DPGS tienden a rodear a la toxina y debido a que ésta se encuentra en movimiento a lo largo de la simulación, los DPGS tienden a moverse acompañando a la toxina para mantener la interacción; por otro lado para el caso del sistema de DPGS con seis toxinas lo que se observa es una disminución en el valor de difusión lateral, lo cual puede estar relacionado al aumento del número de toxinas ya que esto también aumenta la posibilidad de interacción con otros lípidos de DPGS.

10. Conclusiones

La toxina GsMTx-4 tiene dos principales maneras de interactuar con las membranas, el modo superficial y el modo profundo, en este estudio se observó una mayor afinidad de la toxina por las membranas que contenían galactosilceramidas en su estructura, obteniendo así una interacción profunda en la membrana conformada por la mezcla de lípidos, una interacción superficial con la membrana de POPC y un punto intermedio entre estas dos formas en la membranas de DPGS; estos resultados demuestran que si es posible que la toxina presente preferencia por interactuar con neuronas IB4+ como se ha mencionado en otros estudios, ya que estas se caracterizan por tener residuos de azúcares en sus membranas. Para el caso del sistema de POPC con seis toxinas, estas tienden a formar un solo agregado, el cual sólo interactúa de manera superficial con la membrana, la membrana mezcla también presentó formación de agregados, sin embargo éstos presentaron un comportamiento diferente, ya que sólo algunas toxinas se unieron para formar agregados y la formación de éstos no evitó que existiera una interacción profunda con la membrana. Tomando en cuenta los resultados reportados en estudios anteriores se podría relacionar la formación de estos agregados con el hecho de que la toxina presenta un mecanismo de acción diferente a otros inhibidores no-específicos de mecanotransducción, que genera que a mayor concentración de la toxina, se observe una disminución en la rigidez de la membrana, por lo cual esto también demuestra que la conformación de la membrana afecta estos comportamientos.

Los resultados obtenidos tanto en los análisis de función de distribución radial como en el de densidad de las toxinas confirman que existe una preferencia de la toxina por los lípidos DPGS, más específicamente con las cabezas lipídicas de éstos, lo cual podría estar sugiriendo que aunque GsMTx-4 es un inhibidor no-específico su interacción con la membrana puede verse influenciada por la presencia de estos lípidos, generando así una preferencia por unirse a ciertas regiones o células como sería el caso de las neuronas IB4+.

Cuando la toxina se encontraba interactuando con la membrana, más específicamente en las membranas en las que interactuaba con mayor profundidad, esta interacción causó cambios en algunas propiedades mecánicas de las membranas, como es el caso del área por lípido, ancho de membrana, parámetro de orden y difusión lateral; algunos de estos

cambios pueden ser consecuencia de la interacción profunda de la toxina con la membrana, ya que al estar más cercanos al centro de la membrana pueden estar afectando a las colas lipídicas de ambas monocapas, causando deformaciones que dan como resultado el cambio en estas propiedades.

Los resultados obtenidos en este estudio amplían el panorama para conocer de mejor manera el mecanismo de acción de GsMTx-4 y como la interacción de esta toxina con las membranas de algunas neuronas pueden generar la inhibición de canales que llevan a cabo la mecanotransducción.

Con base en nuestros resultados, las conclusiones de este trabajo de Tesis son:

- La toxina GsMTx-4 presenta una mayor interacción con las membranas que contienen galactosilceramida.
- La toxina GsMTx-4 tiende a formar agregados en solución, sin embargo, a pesar de esto, la presencia de galactosilceramida en la bicapa lipídica favorece que interactúe con la membrana.
- La interacción de la toxina GsMTx-4 con las membranas lipídicas puede cambiar las propiedades mecánicas de la membrana al alterar parámetros relacionados a su estructura, como el ancho de la membrana, el área ocupada por lípido, la difusión lateral de los lípidos y el parámetro de orden de las colas hidrocarbonadas.

11. Perspectivas

Debido a que este proyecto de investigación fue realizado utilizando un modelo simple donde sólo se trabaja con dos lípidos, se debe de tomar en cuenta que las membranas lipídicas celulares son más complejas y diversas, ya que se encuentran conformadas por una amplia variedad de lípidos, sobre todo las membranas neuronales, por lo que en estudios futuros se podría ahondar en cómo el mecanismo de acción de la toxina puede llegar a cambiar al simularse membranas modelos conformadas no sólo por POPC y DPGS y así poder aproximar los resultados a que asemejen más el comportamiento de un sistema biológico.

El contar con diferentes grupos donde se introdujeron una y seis toxinas respectivamente, permitió obtener más información acerca de las interacciones, no sólo de la toxina con la membrana sino que también de las interacciones entre estas mismas, por lo cual en futuros estudios se podría contar con una variedad más amplia de grupos para poder conocer con más detalle como se ve afectada la interacción a mayor concentración de toxina, así como también llevar a cabo otros análisis, diferentes a los reportados aquí, que permitan visualizar si la presencia de esta toxina rigidiza o no a la membrana.

Así mismo se podría realizar un estudio similar al realizado en este trabajo, pero utilizando otros inhibidores no-específicos de la mecanotransducción como lo son el gadolinio y el rojo de rutenio para así poder conocer y comparar el mecanismo de acción de cada una de estas moléculas biológicas y así obtener un conocimiento más profundo de como se lleva a cabo la inhibición de este proceso biológico y como esto puede ser utilizado en nuevos avances farmacológicos.

Por último, podríamos convertir el modelo de grano grueso a uno de todos los átomos, para profundizar los resultados obtenidos.

12. Anexos

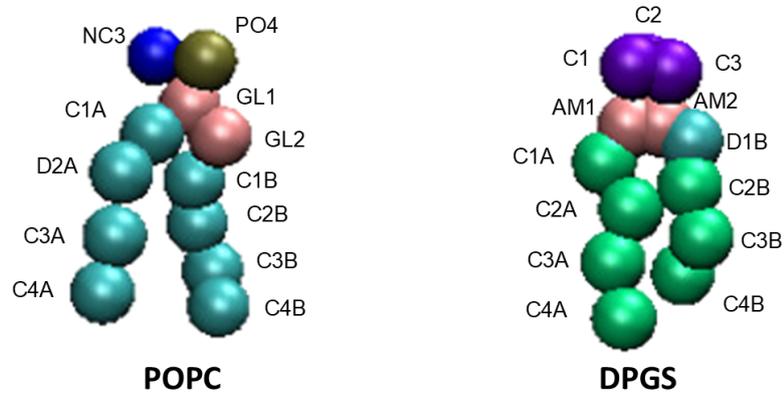


Figura 27: Imagen representativa de los lípidos POPC y DPGS que componen las membranas simuladas y los átomos que los conforman.

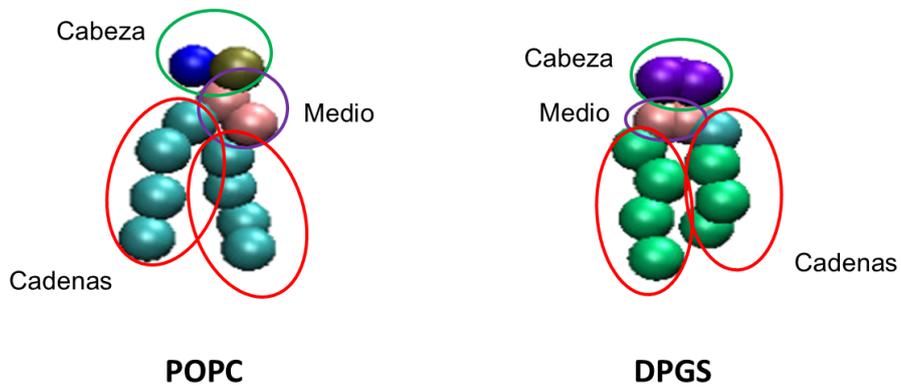


Figura 28: Imagen representativa de los lípidos POPC y DPGS que componen las membranas simuladas circulando en verde los átomos que conforman las cabezas hidrofílicas, de morado la parte media y de rojo los átomos que componen las cadenas hidrofóbicas.

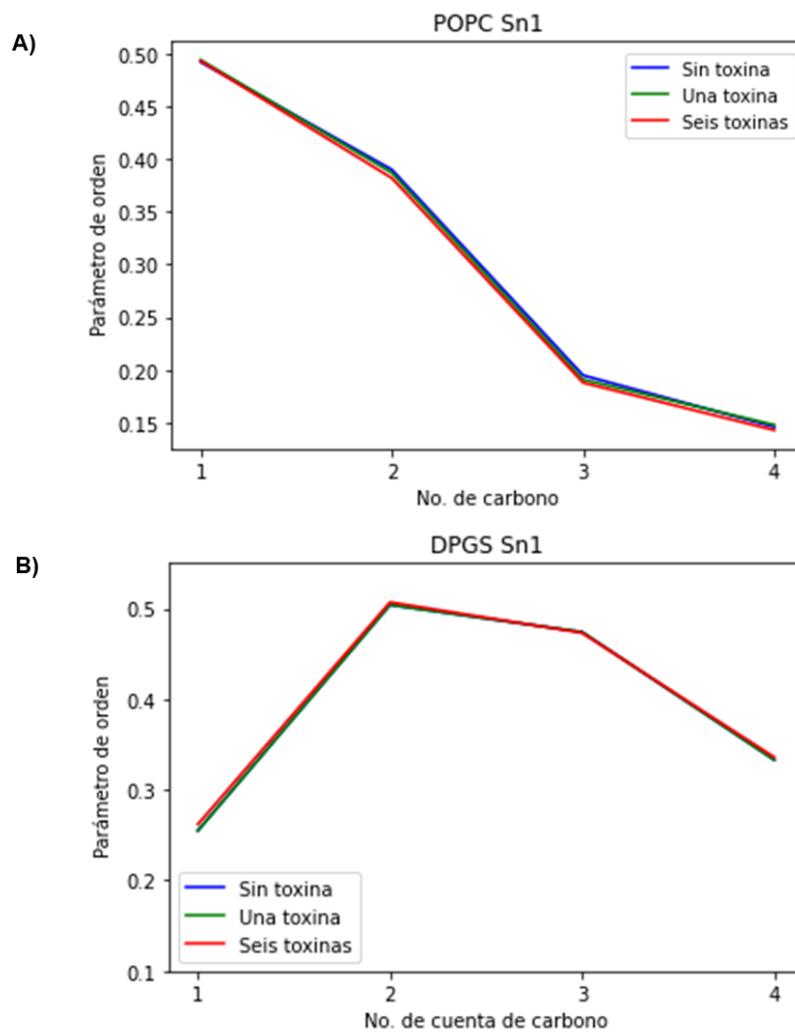


Figura 29: Parámetro de orden de las cadenas de ácidos grasos de POPC y de DPGS. A) Cadena de ácidos grasos del POPC. B) Cadena de ácidos grasos de DPGS.

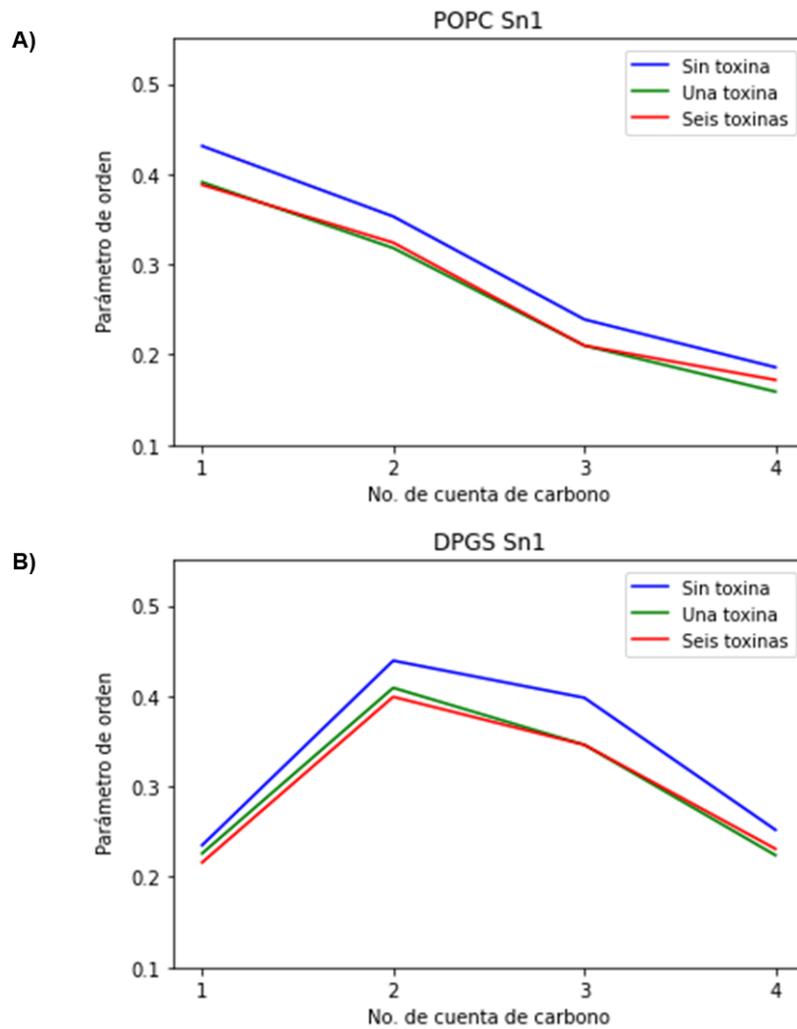


Figura 30: Parámetro de orden de las cadenas de ácidos grasos de POPC y de DPGS que componen la membrana mezcla. A) Cadena de ácidos grasos del POPC que se encuentra en la membrana mezcla. B) Cadena de ácidos grasos del DPGS que se encuentra en la membrana mezcla.

13. Bibliografía

1. Ahimsadasan, N., Reddy, V., Khan, Suheb, M. Z. (2022). *Neuroanatomy, Dorsal Root Ganglion*. Obtenido el 5 de septiembre del 2023 de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532291/>
2. Alcaino, C., Knutson, K., Gottlieb, P. A., Farrugia, G., & Beyder, A. (2017). Mechanosensitive ion channel Piezo2 is inhibited by D-GsMTx4. *Channels*, 11(3), 245–253.
3. Bae, C., Sachs, F., & Gottlieb, P. A. (2011). The Mechanosensitive Ion Channel Piezo1 Is Inhibited by the Peptide GsMTx4. *Biochemistry*, 50(29), 6295–6300.
4. Cooper, G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9898/>
5. Delmas, P., Hao, J., & Rodat-Despoix, L. (2011). Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(3), 139–153.
6. Gautam, B. (2021). *Energy Minimization*. IntechOpen.
7. Ghoufi, A., & Malfreyt, P. (2006). Calculations of the potential of mean force from molecular dynamics simulations using different methodologies: an application to the determination of the binding thermodynamic properties of an ion pair. *Molecular Physics*, 104(22-24), 3787–3799.
8. Gnanasambandam, R., Ghatak, C., Yasmann, A., Nishizawa, K., Sachs, F., Ladokhin, A. S., ... Suchyna, T. M. (2017). GsMTx4: Mechanism of Inhibiting Mechanosensitive Ion Channels. *Biophysical Journal*, 112(1), 31–45.
9. GROMACS. (s.f.). Center of Mass. Obtenido el 11 de junio del 2024 de:
<https://manual.gromacs.org/current/reference-manual/algorithms/molecular-dynamics.html>
10. Haberberger, R. V., Barry, C., Dominguez, N., & Matusica, D. (2019). Human Dorsal Root Ganglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(1).

11. Hall, A., Rog, T., Karttunen, M., & Vattulainen, I. (2010). Role of Glycolipids in Lipid Rafts: A View through Atomistic Molecular Dynamics Simulations with Galactosylceramide. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(23), 7797–7807.
12. Han, X. (2016). Mechanism of nanomachining semiconductor and ceramic blades for surgical applications. *Engineering of Nanobiomaterials*, 329–358.
13. Humphrey, W.; Dalke, A. y Schulten, K. (1996) "VMD - Visual Molecular Dynamics", *J. Molec. Graphics*, 14, 33-38.
14. Hussain, G., Wang, J., Rasul, A., Anwar, H., Imran, A., Qasim, M., ... Sun, T. (2019). Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. *Lipids in Health and Disease*, 18(1).
15. Jaalouk, D. E., & Lammerding, J. (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1), 63–73.
16. Jo, S., Lim, J. B., Klauda, J. B., & Im, W. (2009). CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. *Biophysical Journal*, 97(1), 50–58.
17. Jo, S., T. Kim, and W. Im. 2007. Automated builder and database of protein/membrane complexes for molecular dynamics simulations. *PLoS ONE*. 2:e880.
18. Kabedev, A.; Hossain, S.; Larsson, P. (2024). Molecular Dynamics Simulations as a Tool to Understand Drug Solubilization in Pharmaceutical Systems. *Comprehensive Computational Chemistry*, 865-885.
19. Koop LK, Tadi P. (2023). Neuroanatomy, Sensory Nerves. Obtenido el 5 de septiembre del 2023 de:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539846/>
20. Krassioukov, A. V. (2002). Peripheral Nervous System. *Encyclopedia of the Human Brain*, 817–830.
21. Kukol, A. (2008). *Molecular Modeling of Proteins*. Humana Press.

22. Lemkul, J. A., (2018). "From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package, v1.0". *Living J. Comp. Mol. Sci.* 1(1), 5068.
23. Lindahl, Abraham, Hess, & van der Spoel. (2020). GROMACS 2019.6 Manual (2019.6). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3685925>
24. Lukat, G., Krüger, J., & Sommer, B. (2013). APL@Voro: A Voronoi-Based Membrane Analysis Tool for GROMACS Trajectories. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(11), 2908–2925.
25. Marrink, S. J., Risselada, H. J., Yefimov, S., Tieleman, D. P., & de Vries, A. H. (2007). The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(27), 7812–7824.
26. Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarský, V., Pagliari, S., & Forte, G. (2018). Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function. *Frontiers in Physiology*, 9.
27. Moradi, S., Nowroozi, A., & Shahlaei, M. (2019). Shedding light on the structural properties of lipid bilayers using molecular dynamics simulation: a review study. *RSC Advances*, 9(8), 4644–4658.
28. Mulhall, E.M., Gharpure, A., & Lee, R.M. (2023). Direct observation of the conformational states of PIEZO1. *Nature*, 620, 1117–1125.
29. National Cancer Institute. (s.f.) Introduction to the Nervous System. Obtenido el 18 de septiembre del 2023 de:
<https://training.seer.cancer.gov/anatomy/nervous/>
30. National Cancer Institute. (s.f.) The Peripheral Nervous System. Obtenido el 18 de septiembre del 2023 de:
<https://training.seer.cancer.gov/anatomy/nervous/organization/pns.html>
31. National Institute of Health. (2018). What are the parts of the nervous system? Obtenido el 18 de septiembre del 2023 de:
<https://www.nichd.nih.gov/health/topics/neuro/conditioninfo/parts>

32. National Institute of Health. (2018). What does the nervous system do? Obtenido el 18 de septiembre del 2023 de:
<https://www.nichd.nih.gov/health/topics/neuro/conditioninfo/functions>
33. Nishizawa, K., Nishizawa, M., Gnanasambandam, R., Sachs, F., Sukharev, S. I., & Suchyna, T. M. (2015). Effects of Lys to Glu mutations in GsMTx4 on membrane binding, peptide orientation, and self-association propensity, as analyzed by molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(11), 2767–2778.
34. Nishizawa, M., & Nishizawa, K. (2007). Molecular Dynamics Simulations of a Stretch-Activated Channel Inhibitor GsMTx4 with Lipid Membranes: Two Binding Modes and Effects of Lipid Structure. *Biophysical Journal*, 92(12), 4233–4243.
35. Olsen, A. S. B., & Færgeman, N. J. (2017). Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases. *Open Biology*, 7(5), 170069.
36. Oswald, R. E., Suchyna, T. M., McFeeters, R., Gottlieb, P., & Sachs, F. (2002). Solution Structure of Peptide Toxins That Block Mechanosensitive Ion Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34443–34450.
37. Reyes-Pardo, H., & Sanchez, D. P. (2019). Mechanosensitive ion channel inhibitors promote the stiffening of the plasma membrane of mouse sensory neurons. *Soft Matter*.
38. Ridone, P., Grage, S.L., Patkunarajah, A., Battle, A.R., Ulrich, A.S. & Martinac, B. (2018) “Force-from-lipids” gating of mechanosensitive channels modulated by PUFAs. *J Mech Behav Biomed Mat* 79(1):158–167
39. Ridone, P., Vassalli, M., & Martinac, B. (2019). Piezo1 mechanosensitive channels: what are they and why are they important. *Biophysical Reviews*, 11(1), 795–805.
40. Róg, T., Vattulainen, I., Bunker, A., & Karttunen, M. (2007). Glycolipid Membranes through Atomistic Simulations: Effect of Glucose and Galactose Head Groups on Lipid Bilayer Properties. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(34), 10146–10154.

41. Saeedimazine, M., Montanino, A., Kleiven, S., & Villa, A. (2019). Role of lipid composition on the structural and mechanical features of axonal membranes: a molecular simulation study. *Scientific Reports*, 9(1).
42. Shin SM, Moehring F, Itson-Zoske B, Fan F, Stucky CL, Hogan QH, Yu H. (2021) Piezo2 mechanosensitive ion channel is located to sensory neurons and nonneuronal cells in rat peripheral sensory pathway: implications in pain. *Pain*, 162(11):2750-2768.
43. Stucky, C. L. (n.d.). IB4-Positive Neurons, Role in Inflammatory Pain. *Encyclopedia of Pain*, 952–955.
44. Szczot, M., Nickolls, A.R., Lam, R.M., Chesler, A.T. (2021) The Form and Function of PIEZO2. *Annu Rev Biochem*, 90(1), 507-534.
45. Tang, H., Zeng, R., He, E., Zhang, I., Ding, C., & Zhang, A. (2022). Piezo-Type Mechanosensitive Ion Channel Component 1 (Piezo1): A Promising Therapeutic Target and Its Modulators. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65 (9), 6441-6453.
46. Trim, C. M., Byrne, L. J., & Trim, S. A. (2021). Utilisation of compounds from venoms in drug discovery. *Progress in Medicinal Chemistry*, 1–66.
47. Tschumperlin, D. J. (2011). Mechanotransduction. *Comprehensive Physiology*, 1(1), 1057-1073.
48. Yang, Y., Pan, L., Lightstone, F. C., & Merz, K. M. (2016). The Role of Molecular Dynamics Potential of Mean Force Calculations in the Investigation of Enzyme Catalysis. *Computational Approaches for Studying Enzyme Mechanism Part A*, 1–29.
49. Zheng, L., Alhossary, A. A., Kwoh, C.-K., & Mu, Y. (2018). Molecular Dynamics and Simulation. *Reference Module in Life Sciences*.
50. Zimmerman, K. (1991). “All purpose molecular mechanics simulator and energy minimizer,” *J. Comp. Chem.*, 12 310–319 .