



**EVALUACIÓN *IN SILICO* DE TOXINAS PEPTÍDICAS DE ORIGEN  
ANIMAL CON EFECTO ANTAGONISTA SOBRE LA ACTIVIDAD  
DEL RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA)**

**KATHERIN ALEJANDRA GAMBOA RODRIGUEZ**

**Universidad Antonio Nariño**

**Facultad de Ciencias-Maestría en Bioquímica**

**Bogotá – Colombia**

**Año 2021**



**EVALUACIÓN *IN SILICO* DE TOXINAS PEPTÍDICAS DE ORIGEN ANIMAL CON EFECTO ANTAGONISTA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA)**

**KATHERIN ALEJANDRA GAMBOA RODRIGUEZ**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Bioquímica**

**Director de Tesis:** Edwin Alfredo Reyes. Ph.D.

**Codirección:** María Elisa Forero Vivas. Ph.D.

Universidad Antonio Nariño

Facultad de Ciencias-Maestría en Bioquímica

Bogotá – Colombia

Año 2021

## **Dedicatoria**

*A mi hija Ivi Violetta, Francisco, mi hermana y mis padres.*

## Contenido

Lista de Tablas	VI
Lista de Figuras	VII
Resumen	VIII
Abstract	IX
Introducción	X
1. Antecedentes	1
2. Marco teórico	5
<b>2.1 Receptor NMDA</b>	5
<b>2.2 Glutamato</b>	6
<b>2.2.1 Clasificación de los receptores de glutamato</b>	6
<b>2.2.2 Glutamato en el sistema nervioso</b>	7
<b>2.2.3 Neurodegeneración</b>	8
<b>2.2.4 Excitotoxicidad</b>	9
3. Justificación	12
4. Objetivos	13
<b>4.1 Objetivo General</b>	13
<b>4.2 Objetivos Específicos</b>	13
5. Diseño metodológico	14
5.1 Construcción de una librería de péptidos	15
<b>5.2 Predicción de la estructura tridimensional de péptidos.</b>	15
<b>5.3 Predicción de puentes disulfuro</b>	16
<b>5.4 Dinámica molecular</b>	17
<b>5.5 Identificación de segmentos de secuencias con probable interacción con el receptor NMDA</b>	18
5.6 Docking de los péptidos Tx 4-5-5_CAD, Tx4-5-5_MAI, Tx4-6-1_CGD y Tx4-6-1_AAI con la subunidad GluN2B del receptor NMDA.	19
<b>5.7 Interacciones entre los péptidos (ligandos) y el receptor NMDA</b>	19
6 Resultados y Análisis	20
6.1 Construcción de una librería de péptidos.	20
<b>6.2 Predicción de la estructura tridimensional de las toxinas peptídicas Tx4-5-5 y Tx4-6-1.</b>	22



<b>6.3</b>	<b>Predicción de puentes disulfuro</b>	25
<b>6.4</b>	<b>Dinámica molecular</b>	29
<b>6.5</b>	<b>Identificación de segmentos de secuencias con probable interacción con el receptor NMDA.</b>	33
<b>6.6</b>	<b>Docking e interacciones de los péptidos Tx 4-5-5_CAD, Tx4-5-5_MAI, Tx4-6-1_CGD y Tx4-6-1_AAI por medio del programa Autodock vina y Discovery Studios.</b>	35
7	Conclusiones	48
8.	Perspectivas	50
9.	Agradecimientos	51
10.	Referencias Bibliográficas	52
11.	Anexos	60
<b>11.1</b>	<b>Anexo 1. Comparación de la secuencia de aminoácidos de las toxinas Tx4-5-5, Tx4-6-1 de <i>Phoneutria nigriventer</i>, con canales de sodio, calcio y potasio</b>	60
<b>11.2</b>	<b>Anexo 2. Participación en el evento “Latin American Workshop in Structural Bioinformatics of Proteins”</b>	61
<b>11.3</b>	<b>Anexo 3. Certificado de participación en congreso internacional</b>	62

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Toxinas de origen animal con actividad hacia el receptor NMDA.	22
<b>Tabla 2.</b> Péptidos de las toxinas Tx 4-5-5 y Tx 4-6-1.	24
<b>Tabla 3.</b> Resultados de la predicción y comparación de puentes disulfuro para Tx4-5-5 y Tx4-6-1 según DISULFIND y Chimera	29
<b>Tabla 4.</b> Interacciones presentes en el acople del péptido Tx4-5-5_CAD con el receptor	34
<b>Tabla 5.</b> Resultados Docking Tx4-5-5_CAD.	36
<b>Tabla 6.</b> Interacciones presentes en el acople del péptido Tx4-5-5_MAI con el receptor NMDA.	38
<b>Tabla 7.</b> Resultados del Docking Tx4-5-5_MAI	41
<b>Tabla 8.</b> Resultados del Docking Tx4-6-1_CGD	41
<b>Tabla 9.</b> Interacciones presentes en el acople del péptido Tx4-6-1_CGD con el receptor NMDA.	43
<b>Tabla 10.</b> Resultados del Docking Tx4-6-1	44
<b>Tabla 11.</b> Interacciones presentes en el acople del péptido Tx4-6-1_AAI con el receptor NMDA	46

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> Estructura del receptor NMDA.	5
<b>Figura 2</b> Muerte neuronal.	11
<b>Figura 3</b> Metodología general.	14
<b>Figura 4</b> Comparación de los canales de calcio, potasio y sodio con las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1.	23
<b>Figura 5</b> Representación tridimensional de Toxina 4-5-5 (I-TASSER).	25
<b>Figura 6</b> Representación tridimensional de Toxina 4-6-1 (I-TASSER).	25
<b>Figura 7</b> Representación tridimensional de Toxina 4-5-5 (RPBS).	26
<b>Figura 8</b> Representación tridimensional de Toxina 4-6-1 (RPBS).	26
<b>Figura 9</b> Representación tridimensional de Toxina 4-5-5 (Robetta).	27
<b>Figura 10</b> Representación tridimensional de Toxina 4-6-1 (Robetta).	27
<b>Figura 11</b> Predicción tridimensional de los péptidos seleccionados	28
<b>Figura 12</b> Representación tridimensional de las distancias entre diferentes cisteínas en la toxina Tx4-6-1	30
<b>Figura 13</b> Representación tridimensional de las distancias entre diferentes cisteínas en la toxina Tx4-5-5	30
<b>Figura 14</b> Representación tridimensional de Toxina 4-5-5 con Robetta y I-TASSER	31
<b>Figura 15</b> Representación esquemática del acoplamiento e interacciones del péptido Tx4-5-5_CAD	33
<b>Figura 16.</b> Representación esquemática del acoplamiento e interacciones del péptido Tx4-5-5_MAI.	35
<b>Figura 17.</b> Representación esquemática del acoplamiento e interacciones del péptido Tx4-6-1_CGD	38
<b>Figura 18.</b> Representación esquemática del acoplamiento e interacciones del péptido Tx4-6-1_AAI	41
<b>Figura 19.</b> Estructura secundaria del péptido Tx4-5-5 durante simulaciones en agua y ciclohexano	44
<b>Figura 20.</b> Estructura secundaria del péptido Tx4-6-1 durante simulaciones en agua y ciclohexano	45

## **Resumen**

El receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDAR) constituye el principal subtipo de receptores de glutamato, implicado en procesos fisiológicos como desarrollo neuronal, transmisión y plasticidad sináptica, y en numerosas condiciones patológicas como el daño isquémico, dolor crónico, psicosis, y otros trastornos degenerativos. El NMDAR presenta una topología estructural conformada por cuatro subunidades principalmente de tipo GluN1 y GluN2(A-B). El NMDAR ionotrópico corresponde a un canal iónico-catiónico, permeable principalmente al ion calcio. Un aumento excesivo del influjo de calcio vía NMDAR genera excitotoxicidad la cual se traduce en daño y muerte neuronal. Con base en lo anterior se hace indispensable la búsqueda de moléculas que generen interacción con el receptor y específicamente con la subunidad GluN2B, modulen la actividad del receptor-canal y puedan ser reciclados o eliminados por el organismo. La presente propuesta de tesis plantea el diseño y caracterización *in silico* de péptidos derivados de toxinas de origen animal como potencial blanco el NMDAR.

El diseño incluyó el uso de herramientas computacionales de análisis, alineamientos y simulaciones de docking y dinámica molecular, lo que permitió predecir la estructura tridimensional de una serie de toxinas peptídicas y proponer péptidos derivados de estas como posibles ligandos del NMDAR.

## **Palabras claves**

NMDA, toxinas, péptido, excitotoxicidad, bioinformática, calcio intracelular.



## **Abstract**

### Abstract

The N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) constitutes the main subtype of glutamate receptors, involved in physiological processes such as neuronal development, transmission and synaptic plasticity, and in numerous pathological conditions such as ischemic damage, chronic pain, psychosis, and other degenerative disorders. The NMDAR has a structural topology consisting of four subunits mainly of the GluN1 and GluN2(A-B) type. The ionotropic NMDAR corresponds to an ionic-cation channel, permeable mainly to calcium ion. An excessive increase in calcium influx via NMDAR generates excitotoxicity which translates into neuronal damage and death. Based on the above, it is essential to search for molecules that generate interaction with the receptor and specifically with the GluN2B subunit, modulate the activity of the receptor-channel and can be recycled or eliminated by the organism. The present thesis proposal proposes the design and in silico characterization of peptides derived from animal toxins with potential targeting of the NMDAR.

The design included the use of computational analysis tools, alignments and docking and molecular dynamics simulations, which allowed predicting the three-dimensional structure of a series of peptide toxins and proposing peptides derived from them as potential NMDAR ligands.

## **Keywords**

NMDA, toxins, peptide, excitotoxicity, bioinformatics intracellular calcium.

## Introducción

La isquemia cerebral o infarto isquémico es un tipo de Accidente Cerebro Vascular (ACV) y corresponde a una de las principales causas de morbimortalidad y discapacidad física y mental en el mundo. En Estados Unidos se ha calculado que alrededor del 31% de los sobrevivientes requieren asistencia en su autocuidado, el 20% necesita ayuda para movilizarse, el 71% presenta disminución de su capacidad laboral cuando son evaluados siete años después del evento isquémico y el 16% debe permanecer recluido en instituciones neurológicas o psiquiátricas, debido a la aparición de síndromes clínicos como depresión, manía, trastorno bipolar o trastornos de ansiedad posteriores al evento isquémico (Pimienta-Jiménez, Medina-Marín, & Escobar-Betancourth, 2003) (Kronfol, 2002).

Según la Asociación Colombiana de Neurología, en Colombia el ACV es la tercera causa de muerte por enfermedad y actualmente 250 mil personas están discapacitadas por esta patología ([www.acnweb.org](http://www.acnweb.org)).

En particular el Cerebro es propenso al daño isquémico en comparación con otros tejidos y órganos del cuerpo, esto es producto de los altos niveles del neurotransmisor excitatorio glutamato presente en el tejido cerebral, además varias neuronas en su membrana plasmática tienen receptores activos a este neurotransmisor (Pimienta-Jiménez et al., 2003). En consecuencia, un periodo transitorio de isquemia cerebral (alrededor de 10 minutos) genera un daño cerebral profundo que es evidente a los 3 días *post-evento isquémico* y continua progresivamente durante meses.

De manera específica en la isquemia cerebral se produce una liberación masiva de glutamato, el cual estimula los receptores de glutamato especialmente el receptor ionotrópico NMDAR

induciendo un incremento del influjo del ion calcio, este activa una serie de cascadas de señalización intracelular que terminan en la inducción de la muerte neuronal (M. P. Parsons & Raymond, 2014), por consiguiente, la identificación de blancos y agentes terapéuticos, se hacen necesarios para controlar la progresión inevitable y efectos nocivos de la isquemia.

La presente propuesta plantea el diseño de péptidos derivados de toxinas peptídicas de origen animal que tengan como blanco el receptor NMDA. Para el diseño se hará uso de herramientas computacionales como la minería de datos, cambios puntuales, docking y dinámica molecular, lo que permitirá tener péptidos que interactúen con el NMDAR, aquellos péptidos que presenten modulación de la actividad (antagonismo) del NMDAR serán candidatos para experimentos posteriores con miras a la generación de nuevos agentes terapéuticos.

## 1. Antecedentes

Estudios indican que el aumento de los niveles de glutamato extracelular y la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica exacerbada son las principales causas de lesión neuronal durante la isquemia cerebral. El NMDAR está implicado en procesos de excitotoxicidad, relacionados con isquemia y muerte neuronal, hasta la fecha, ningún fármaco neuroprotector ha demostrado ser efectivo en estudios de ensayos clínicos de fase III (de Souza, Goncalves, Gómez, Vieira, & Ribeiro, 2018). Por esta razón, se hace necesaria la búsqueda de medicamentos que tengan actividad moduladora del receptor.

Es indispensable diseñar estrategias farmacológicas de medicamentos capaces de actuar como efectivos bloqueadores contra las consecuencias dañinas de la isquemia. Investigaciones han evidenciado que varios venenos revelan una gran cantidad de toxinas que son capaces de bloquear diferentes tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (de Souza et al., 2018).

En este sentido los tratamientos se han centrado en el diseño y empleo de diferentes antagonistas dirigidos, con acción neuroprotectora, que pueden estar dirigidos al sitio de unión de glutamato, al sitio de unión de la glicina, al sitio de unión al canal iónico o a sitios de regulación alostérica del receptor (Green, 2002) (C. G. Parsons, Danysz, & Lodge, 1970) (F. Traynelis et al., 2010) (Wang & Shuaib, 2005) (Muir, 2006).

Sin embargo, agentes bloqueadores del canal iónico (Aptiganel, Cerestat; CNS 1102), y del sitio de unión a glutamato (Ro 25-6981), presentan niveles de antagonismo que generan neuroprotección, pero afectan la función cardiovascular y alteran la cognición (efectos psicóticos) (Muir, 2006). En paralelo el antagonista Gavestinel (GV150526), dirigido al sitio



de unión a glicina, tampoco ha sido efectivo en la neuroprotección deseada. El antagonista CP-101,606 selectivo para la subunidad GluN2B es aparentemente insuficiente para protección del daño isquémico severo (Yurkewicz, Weaver, Bullock, & Marshall, 2006).

Entre los venenos, las conotoxinas del veneno del caracol marino *Conus magus* son de especial atención, una de las conotoxinas es MVIIC reduce significativamente la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y atenúa la liberación de glutamato. Por otro lado, otra  $\omega$ -conotoxina, MVIIA que es un bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N, reduce significativamente el nivel de glutamato extracelular mediante la inhibición de su liberación presináptica, así mismo el conopéptido llamado GVIA, del caracol *Conus geographus*, también ha sido evaluado por sus propiedades neuroprotectoras. Los experimentos *in vitro* demostraron que GVIA inhibe la liberación excesiva de glutamato durante la isquemia al bloquear el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N y que esta inhibición genera un efecto protector significativo en las neuronas (de Souza et al., 2018). Por su parte la Conantokina G tiene efectos neuroprotectores hacia un evento isquémico y en apoptosis inducida por estaurosporina (Williams, Dave, Lu, Ling, & Tortella, 2002). Sin embargo, los mecanismos moleculares del efecto neuroprotector de la Conantokina G en un contexto excitotóxico y, en particular, en la isquemia no han sido totalmente esclarecidos, en muchos ensayos *in vitro* e *in vivo* con el uso de la Conantokina G se ha llegado a resultados promisorios sin embargo en ensayos clínicos no ha tenido el efecto deseado, tal es el caso del uso que le dio la farmacéutica Cognetix Inc probando la Conantokina G con el nombre CGX-1007 la cual no funciono para las pruebas clínicas fase II en el tratamiento de convulsiones y epilepsia (<https://www.uniprot.org/uniprot/P07231>, 2014). Por su parte, Reyes et al., 2017 tomaron como base la secuencia de la Conantokina G para hacer un diseño computacional de péptidos que tuvieran efecto antagonista sobre la

subunidad GluN2B del receptor NMDA, pero alterando la potencia de bloqueo sobre este receptor, en este estudio se obtuvieron dos péptidos capaces de modular de forma antagonista y reversible el receptor siendo candidatos como agentes terapéuticos.

También se ha demostrado que las toxinas contenidas en el veneno de araña inhiben los canales iónicos. Por ejemplo, la araña *Phoneutria nigriventer* su veneno contiene una mezcla de toxinas que afectan los canales de iones y que han sido investigados para el tratamiento de procesos neurodegenerativos (de Souza et al., 2018).

En patologías como Alzheimer y Parkinson el agente Memantina ha presentado resultados prometedores dada su baja afinidad y rápida cinética de disociación, características que no presentan los antagonistas clásicos (Kotermanski & Johnson, 2009)

En consecuencia, la importancia en el uso de péptidos en investigación ha crecido por poseer propiedades de selectividad, eficiencia, tolerancia y relativa seguridad. En la actualidad más de 60 péptidos están disponibles en formulaciones farmacológicas y alrededor de 140 agentes peptídicos están siendo evaluados en ensayos clínicos (Fosgerau & Hoffmann, 2015). Se espera que próximas investigaciones junto con avances tecnológicos en el uso de péptidos, teniendo en cuenta péptidos multifuncionales, permanentes y conjugados, interactúen como agentes terapéuticos.

En el diseño de péptidos, el diseño racional tiene como objetivo la modificación de los mismos gracias a información previa obtenida de métodos experimentales, logrando así propiedades como atravesar barrera hematoencefálica, y dirigirse a su sitio (Fosgerau & Hoffmann, 2015). Por lo general es necesario modificar en el péptido algunas propiedades fisicoquímicas que sean semejantes con las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas

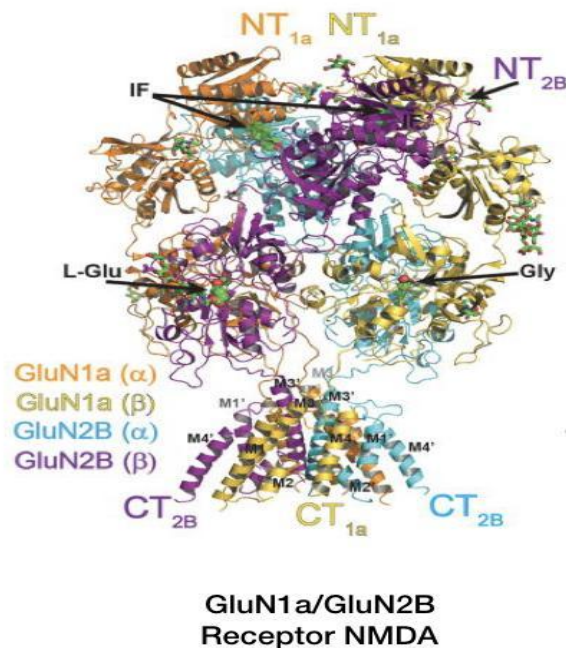
del péptido terapéutico. Las herramientas computacionales facilitan el diseño racional gracias al conocimiento de aspectos relacionados con la estructura lo que permite, el ahorro de energía, tiempo y recursos, con el conocimiento previo del comportamiento de una molécula.

Esta propuesta se encamina en el diseño de péptidos como un modelo novedoso que busca la generación de herramientas terapéuticas que involucren el NMDAR. Debido a que a la fecha no hay un tratamiento farmacológico totalmente efectivo para regular los procesos involucrados en las patologías dependientes de la actividad del NMDAR, la búsqueda de nuevos fármacos o farmacoterapias dirigidas hacia los diferentes sitios de unión que modulan la actividad del NMDAR se hacen de vital importancia.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Receptor NMDA

Los NMDAR son heterotetrámeros compuestos por dos subunidades, contiene dos subunidades obligatorias GluN1 en combinación con dos subunidades GluN2 y / o GluN3. Todas las subunidades tienen un nivel significativo de homología y están altamente relacionados en estructura, con una organización de dominio conservada. Un dominio amino-terminal extracelular (ATD) está vinculado a un dominio de unión a ligando extracelular (LBD), que está conectado a un dominio transmembrana (MD) formando el canal iónico. Las hélices transmembrana giran y se comunican con un dominio carboxi terminal intracelular (CTD) (Vyklícky et al., 2014).



**Figura 1.** Estructura del receptor NMDA. Tomada de (Karakas & Furukawa, 2014). Las subunidades GluN1a y GluN2B, marcadas como GluN1a (α), GluN1a (β), GluN2B (α), GluN2B (β) están coloreadas en naranja, amarillo, cian y púrpura, respectivamente. Los extremos amino (NT) y carboxi (CT) están ubicados en la parte superior e inferior, respectivamente. Ifenprodil (IF), ubicado en las interfaces del heterodímero ATD GluN1a / GluN2B, y los agonistas, glicina (Gly) y L-glutamato (L-Glu), alojados en el dominio LBD, se muestran como esferas verdes. (Karakas & Furukawa, 2014).



## **2.2 Glutamato**

El glutamato corresponde al principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central de los vertebrados, hecho que se derivó del establecimiento de la transmisión sináptica glutamatérgica en la década de 1950 al observarse que mediante la aplicación de glutamato monosódico en corteza cerebral se causaba despolarización masiva de células nerviosas (Shohami & Biegon, 2014) (Harreveld, 1959). Posteriormente se evidenció que la transmisión sináptica glutamatérgica a través de aminoácidos excitatorios (EAAs, por sus siglas en inglés), como el glutamato, ejercían sus funciones mediante la acción de múltiples receptores (Florey, 1954) (Scallet, Schmued, & Johannessen, 2005). Este tipo de receptores inicialmente fue clasificado de acuerdo con su activación mediante la unión de agonistas particulares o a inhibidores de la actividad con el uso de antagonistas (Florey, 1954).

### **2.2.1 Clasificación de los receptores de glutamato**

Los receptores de glutamato fueron clasificados como receptores tipo NMDA “N-Metil-D-Aspartato” y los No-NMDA. Dependiendo del agonista y antagonista los receptores No-NMDA a su vez fueron clasificados en la década de 1970 como receptores AMPA cuyo agonista es el “ $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5- metil-4-isoxazol propionato” y receptores KA para el agonista Kainato (Bowery & Smart, 2006). Posteriormente en los ochenta se observó que los receptores NMDA estaban involucrados en varias vías sinápticas importantes. La activación tanto de los receptores NMDA como de los No-NMDA estaban involucrados en un fenómeno conocido como potenciación a largo término (LTP, Long-Term Potentiation) (Bliss & Collingridge, 1993) el cual se ha asociado a cambios sinápticos como la plasticidad y ha sido

considerado como proceso importante en memoria y aprendizaje (Bianchi, Wong, & Merlin, 2013). Así mismo se observó que ciertos receptores de glutamato (GluRs) involucrados en algunos cambios bioquímicos en el cerebro, no eran susceptibles a tratamientos con antagonistas para receptores NMDA y No- NMDA, lo cual planteaba la existencia de otro tipo de receptores.

Con ayuda de técnicas de biología molecular en la década de 1990 se identificaron dos tipos de familias de receptores proteicos que se unen al glutamato; los ya mencionados receptores NMDA y No-NMDA como receptores ionotrópicos (iGluRs), estos constituyen un canal proteico que permite el flujo de iones y los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs), los cuales corresponden a segmentos transmembranales que modulan procesos a través de segundos mensajeros (Salazar Fajardo & Elenes Zepeda, 2010). La importancia del estudio de los GluRs se centra en el papel que desempeña la acumulación excesiva de glutamato endógeno y la activación de receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos.

### **2.2.2 Glutamato en el sistema nervioso**

Dentro del sistema nervioso central el glutamato actúa como principal neurotransmisor por estimulación de neuronas postsinápticas. Presenta un gran número de funciones adicionales (Michaelis, 1998) como la inducción y mantenimiento de cambios a mediano y largo plazo en la plasticidad sináptica, y en procesos asociados a aprendizaje y memoria (Asztély & Gustafsson, 1996). El tejido cerebral tiene una notable capacidad para acumular glutamato, resultado de las proteínas transportadoras de glutamato (GluTPs) presentes en las membranas plasmáticas de las células gliales y neuronas.

Los GluTPs incorporan glutamato en las células junto con el co-transporte de tres iones de sodio y antiporte de un ion de potasio, así como de un hidroxilo o un ion bicarbonato. El exceso de iones sodio genera una corriente interna neta positiva, que impulsa el transporte (Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C., Beck, 1992). Sasaki y Kaneko en 1996, realizaron estudios de marcaje de glutamato encontrando que la concentración promedio de glutamato en células gliales es de 5 mM. Estudios fisiológicos utilizando células aisladas indican que sólo niveles en  $\mu\text{M}$  de glutamato son necesarios para activar los receptores de glutamato (GluR) (Aizenman, Frosch, & Lipton, 1988) (Sasaki & Kaneko, 1996). Por lo tanto, la cantidad de glutamato liberada en la hendidura sináptica es muy superior a la concentración requerida para la activación de la mayoría de los receptores postsinápticos. Así que los niveles de glutamato intrasináptico deben mantenerse bajos para maximizar la relación señal-ruido en la liberación de glutamato en las terminales nerviosas, y reducir al mínimo el riesgo de excitotoxicidad glutamatérgica como consecuencia de la excesiva estimulación de las neuronas sensibles. Por tanto, el metabolismo del glutamato es fundamental (Brosnan, 2018).

### **2.2.3 Neurodegeneración**

El glutamato endógeno liberado en exceso por las neuronas puede contribuir a la neurodegeneración aguda relacionada con isquemia cerebral o traumatismos y en procesos de muerte celular en enfermedades neurodegenerativas crónicas (Meldrum, 2018). El mecanismo principal que parece mediar la neurotoxicidad aguda es el desequilibrio iónico debido a una entrada excesiva de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , a través de canales iónicos. Con relación a los

GluRs este proceso se denomina excitotoxicidad y se ha demostrado como un mecanismo fisiopatológico en el desarrollo de neurodegeneración tras traumatismos, isquemia y otras enfermedades neurológicas (Kemp & McKernan, 2002).

Debido a que los iGluRs son canales iónicos selectivos a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , cualquier estimulación sostenida resulta en un desequilibrio osmótico debido a la entrada excesiva de iones y agua. Los receptores NMDA tienen una participación particularmente importante al conducir iones  $\text{Ca}^{2+}$ , que son cruciales y determinantes del daño (Bleich, Römer, Wiltfang, & Kornhuber, 2003). Como se observa en la figura 2, la alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  activa varias cascadas enzimáticas que incluyen a las fosfolipasas, proteína kinasa C (PKC), proteasas, óxido nítrico sintasa (NOS) y la generación de radicales libres. Tras la activación de la fosfolipasa A2, se genera ácido araquidónico, en conjunto con sus metabolitos y factores activadores de plaquetas. Los factores activadores de plaquetas incrementan los niveles de calcio neuronal, debido a que estimulan la liberación de glutamato. El ácido araquidónico potencia las corrientes evocadas por NMDA e inhibe la reabsorción de glutamato por astrocitos y neuronas. Este proceso se incrementa, creando un feedback positivo donde se forman radicales libres (durante el metabolismo del ácido araquidónico), que lleva a mayor activación de fosfolipasa A2 (Gill & Pulido, 2001).

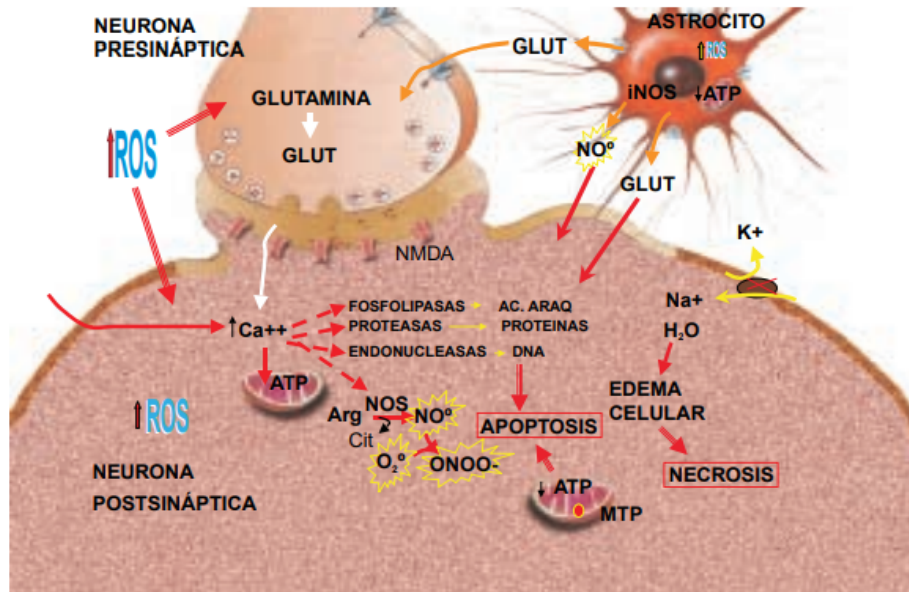
#### **2.2.4 Excitotoxicidad**

La elevada concentración de glutamato extracelular contribuye a una activación sostenida de los iGluRs (Gill & Pulido, 2001). La concentración elevada de  $\text{Ca}^{2+}$ , eleva el óxido nítrico por la vía de la activación de NOS por calmodulinas, lo cual genera radicales de oxígeno. En vista de que los receptores AMPA son ciertamente permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ , y el mecanismo de



activación del óxido nítrico es  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente, se ha postulado que la activación de este puede formar parte de mecanismos de lesión en todos los tejidos (Gill & Pulido, 2001). Se ha planteado que la enzima GPT (transaminasa glutamato-piruvato) es capaz de degradar bajo condiciones fisiológicas, concentraciones neurotóxicas de glutamato (Matthews, Zielke, Wollack, & Fishman, 2000) con lo cual evitaría el desarrollo de excitotoxicidad en algunos tejidos.

El aumento intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  también estimula la conversión de xantina deshidrogenasa (XDH) en xantina oxidasa (XO). La entrada masiva de  $\text{Ca}^{+2}$  a la mitocondria hace que se forme el poro de transición en la membrana mitocondrial interna (MTP), llevando a un colapso en el potencial electroquímico de protones, lo que provoca una disminución en los niveles de ATP y un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS). La disminución en la producción de ATP resulta en una despolarización de la membrana plasmática y la entrada de más  $\text{Ca}^{2+}$  a través de varios canales iónicos creando un ciclo que lleva a la pérdida de la función neuronal y muerte de la célula (Francis, 2005).



**Figura 2.** Muerte neuronal. Tomada de (Gill & Pulido, 2001). Secuencia de eventos que ocurren durante el daño que lleva a la muerte neuronal (Mellor, 2003). Los aumentos en los niveles de ROS producen que la neurona presináptica libere el neurotransmisor excitatorio glutamato que es captado por el receptor NMDA en la neurona postsináptica, la liberación de glutamato (Glut) junto con la presencia de especies reactivas llevan a un aumento de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$  que activa a fosfolipasas, proteasas, y endonucleasas, así como a la sintasa del óxido nítrico (NOS). El aumento de los niveles de calcio y óxido nítrico en la mitocondria hace que disminuya la producción de ATP y se forme el poro de transición mitocondrial (MTP).

Estudios en modelos animales han revelado que el uso de antagonistas de los receptores NMDA y AMPA protege contra el daño cerebral agudo y retrasa anomalías de comportamiento, lo que potenciaría el uso de los receptores de glutamato como blancos farmacológicos (Meldrum, 2018).

### **3. Justificación**

El receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDAR) constituye el principal subtipo de receptores de glutamato, implicado en procesos fisiológicos como desarrollo neuronal, transmisión y plasticidad sináptica, en numerosas condiciones patológicas como el daño isquémico, dolor crónico, psicosis, y otros trastornos degenerativos. El NMDAR ionotrópico corresponde a un canal iónico-catiónico, permeable principalmente al ion calcio. La entrada del ion calcio conlleva a la activación de una serie de proteínas y segundos mensajeros que modulan procesos neurofisiológicos como la transmisión sináptica excitatoria rápida siendo, por lo tanto, esencial para el funcionamiento normal del sistema nervioso central. Un aumento excesivo del influjo de calcio vía NMDAR genera excitotoxicidad la cual se traduce en daño y muerte neuronal (Doctoral, n.d.) (Flores-Soto et al., 2012).

El NMDAR presenta una topología estructural conformada por cuatro subunidades principalmente de tipo GluN1 y GluN2. Se ha descrito que el subtipo GluN2B está implicado en la modulación y apertura del canal iónico de calcio, convirtiéndolo en un blanco para generar moléculas dirigidas a la modulación de la actividad del NMDAR y, por lo tanto, a la regulación de la entrada del ion calcio (Zhou & Sheng, 2013). En este sentido, se desea hacer un diseño de péptidos basados en la secuencia de toxinas peptídicas de origen animal que presenten selectividad y antagonismo por la subunidad GluN2B. Debido a la potencia de bloqueo de muchas de estas toxinas hacia el NMDAR, es necesario diseñar péptidos que busquen una modulación del canal, más que un bloqueo total. El diseño está dirigido a buscar péptidos que generen interacción con la subunidad GluN2B, modulen la actividad del receptor-canal y puedan ser reciclados o eliminados por el organismo (Lareo, 2006).

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo General**

Caracterizar y evaluar *in silico* toxinas peptídicas de origen animal con efecto antagonista sobre la actividad del receptor NMDA.

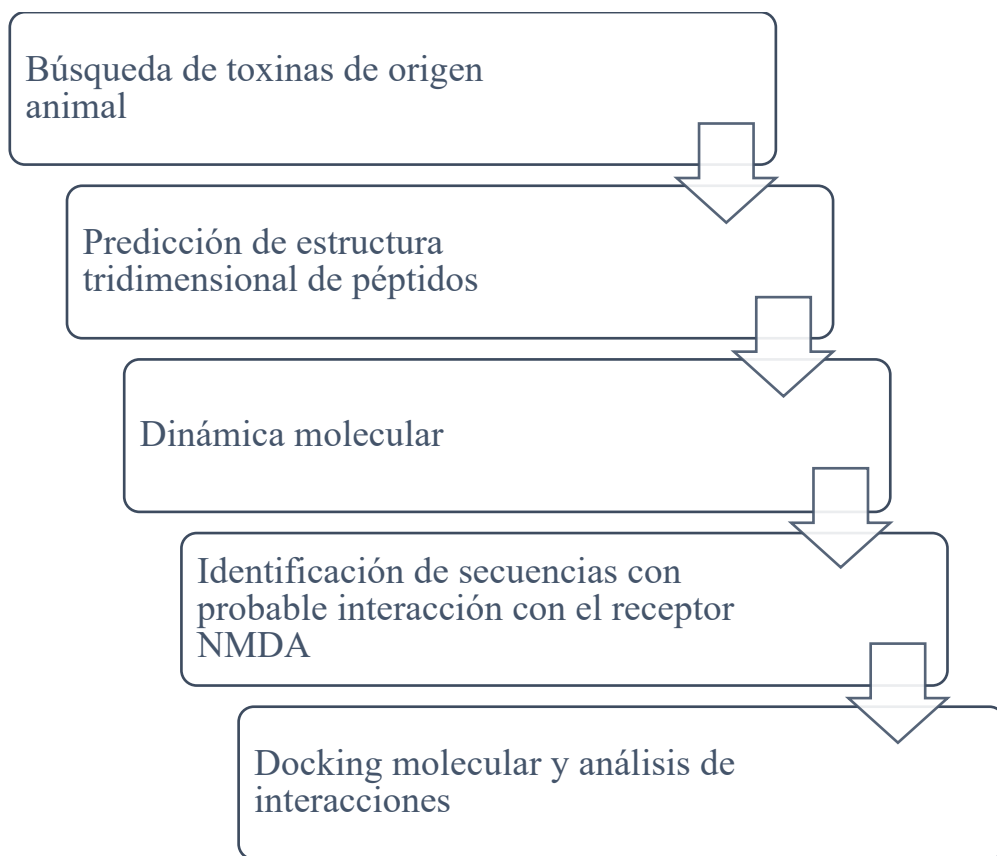
### **4.2 Objetivos Específicos**

4.2.1. Predecir la estructura tridimensional de toxinas peptídicas de origen animal con blanco el receptor NMDA.

4.2.2. Diseñar péptidos sintéticos a partir de la secuencia de toxinas de origen animal con el dominio de unión al ligando de la subunidad GluN2B.

## 5. Diseño metodológico

**Figura 3.** Diagrama de la Metodología. La metodología general que se desarrolló en la presente propuesta se describe en el siguiente diagrama.



## 5.1 Construcción de una librería de péptidos

Para el diseño de los péptidos se inició tomando como base las secuencias de péptidos que corresponden a toxinas de origen animal y que están reportadas con actividad antagonica hacia el receptor NMDA. La base de datos o librería de péptidos se construyó por medio de diferentes fuentes científicas, relacionando origen, estructura, actividad frente al receptor, el IC50, y fuentes donde se ha reportado la actividad de cada toxina. Algunas bases de datos y artículos consultados fueron:

- <http://www.arachnoserver.org>
- <http://www.arachnoserver.org/fastas.html>
- <http://www.conoserver.org>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30378475>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29527170>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30533488>.

Para la selección preliminar o filtrado de la librería de péptidos, se seleccionaron las toxinas que correspondieran a péptidos con actividad antagonica frente al receptor NMDA. De esta manera se seleccionó a las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1 de la especie *Phoneutria nigriventer*.

## 5.2 Predicción de la estructura tridimensional de péptidos.

Una vez identificadas a las toxinas de *Phoneutria nigriventer*, se realizó búsqueda de reportes experimentales de la estructura tridimensional de cada toxina en la base de datos de proteínas Protein Data Bank (PDB), sin embargo, no se encontró reportes por lo que se procedió a realizar una predicción estructural.

Para la predicción de la estructura 3D se utilizaron tres programas de modelamiento y uno de dinámica molecular, lo que permitió hacer comparaciones entre los resultados. Se usó el programa I.TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). El programa RPBS (PEP-FOLD 2.0, <https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>) y Robetta (<https://rosetta.bakerlab.org/>). Para la dinámica molecular se usó el programa GROMACS. En todos los casos se realizó análisis de las conformaciones y la estereoisomería mediante diagramas de Ramachandran y en el caso de GROMACS, se analizaron gráficas de estructura secundaria a lo largo de la simulación.

### 5.3 Predicción de puentes disulfuro

Las toxinas seleccionadas de *Phoneutria nigriventer* (Tx4-5-5 y Tx4-6-1) son ricas en cisteínas, por lo que pueden tener una homología con toxinas reportadas de la misma especie que tienen puentes disulfuro. Por tanto, se realizó predicción de puentes disulfuro usando el programa DISULFIND (<http://disulfind.disi.unitn.it/>).

Además de estos predictores y usando el programa Clustal Omega se realizaron alineamientos múltiples de Tx4-5-5 y Tx4-6-1 con las toxinas Tx2-5 y Tx2-6 de las que hay reporte experimental de puentes disulfuro (Matavel *et al.*, (2009), (Paiva *et al.*, 2016)). Posteriormente y con los modelos tridimensionales obtenidos por homología se forzó la formación de puentes disulfuro en UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>). Con estos modelos se realizaron dinámicas moleculares con el fin de determinar si las estructuras adoptan una conformación coherente teniendo presente los puentes disulfuro.

## 5.4 Dinámica molecular

Para las dinámicas moleculares (DM) se utilizaron las dos toxinas peptídicas Tx4-5-5 y Tx4-6-1. Se utilizó el servidor Robetta para determinar por homología la estructura 3D de los dos péptidos y predecir los residuos Cys involucrados en puentes disulfuros. Robetta encontró dos conformaciones para Tx4-5-5 con 2 y 3 puentes disulfuros y una conformación para Tx4-6-1 con 2 puentes disulfuros. Se corrieron simulaciones de DM en agua explícita para evaluar la estabilidad de estas conformaciones y encontrar las conformaciones estadísticamente más relevantes de los péptidos con puentes disulfuros.

Para eliminar los riesgos de sesgo conformacional, se corrió una simulación de dinámica molecular para cada péptido a partir de su conformación completamente extendida. Estas simulaciones se realizaron en solvente implícito durante 1  $\mu$ s. La conformación final se usó como punto de partida para simulaciones de DM de 1  $\mu$ s en agua explícita con el fin de eliminar posibles artefactos debidos al modelo de solvente implícito y así se determinó por análisis de agrupamiento las conformaciones estadísticamente más relevantes de los péptidos.

Se utilizó el campo de fuerza Amber99 con las mejoras SB \* ILDN. Los enlaces de los péptidos y del ciclohexano se restringieron usando el algoritmo LINCS mientras que el enlace y el ángulo de las moléculas de agua se restringieron usando el algoritmo SETTLE. Se utilizó un intervalo de tiempo de 2 fs para integrar las ecuaciones de movimientos. Las simulaciones utilizaron condiciones de contorno periódicas y un conjunto NPT con una temperatura de 300 K y una presión de 1 bar. Las interacciones coulombicas de largo alcance se evaluaron utilizando el algoritmo de Ewald de malla de partículas



Finalmente, al interactuar con el receptor NMDA los péptidos se encuentran en un entorno mucho más hidrofóbico, el cuál influye en el balance de interacciones y puede llevar a favorecer otras conformaciones que las que se encuentran más estables en agua. Para evaluar este efecto, se realizaron simulaciones de DM para los péptidos en un solvente explícito hidrofóbico de ciclohexano. Todas las simulaciones de DM se corrieron utilizando el programa de (DM) GROMACS versión 4.5.7 (solvente implícito) y versión 2018.5 (solvente explícito).

### **5.5 Identificación de segmentos de secuencias con probable interacción con el receptor NMDA**

Para la identificación de las secuencias con probable interacción con el receptor NMDA se realizaron alineamientos múltiples por medio del programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) versión 1.2.4. Se comparó entre las secuencias de las toxinas de la especie *Phoneutria nigriventer*, Tx4-5-5 (CADINGACKSD CDCCGDSVTDCDCYWSDSCKCRESNFKIGMAIRKKFC) y Tx4-6-1 (CGDINAACKEDCDDCGYTTACDCYWSKSKCREAAIVIY TAPKKKLTC) con las toxinas Tx1, Tx2-1 y Tx3-1 de la misma especie y que tienen antagonismo hacia canales de calcio, sodio y potasio respectivamente. Lo anterior permitió identificar los aminoácidos específicos de las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1 que probablemente interactúan y le confieren su acción antagonista frente al receptor NMDA. Esas secuencias fueron denominadas como Tx 4-5-5\_CAD, Tx4-5-5\_MAI, Tx4-6-1\_CGD y Tx4-6-1\_AAI.

## **5.6 Docking de los péptidos Tx 4-5-5\_CAD, Tx4-5-5\_MAI, Tx4-6-1\_CGD y Tx4-6-1\_AAI con la subunidad GluN2B del receptor NMDA.**

Para evaluar como los segmentos de péptidos de las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1 podrían unirse al receptor NMDA y específicamente a la subunidad GluN2B, se realizaron simulaciones de Acoplamiento Molecular (Docking) usando el programa “Autodock Vina” (<http://vina.scripps.edu/>). Para las simulaciones se usó como receptor la estructura cristalográfica reportada para el receptor NMDA con código PDB 4PE5 (Protein Data Bank, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) que corresponde a la estructura con secuencia más cercana al receptor NMDA original. Se realizó la preparación de la estructura donde se eliminaron moléculas de agua, iones y cofactores además de la asignación de átomos de hidrógeno y cargas formales. Las estructuras 3D de los péptidos fueron creados en UCSF Chimera. El docking se realizó en el dominio de unión al ligando de la subunidad GluN2B con un GridBox que permitió la exploración de cada péptido (ligando). Los resultados que arrojó Autodock Vina se visualizaron en UCSF Chimera y muestran las mejores poses (configuración y orientación) con valores de energía de unión más bajos en Kcal/mol, junto con los valores de la desviación de la media cuadrática o RMSD (root-mean-square deviation) entre conformaciones.

## **5.7 Interacciones entre los péptidos (ligandos) y el receptor NMDA**

Una vez realizado los docking se hizo determinación de interacciones entre los ligandos (péptidos) y el receptor. Se uso el programa Discovery Studio (<https://discover.3ds.com/>), a partir de los complejos ligando-receptor (resultados del docking). Se evaluaron las diferentes interacciones que estabilizaron a cada péptido y se generaron los mapas de interacciones en 2D y visualizaciones en 3D.

## 6 Resultados y Análisis

### 6.1 Construcción de una librería de péptidos.

Los criterios de búsqueda de moléculas que se tuvieron en cuenta en este trabajo fueron que correspondieran a toxinas de origen animal y que tuvieran un efecto, principalmente antagonista sobre la actividad del receptor NMDA. Después de realizar una búsqueda en diferentes bases de datos especializadas en toxinas y en literatura científica, el resultado fue 11 toxinas de origen animal, algunas de origen peptídico y otras correspondientes a poliaminas y presentes en su mayoría en artrópodos y en menor proporción en moluscos (Tabla 1). En estos últimos, sin embargo, sus toxinas han sido ampliamente estudiadas, como es el caso de las Conantokinas en sus varios tipos (de Souza et al., 2018). Por tanto, el interés se centró en toxinas poco estudiadas y que correspondieran a péptidos, así, se seleccionaron las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1 de la araña *Phoneutria nigriventer* para hacer una caracterización *in silico* y proponer péptidos capaces de interactuar con el receptor NMDA.

Figueredo *et al* (2015), indican que dichas toxinas actúan en el sistema glutamatérgico de insectos y mamíferos, así mismo describen que la toxina Tx4-5-5 inhibe el receptor NMDA en neuronas cerebrales. En este estudio muestran también que las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1 presentan una identidad del 64% en su secuencia, caracterizados por la presencia de un residuo de cisteínas en sus extremos C y N terminal (Tx4-5-5 (CADINGACKSD CDCCGDSVTCDCYWSDSCKCRESNFKIGMAIRKKFC) y Tx4-6-1 (CGDINAACKEDCDDCGYTTACDCYWSKSKCREAAIVIYITAPKKKLTLC)).

**Tabla 1.** Toxinas de origen animal con actividad hacia el receptor NMDA.

<b>Base de datos de Toxinas de origen animal con actividad hacia el receptor NMDA</b>				
<b>Especie animal</b>	<b>Toxina</b>	<b>Tipo de toxina</b>	<b>Actividad</b>	<b>IC50</b>
Molusco	Conantokina G	Péptido	Bloquea el receptor NMDA subunidad GluN2A	487 ± 85 (nM)
Molusco	Conantokina T	Péptido	Bloquea el receptor NMDA subunidad GluN2A	030 ± 130 (nM)
Artrópodo	Delta-ctenitoxin-Pn1a  PnTx 4-6-1	Péptido	Inhibe de manera reversible el N-metil-D-aspartato (NMDA)	no reporta
Artrópodo	GAMMA-ctenitoxin-Pn1a PnTx4-5-5	Péptido	Inhibe de manera reversible el N-metil-D-aspartato (NMDA)	no reporta
Artrópodo	Jorotoxina	Poliaminas	Bloquea el receptor NMDA subunidad GluN2A	1710 [1287–2271](nM)
Artrópodo	Ctenitoxin- Pb48	Péptido	Posible efecto protector sobre el receptor NMDA	no reporta
Artrópodo	Ctenitoxin- Pb53	Péptido	Posible efecto protector sobre el receptor NMDA	no reporta
Artrópodo	Nefilatoxina-8 (NPTX-8, 5),	Poliaminas	Bloquea el receptor NMDA subunidad GluN1A/2A	150 [144–154] (nM)
Artrópodo	Argiotoxina ArgTX-636	Poliaminas	Bloquea el receptor NMDA subunidad GluN1A/2A	177 [153–205](nM)
Avispa	Filanotoxina PnTx 4-3-3	Poliaminas	no reporta	no reporta
Artrópodo	Clavamine	Poliaminas	Bloquea el receptor NMDA subunidad GluN1A/2A	>10000 (nM)

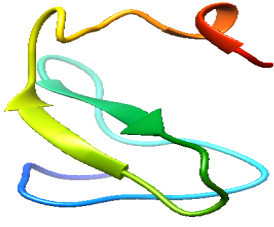
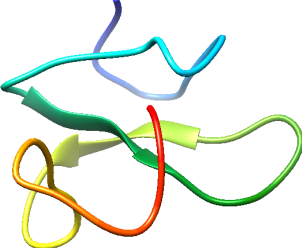
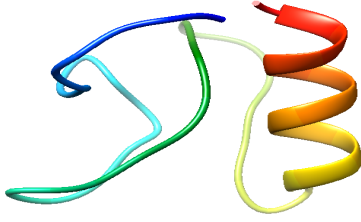
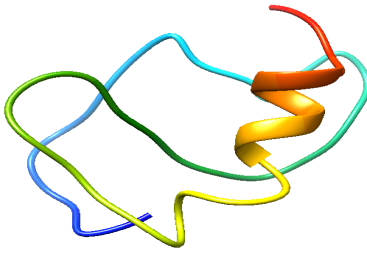
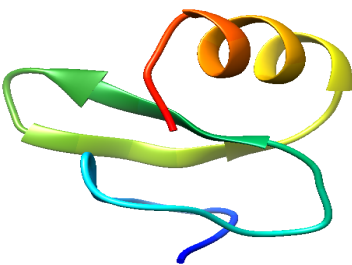
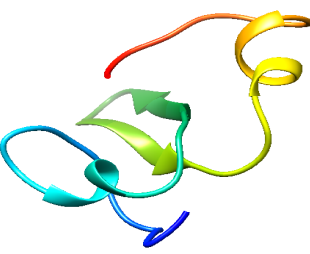
Figueredo *et al* 2001, en su estudio titulado “Purificación y secuencia de aminoácidos de una toxina altamente insecticida del veneno de la araña brasilera *Phoneutria nigriventer* que inhibe las corrientes evocadas por NMDA en las neuronas del hipocampo de rata”, aisló la toxina Tx4-5-5, determinando que es una cadena polipeptídica compuesta por 47 residuos de

aminoácidos incluidas 10 cisteínas; además en de estudios electrofisiológicos, esta toxina, Tx4-5-5, inhibió de manera reversible el receptor NMDA a una concentración de 1 $\mu$ M. Por su parte la toxina Tx4-6-1 tiene 48 residuos y también es una toxina rica en cisteínas.

## **6.2 Predicción de la estructura tridimensional de las toxinas peptídicas Tx4-5-5 y Tx4-6-1.**

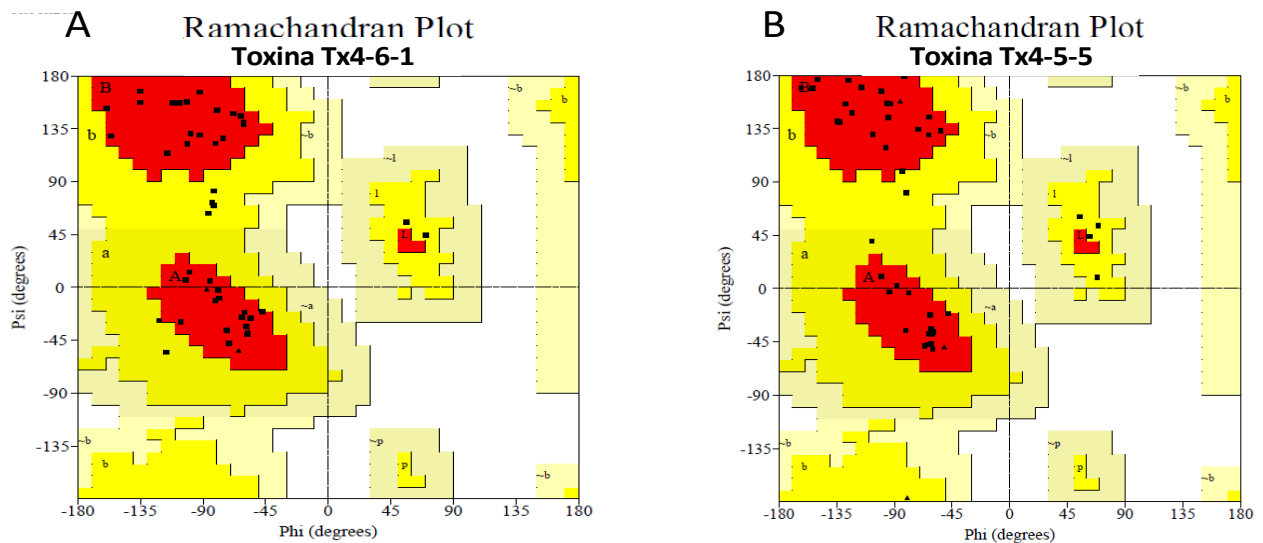
En cuanto a elucidación estructural experimental para las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1, no se encuentran reportes en bases de datos especializadas como lo es PDB. De acuerdo con lo anterior, se propuso hacer la predicción estructural por medio de herramientas bioinformáticas de cada una de las toxinas seleccionadas. Para obtener correspondencias entre los resultados de la predicción se usaron tres programas que incluyen en sus algoritmos la predicción por homología principalmente (I-TASSER, RPBS y Robetta). Los resultados de I-TASSER muestran para las dos toxinas la presencia de 2 hojas beta antiparalelas como estructura secundaria principal, con grandes zonas irregulares (Tabla 2). RPBS, en contraposición arroja modelos en los que se observa la formación de hélices alfa en los extremos C-terminal de las dos toxinas, con una hélice más grande para Tx4-5-5. Por su parte, Robetta, muestra unos resultados con presencia de hélices alfa y hojas beta antiparalelas para las dos toxinas.

**Tabla 2.** Modelos tridimensionales obtenidos por I-TASSER, RPBS y Robetta para las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1.

<b>Toxina</b> <b>Programa</b>	<b>Tx4-5-5</b>	<b>Tx4-6-1</b>
<b>I-TASSER</b>		
<b>RPBS</b> <b>(PEP-FOLD 2.0)</b>		
<b>Robetta</b>		

Si se evalúa ahora la estereoisomería y calidad de cada modelo usando el diagrama de Ramachandran, se encuentra que para Tx4-6-1 por Robetta predice un 81.4% de residuos en las regiones más favorecidas siendo esta la mejor predicción comparado con un 55.8% para la estructura de RPBS y un 41.9% para la estructura de I-TASSER (Figura 4). Para Tx4-5-5 por Robetta predice un 83.3 % de residuos en las regiones más favorecidas siendo esta la

mejor predicción comparado con un 61.9% para la estructura de RPBS y un 59.5% para la estructura de I-TASSER (Figura 4).



**Figura 4.** Diagramas de Ramachandran para los modelos estructurales obtenidos por Robetta para las toxinas Tx4-6-1 (A) y Tx4-5-5 (B).

La herramienta PROCHECK para el cálculo de diagramas de Ramachandran indica que un modelo de buena calidad está con más del 90% de residuos en las regiones más favorecidas. Partiendo de estos resultados se puede decir que la estructura obtenida por medio de la herramienta informática de Robetta es la que más se acerca a predicciones estructurales con buena calidad. Robetta, además permite que dominios sin un homólogo PDB detectable o plantilla se puedan modelar usando un protocolo denominado Rosetta de novo (Simons, Kooperberg, Huang, & Baker, 1997), (Bradley, Misura, & Baker, 2005), arrojando las mejores predicciones en relación con estructura comparados con las demás herramientas bioinformáticas utilizadas para predicción 3D.

### 6.3 Predicción de puentes disulfuro

Como se observó en las secuencias de las toxinas peptídicas Tx4-5-5 y Tx4-6-1, estas son ricas en cisteínas, y la formación de puentes disulfuro que estabilizan la estructura corresponde a una característica de varias toxinas de origen animal (Fang et al., 2018). Por tanto, la predicción de puentes disulfuro en las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1 resulta importante. Varios predictores de puentes disulfuro usan la secuencia primaria para lograr esa predicción bastante útil para el estudio de las propiedades estructurales y funcionales de péptidos y proteínas específicas. Además, el conocimiento sobre el número de puentes disulfuro también ayuda a la determinación experimental de la estructura de proteínas.

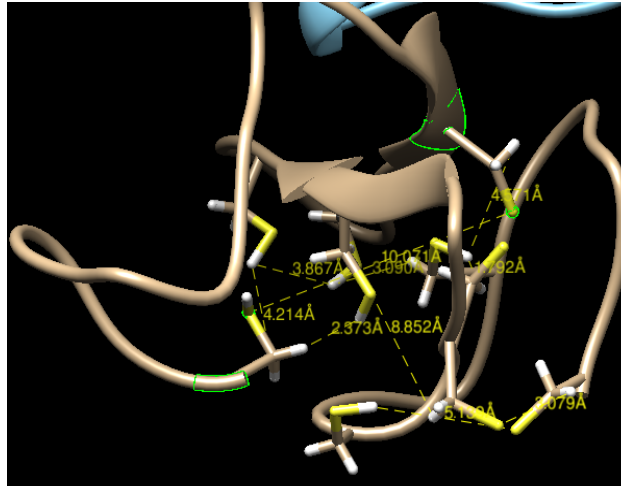
Teniendo la predicción del programa DISULFIND (Tabla 3) se compararon las distancias de dichos puentes en los modelos arrojados por I-TASSER, por medio del programa Chimera (Figura 5 y 6), dicha comparación permitió establecer la distancia en el modelo tridimensional, y concluir si pueden o no formar puentes disulfuro, teniendo en cuenta, además que la distancia máxima entre los átomos de azufre de las dos cisteínas que forman dicho enlace es 2.8 Å (Mansbach, Travers, McMahon, Fair, & Gnanakaran, 1923).

**Tabla 3.** Resultados de la predicción y comparación de puentes disulfuro para Tx4-5-5 y Tx4-6-1 según DISULFIND y Chimera

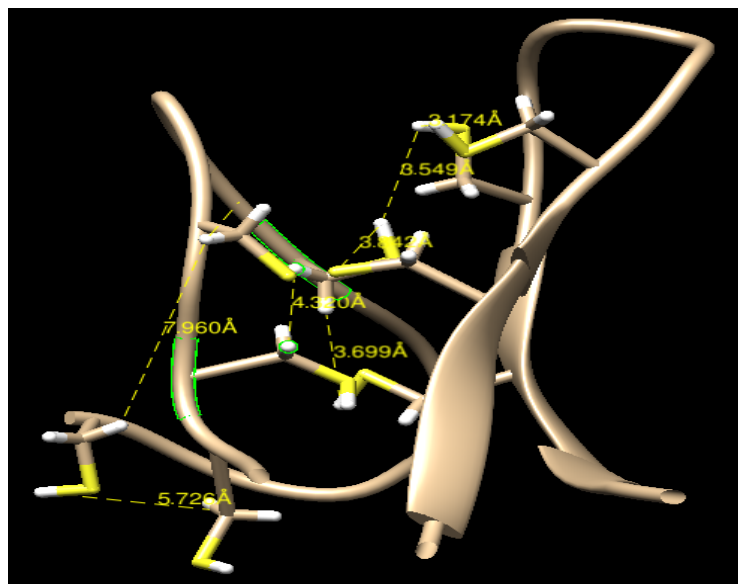
<b>Toxinas</b>	<b>Disulfind (Posición de las cisteínas)</b>	<b>Chimera (distancia entre cisteína)</b>
<b>Tx4-5-5.</b>	1, 12	7,960 Å
	8,14	4,320 Å
	15, 21	10,651 Å
	23, 29	3,174 Å
<b>Tx 4-6-1.</b>	1, 12	5,139 Å
	8, 14	1,792 Å
	15, 21	8,852 Å
	23, 29	3.867 Å



La predicción indica la formación de 4 puentes disulfuro para cada toxina, Sin embargo, al medir la distancia entre cada átomo de azufre de los pares de cisteínas se observa que el único puente plausible en el modelo arrojado por I-TASSER es entre la cisteína 8 y 14 (1,792 Å) de la toxina Tx4-6-1.



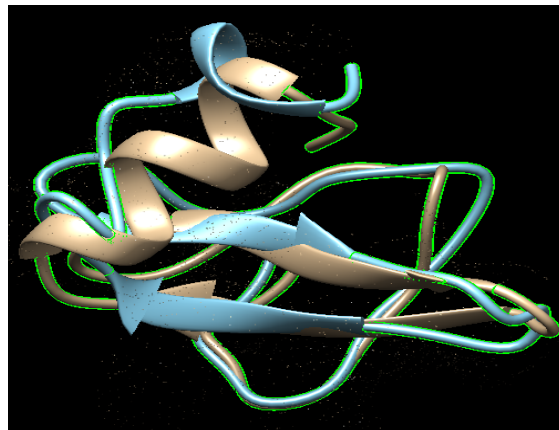
**Figura 5.** Representación tridimensional de las distancias entre diferentes cisteínas en la toxina Tx4-6-1.



**Figura 6.** Representación tridimensional de las distancias entre diferentes cisteínas en la toxina Tx4-5-5.

Con las representaciones anteriores se logró apreciar que las predicciones hechas por DISULFIND no permiten establecer conexiones de puentes disulfuro según los modelos arrojados por el programa I-TASSER.

Por medio de la herramienta bioinformática Chimera, se compararon las estructuras tridimensionales dadas por I-TASSER y Robetta, teniendo como resultado una similitud en relación con la estructura, con una diferencia en la estabilidad de la hélice alfa. Los resultados a nivel del modelo estructural obtenido por Robetta son comparables a modelos propuestos previamente por (Paiva *et al.*, 2016), para Pntx2-5 y PnTx2-6 que corresponden a toxinas de la misma familia. Estos resultados indican una mejor conformación estructural a nivel de estructura secundaria con una hélice alfa en el carboxilo terminal (Figura 7).

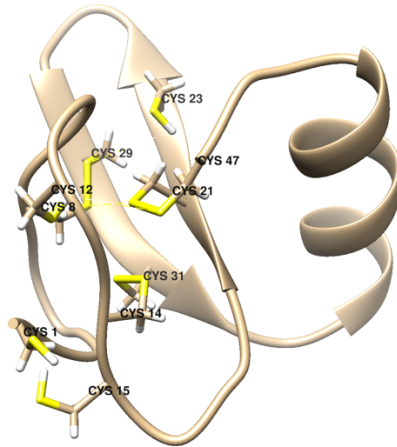


**Figura 7.** Comparación de la representación tridimensional de la Toxina 4-5-5 con Robetta (beige) y I-TASSER (Azul).

A partir de las toxinas Tx2-5 y Tx2-6 de las que hay reporte experimental de puentes disulfuro (Matavel *et al.*, 2009), se realizaron alineamientos de estas toxinas, con Tx4-5-5 y con Tx4-6-1; con los resultados obtenidos se propone que los puentes disulfuro podrían estar en las mismas posiciones. Al revisar las posiciones de las cisteínas en los modelos y la probabilidad de formar puentes disulfuro, se encontró que el modelo más probable es el obtenido por

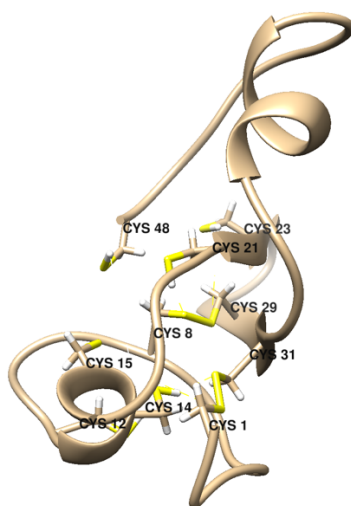
Robetta, por tanto, se forzó la formación de puentes disulfuro en UCSF Chimera donde el modelo para Tx4-5-5 es más probable conformacionalmente que el de Robetta para tx4-6-1.

En la toxina Tx4-5-5 se pueden formar tres puentes disulfuro entre las cisteínas 8-29, 14-31 y 21-47 (Figura 8). Las demás cisteínas a pesar de que están aparentemente enfrentadas la distancia entre ellas no permiten generar el enlace.



**Figura 8.** Formación de puentes disulfuro entre cisteínas del modelo por homología obtenido por Robetta para la toxina Tx-4-5-5.

En cuanto al modelo tridimensional de Robetta para la toxina Tx4-6-1 (Figura 9), se observa la formación de dos puentes disulfuro entre las cisteínas de las posiciones 1-31 y 8-29, las demás cisteínas están enfrentadas y si hay ligeros cambios conformacionales podrían llegar a formarse. Por tanto, la exploración de esos cambios conformacionales mediante dinámicas moleculares resulta interesante.



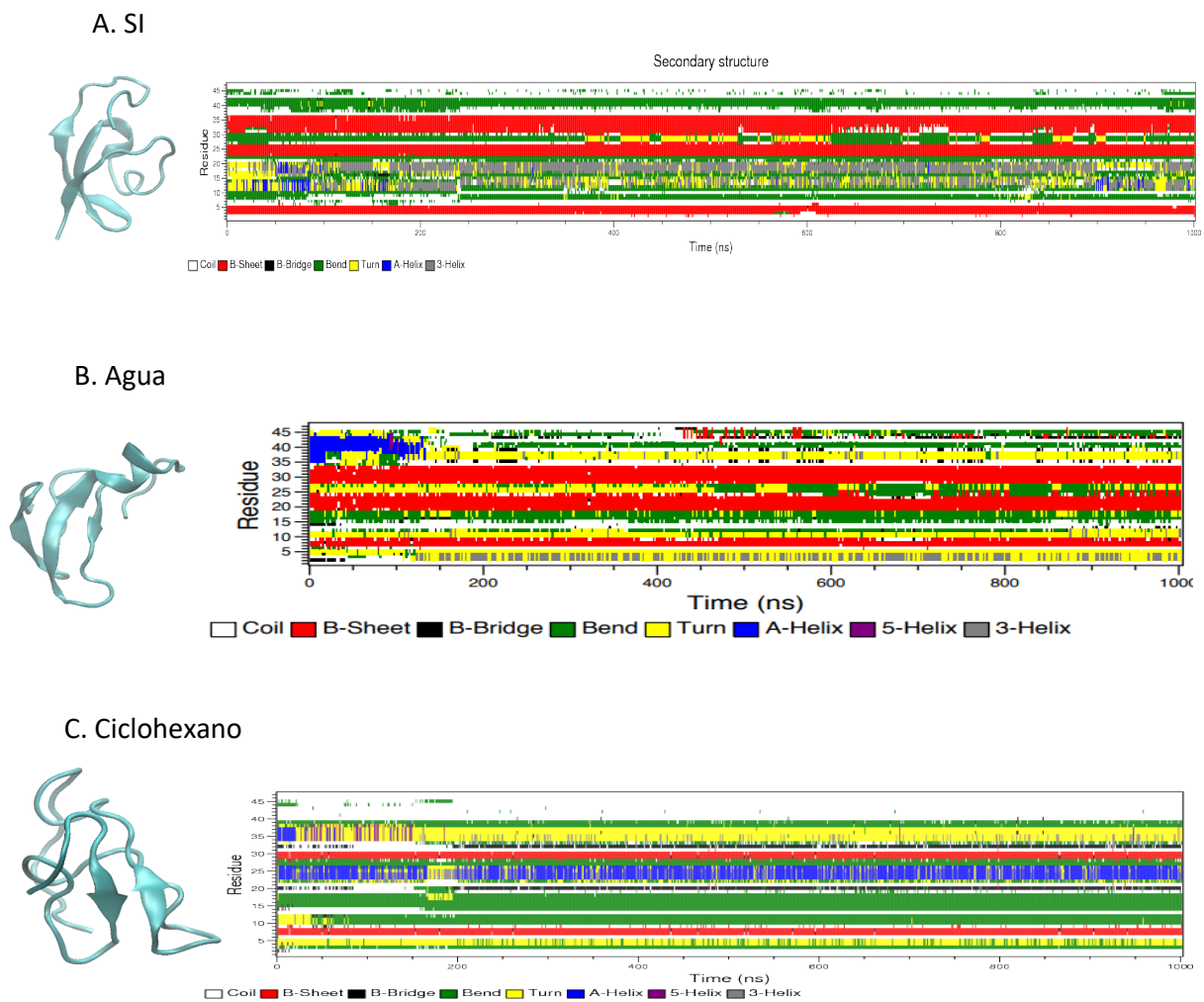
**Figura 9.** Localización de las cisteínas del modelo por homología obtenido por Robetta para la toxina Tx-4-6-1.

#### 6.4 Dinámica molecular

Para poder establecer las conformaciones tridimensionales de las toxinas peptídicas Tx4-5-5 y Tx4-6-1 y su estabilidad estructural a lo largo del tiempo, se realizaron Dinámicas Moleculares (DM) a partir de una conformación extendida. Así mismo, para analizar si los modelos de estructura terciaria obtenidos mediante Robetta y los puentes disulfuro propuestos podrían dar estabilidad a cada estructura, se realizaron dinámicas moleculares a partir de esos modelos para cada toxina en tres ambientes, Solvente Implícito (SI), Solvente Explícito (Agua) y Ciclohexano y así poder encontrar las conformaciones estadísticamente más relevantes de los péptidos con puentes disulfuros a lo largo de 1  $\mu$ s de simulación.

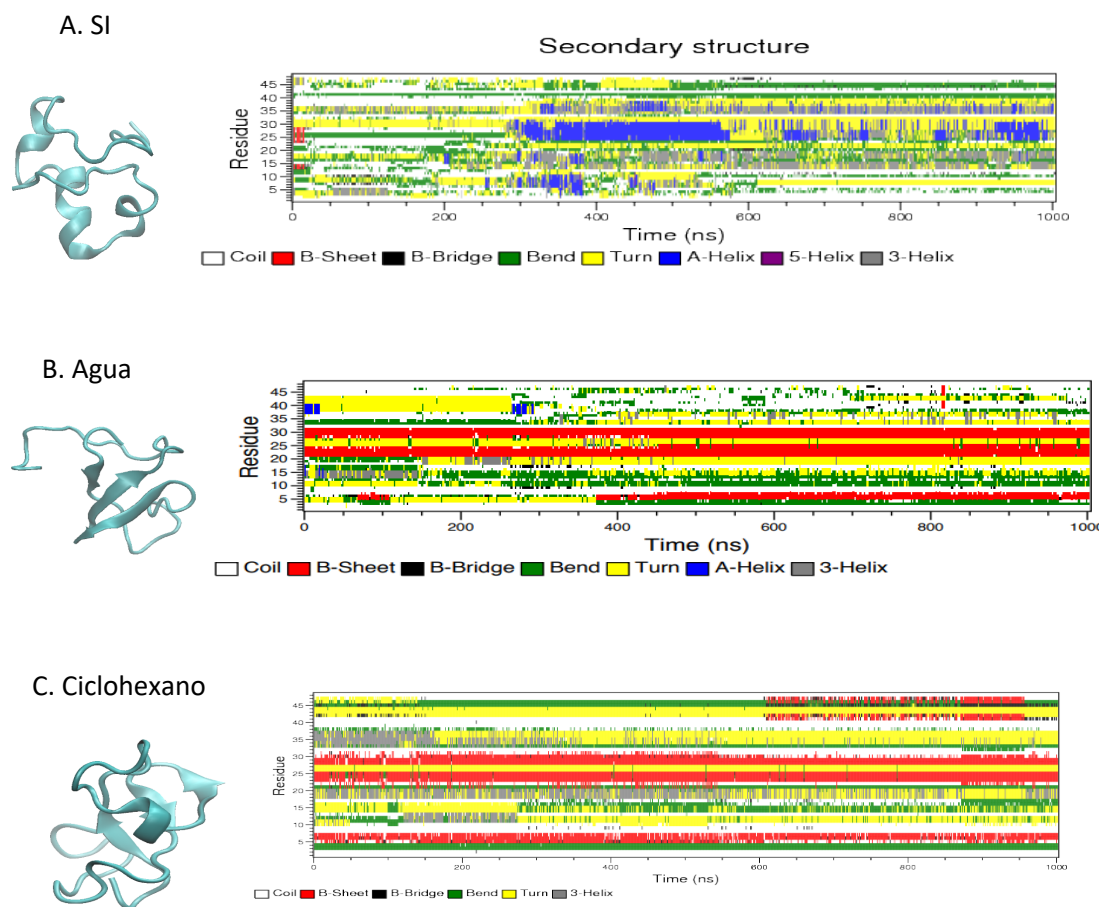
A continuación, se evidencian las dinámicas moleculares de Tx4-5-5 y Tx4-6-1 en solvente implícito, explícito y en ciclohexano, comparado con su modelo de homología.

Como se puede observar en el comportamiento de la estructura secundaria a lo largo de las simulaciones, durante la simulación en solvente implícito el péptido Tx4-5-5 a partir de su conformación extendida, Figura 10 (A), se pliega rápidamente en una lámina beta (3 hojas) y forma una hélice alfa intermitente al inicio y la estructura permanece muy estable a lo largo de la simulación. En el caso del modelo obtenido por Robetta y expuesto al solvente, Figura 10 (B), se conserva la lámina beta con las tres hojas antiparalelas, y la hélice alfa es más estable en el inicio sobre los 150 ns de simulación. Si ese modelo obtenido por Robetta se evalúa en un ambiente hidrofóbico como es el ciclohexano, se puede apreciar que se conserva estable la hélice alfa y la lamina beta con dos hojas, Figura 10 (C). En esta última a pesar de que el mapa de estructura secundaria muestra la hélice alfa más estable, esta no se aprecia en la conformación del péptido (izquierda) que corresponde al centro del agrupamiento de la trayectoria.



**Figura 10.** Comportamiento del péptido Tx4-5-5 durante simulaciones en Solvente Implícito (SI), agua y ciclohexano. La conformación del péptido a la izquierda de cada mapa de estructura secundaria corresponde al centro del agrupamiento de la trayectoria. (A) Modelo desde conformación extendida. (B y C) corresponden a los modelos de homología obtenidos por Robetta.

Las simulaciones para la toxina Tx4-6-1 muestran que desde la conformación extendida formó una hélice alfa estable y apenas un giro de hélice alfa, Figura 11 (A), sin hojas beta en contraposición a los modelos de homología obtenidos por Robetta. Por su parte, el modelo de homología en agua muestra una hélice muy inestable, pero con laminas beta bastantes estables a lo largo de la simulación, Figura 11(B). El comportamiento en ciclohexano indica la estabilidad de la lamina beta, formada por 3 hojas.



**Figura 11.** Comportamiento del péptido Tx4-6-1 durante simulaciones en Solvente Implícito (SI), agua y ciclohexano. La conformación del péptido a la izquierda de cada mapa de estructura secundaria corresponde al centro del agrupamiento de la trayectoria. (A) Modelo desde conformación extendida. (B y C) corresponden a los modelos de homología obtenidos por Robetta.

Las simulaciones de dinámica molecular de los modelos obtenidos por Robetta tanto para la toxina Tx4-5-5 como para Tx4-6-1, en los que se incluían puentes disulfuro, muestran que en ambos casos las estructuras son bastante estables a lo largo de la simulación y las hojas beta pueden ser características de estas toxinas, las hélices alfa, sin embargo, aparecen de forma muy transitoria. En el caso particular de la estructura para Tx4-6-1 desde la conformación extendida, en las que hay predominio de hélices alfa transitorias, muestra que si hay diferencias respecto a los modelos obtenidos por Robetta. Por tanto, se hace necesario generar simulaciones con escalas temporales más largas y en solventes mixtos (agua-

ciclohexano) que permitan analizar la conformación de cada péptido y su entorno frente al receptor NMDA.

### **6.5 Identificación de segmentos de secuencias con probable interacción con el receptor NMDA.**

Una vez conocidos algunos comportamientos de las toxinas peptídicas Tx4-5-5 y Tx4 6-1, era necesario identificar qué aminoácidos o segmentos de secuencia de cada toxina podrían estar involucrados en la interacción y antagonismo de la actividad del receptor NMDA. Para esto, se realizaron alineamientos múltiples comparando las secuencias de Tx4-5-5 y Tx4 6-1 con secuencias de toxinas encontradas en la misma especie animal y que han sido reportadas experimentalmente como antagonistas hacia otro tipo de canales. Específicamente con las toxinas Tx1, Tx2-1 y Tx3-1 de *Phoneutria nigriventer* y que tienen antagonismo hacia canales de calcio, sodio y potasio respectivamente (De Lima et al., 2016).

En relación con el alineamiento por medio de la herramienta bioinformática Clustal Omega se pudo concluir que Tx 4-5-5 y Tx4 6-1 presentan mayor identidad con canales de sodio (Tx2-1), seguido de canales de calcio (Tx1) y potasio (Tx 3-1) (Figura 12 y anexo 1).



```

TX31_potasio_calcio_bloq  ---AECAAVYER---CGKGYKRCCEERPCKCNIVM---DNCTCKKFISELFGFGK----- 46
TX1_calcio_canal_bloq    AELTSCFPVVGHECDGDASNCNCCGDDVYCGCGWGR---WNCKCKVA-DQSYAYGICKDKV 56
TX21_sodio_canal_bloq   ---ATCAGQDKP---CKETCDCCGERGECVCALSIEGKYRCICRQG-NFLIAWHK---LA 50
TX4-5-5_NMDA_bloq      ----CADINGA---CKSDCDDCGDSVTCDCYWS-----SCKCRES-NFKIGMAIR-KKF 46
TX4_6_1_NMDA_bloq      ----CGDINAA---CKEDCDDCGYTTACDCYWSK-----SCKCREA-AIVIYTAPK-KKL 46

```

```

TX31_potasio_calcio_bloq  ----- 46
TX1_calcio_canal_bloq    NCPNRHLWPAKVCKKPCRNCGG 79
TX21_sodio_canal_bloq   SCKK----- 54
TX4-5-5_NMDA_bloq      C----- 47
TX4_6_1_NMDA_bloq      TC----- 48

```

**Figura 12.** Alineamiento múltiple entre toxinas de la especie *Phoneutria nigriventer*. Los aminoácidos resaltados en amarillo corresponden a los péptidos seleccionados para cada toxina Tx4-5-5 y Tx4-6-1. \*identidad de las cisteínas entre las toxinas.

Del alineamiento múltiple se puede deducir que los aminoácidos resaltados en amarillo y que corresponden a los segmentos de aminoácidos con menor identidad entre secuencias en cada toxina pueden ser los responsables del efecto antagonista de las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1 (Tabla 4). Los segmentos de aminoácidos de las toxinas Tx1, Tx2-1 y Tx3-1, que se encuentran en la misma posición (amino y carboxi terminal) podrían ser los responsables de su antagonismo hacia los canales específicos.

**Tabla 4.** Péptidos de las toxinas Tx 4-5-5 y Tx 4-6-1. Los péptidos en amarillo corresponden a las secuencias seleccionadas con posible acción antagónica frente al receptor NMDA.

Toxinas	Secuencias	Péptidos
Tx4-5-5	CADINGA---CKSDCDCCGDSVTCDCYWSD----	Péptido 1: CADINGA
	SCKCRESNFKIGMAIRKKFC	Péptido 2: MAIRKKFC
Tx4-6-1	CGDINA---ACKEDCDCCGYTTACDCYWSKS----	Péptido 1: CGDINAA
	CKCREAAIVIYTAP-KKKLTC	Péptido 2: AAVIYTAPKKKLTTC

Los segmentos de las toxinas fueron denominados como Tx 4-5-5\_CAD (secuencia: CADINGA), Tx4-5-5\_MAI (secuencia: MAIRKKFC), Tx4-6-1\_CGD (secuencia: CGDINA) y Tx4-6-1\_AAI (secuencia: AAVIYTAPKKKLTTC). Con estos péptidos y con el interés de evaluar la manera como pueden interactuar con el receptor NMDA se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular entre cada péptido (ligandos) y específicamente la subunidad GluN2B del receptor.

## 6.6 Docking e interacciones de los péptidos Tx 4-5-5\_CAD, Tx4-5-5\_MAI, Tx4-6-1\_CGD y Tx4-6-1\_AAI por medio del programa Autodock vina y Discovery Studios.

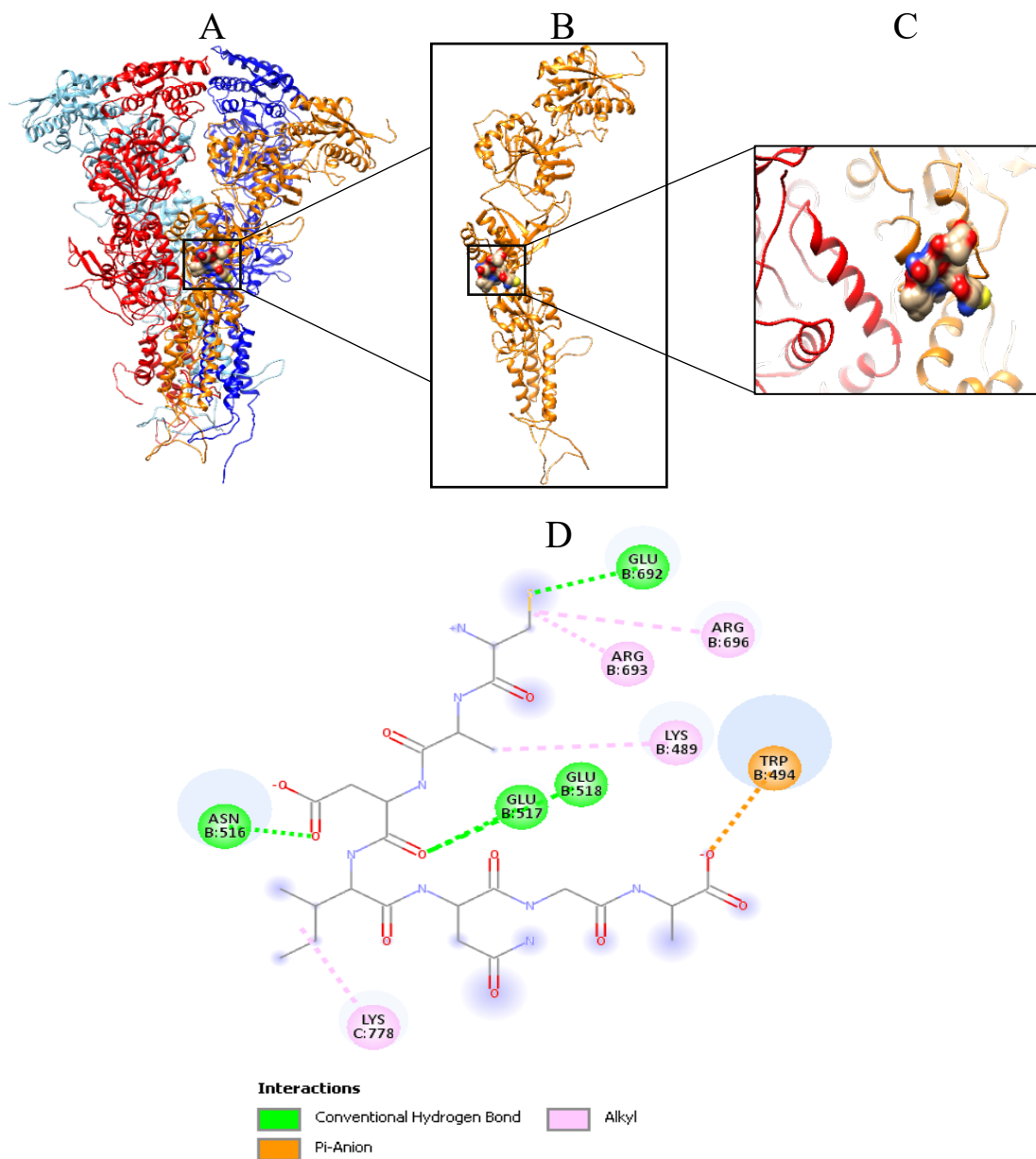
### 6.6.1 Docking e interacción del péptido Tx 4-5-5\_CAD.

Las simulaciones de acoplamiento molecular o docking son una herramienta importante para visualizar cómo un ligando en este caso los péptidos seleccionados de las toxinas Tx 4-5-5 y Tx 4-6-1 puede acoplarse a otra molécula receptora como lo es el receptor NMDA. En este caso, gracias a las simulaciones realizadas mediante Autodock Vina se identificaron los

posibles sitios de unión y las interacciones presentes teniendo en cuenta que la conformación fuera probable en términos de accesibilidad al sitio, es decir, que no presentara probables impedimentos estéricos y la menor energía de unión de -5.5, como se evidencia en la tabla 5. A continuación, la Figura 13 muestra los resultados para el péptido Tx4-5-5\_CAD.

**Tabla 5.** Resultados Docking Tx4-5-5\_CAD.

<b>Mode</b>	<b>affinity</b>	<b>dist from best mode</b>	
	<b>(kcal/mol)</b>	<b>rmsd l.b.</b>	<b>rmsd u.b.</b>
1	-5.5	0.000	0.000
2	-5.0	18.893	22.178
3	-4.9	26.352	29.935
4	-4.8	17.549	21.899
5	-4.8	29.194	32.695
6	-4.7	27.681	31.296
7	-4.6	16.724	21.165
8	-4.6	27.231	30.995
9	-4.6	15.617	19.856
10	-4.5	18.439	21.680



**Figura 23.** Representación esquemática del acoplamiento e interacciones del péptido Tx4-5-5\_CAD. A. Acoplamiento del péptido Tx4-5-5\_CAD con el receptor NMDA. B. Acoplamiento del péptido Tx4-5-5\_CAD con la subunidad GluN2B del receptor NMDA. C. Acercamiento del sitio de interacción del péptido Tx4-5-5\_CAD en la subunidad GluN2B del receptor NMDA. D. Diagrama de interacciones 2D presentes entre el péptido Tx4-5-5\_CAD (Diagrama de líneas) y aminoácidos del receptor NMDA (Círculos de colores).

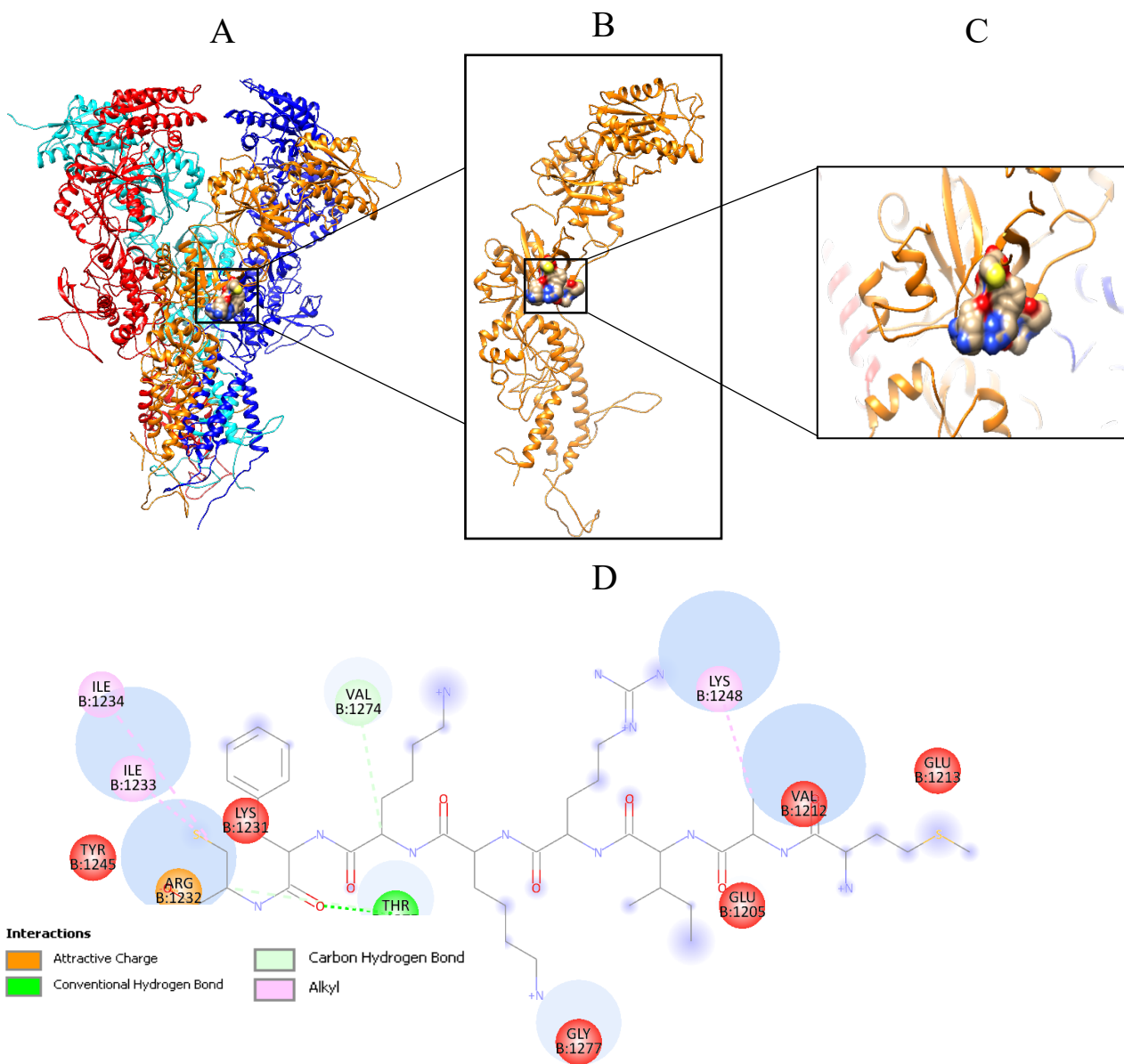
**Tabla 6.** Interacciones presentes en el acople del péptido Tx4-5-5\_CAD con el receptor NMDA.

<b>Interacción</b>	<b>Distancia (Å)</b>	<b>Categoría</b>	<b>Tipo</b>
E:CYS1:SG - B:GLU692:O	3,72417	Puente de Hidrógeno	Convencional
B:ASN516:ND2 - E:ASP3:OD1	2,96141	Puente de Hidrógeno	Convencional
B:GLU517:N - E:ASP3:O	3,12917	Puente de Hidrógeno	Convencional
B:GLU518:N - E:ASP3:O	3,12271	Puente de Hidrógeno	Convencional
E:ALA7:OXT - B:TRP494	3,53963	Electrostática	Pi-Anión
E:ALA2 - B:LYS489	4,45349	Hidrofóbica	Alkyl
B:ARG693 - E:CYS1	4,04776	Hidrofóbica	Alkyl
B:ARG696 - E:CYS1	4,28334	Hidrofóbica	Alkyl
C:LYS778 - E:ILE4	5,12484	Hidrofóbica	Alkyl

En el acople del péptido Tx4-5-5\_CAD con el receptor NMDA se encontraron un total de nueve interacciones (Tabla 5) de las cuales se destacan cuatro puentes de hidrógeno de tipo convencional y cuatro interacciones hidrofóbicas de tipo alkyl. Dentro de estas interacciones es importante destacar la presencia del aspartato 3 del péptido el cual se encuentra formando tres interacciones de tipo puente de hidrógeno con la asparagina 516 y los glutamatos 517 y 518 del receptor NMDA, de igual manera destaca la cisteína 1 del péptido que está involucrada en tres interacciones, siendo una de tipo puente de hidrógeno con el glutamato 692 del receptor y las dos restantes de tipo hidrofóbicas con las argininas 693 y 696 del receptor NMDA. Por lo cual, estos dos residuos (aspartato 3 y cisteína 1) del péptido sugiere que son importantes para el acople estable con el receptor NMDA.

### **6.6.2 Docking e interacción del péptido Tx4-5-5\_MAI.**

En relación con el péptido Tx4-5-5\_MAI (Figura 14) este se ubicó en el dominio de unión al ligando hacia el dominio amino terminal un poco alejado del sitio de unión al ligando, sin embargo, el sitio de interacción se encuentra en la cara exterior de la subunidad GluN2B donde probablemente sea accesible acoplarse.



**Figura 14.** Representación esquemática del acoplamiento e interacciones del péptido Tx4-5-5\_MAI. En representación de superficie coloreada por heteroátomo con el receptor NMDA. A. Acoplamiento del péptido Tx4-5-5\_MAI con el receptor NMDA. B. Acoplamiento del péptido Tx4-5-5\_MAI con la subunidad GluN2B del receptor NMDA. C. Acercamiento del sitio de interacción del péptido Tx4-5-5\_MAI en la subunidad GluN2B del receptor NMDA. D. Diagrama de interacciones 2D presentes entre el péptido Tx4-5-5\_MAI (Diagrama de líneas) y aminoácidos del receptor NMDA (Círculos de colores).

Esta conformación fue el resultado de menor energía obteniéndose un valor de  $-4,8$  kJ/mol (tabla 7), similar al resultado del péptido Tx4-5-5\_CAD de esta misma toxina anteriormente

mencionado, de igual manera, un valor de energía de unión negativo que indica la probable estabilidad de este acoplamiento en la conformación.

**Tabla 6.** Interacciones presentes en el acople del péptido Tx4-5-5\_MAI con el receptor NMDA

<b>Interacción</b>	<b>Distancia (Å)</b>	<b>Categoría</b>	<b>Tipo</b>
B:THR1275:OG1 - E:PHE7:O	2,34772	Puente de Hidrógeno	Convencional
E:LYS6:CA - B:VAL1274:O	3,49486	Puente de Hidrógeno	Carbono
E:CYS8:CA - B:THR1275:OG1	3,24537	Puente de Hidrógeno	Carbono
E:ALA2 - B:LYS1248	4,56508	Hidrofóbica	Alkyl
E:CYS8 - B:ILE1233	5,11026	Hidrofóbica	Alkyl
E:CYS8 - B:ILE1234	5,26649	Hidrofóbica	Alkyl

La Tabla 6, muestra seis interacciones presentes en la unión del péptido Tx4-5-5\_MAI al receptor NMDA, las cuales son tres de tipo puente de hidrogeno; uno convencional y dos de carbono, y también se encuentran tres interacciones hidrofóbicas de tipo alkyl. En este caso el residuo que predomina en las interacciones es la cisteína 8 del péptido la cual interactúa en tres oportunidades; en un puente de hidrógeno con la treonina 1275 del receptor NMDA y en dos interacciones hidrofóbicas con las isoleucinas 1233 y 1234 del receptor, debido a que es el residuo que más se reitera en estas interacciones puede perfilarse como un residuo de gran importancia para la unión del péptido al receptor. En cuanto a residuos predominantes del receptor para la estabilización de esta interacción con el péptido Tx4-5-5\_MAI se encuentra la treonina 1275 ya mencionada en la formación de un puente de hidrógeno con la cisteína 8 del péptido, y a su vez se encuentra interactuando con la fenilalanina 7 del péptido formando otro puente de hidrógeno.

**Tabla 7.** Resultados del Docking Tx4-5-5\_MAI

<b>mode</b>	<b>affinity</b>	<b>dist from best mode</b>	
	<b>(kcal/mol)</b>	<b>rmsd l.b.</b>	<b>rmsd u.b.</b>
-----+-----+-----			
<b>1</b>	<b>-4.8</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
2	-4.7	2.765	6.712
3	-4.6	16.138	21.466
4	-4.5	15.556	20.333
5	-4.5	2.869	6.835
6	-4.5	16.156	22.327
7	-4.5	4.560	9.517
8	-4.4	16.396	22.582
9	-4.4	15.611	20.811
10	-4.4	16.266	21.889

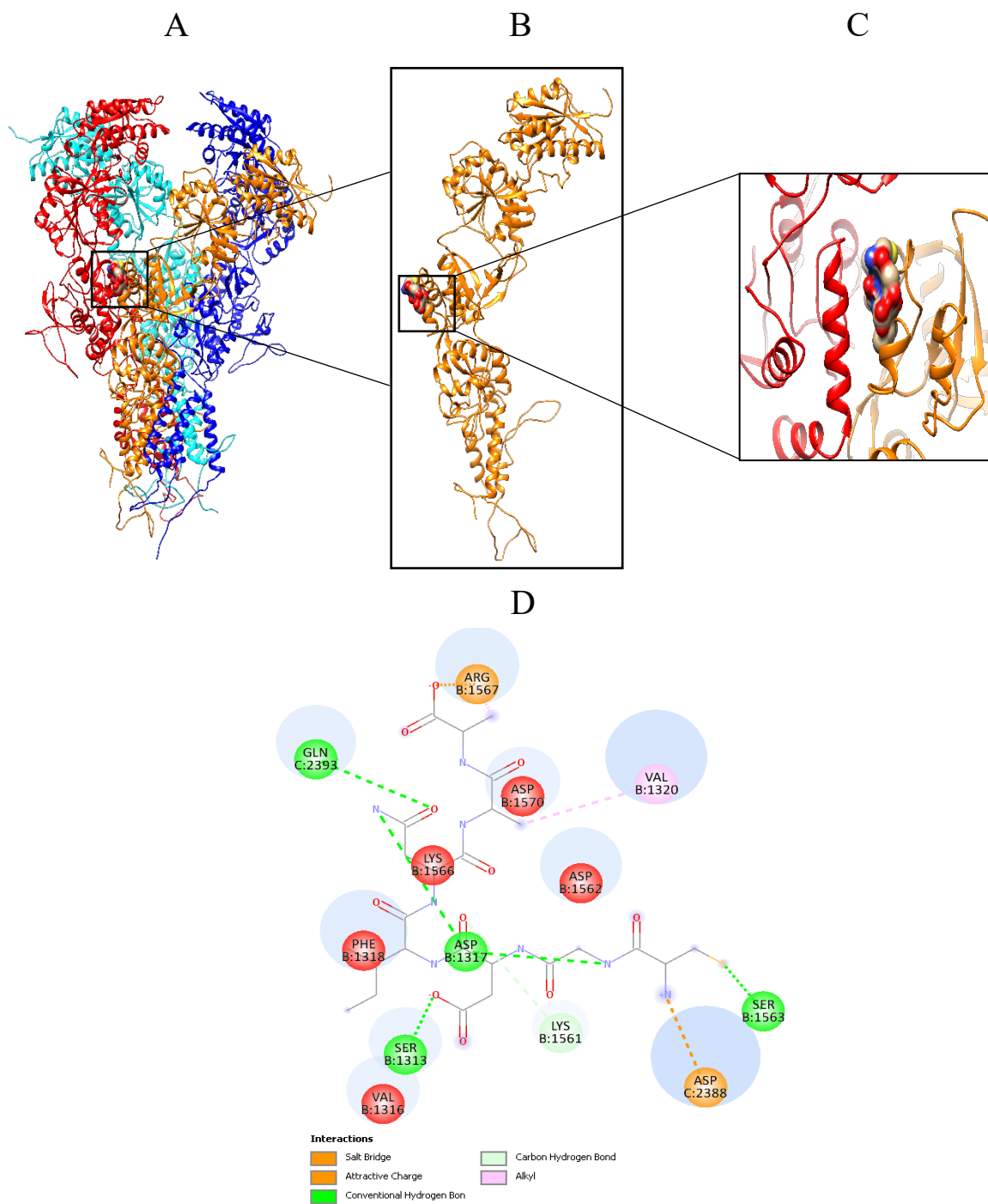
### 6.6.3 Docking e interacción del péptido Tx4-6-1\_CGD

Ahora, en cuanto al péptido Tx4-6-1\_CGD (Figura 15) este se posicionó en el dominio de unión al ligando en una zona intercatenaria de la cadena B (Naranja) y la cadena C (Rojo) del receptor NMDA. Esta conformación fue el resultado de menor energía entre todos los péptidos con un valor de -5,4 kJ/mol (tabla 8) el cual muestra esta conformación del Tx4-6-1\_CGD como la más favorable.

**Tabla 8.** Resultados del Docking Tx4-5-5\_CGD

<b>mode</b>	<b>affinity</b>	<b>dist from best mode</b>	
	<b>(kcal/mol)</b>	<b>rmsd l.b.</b>	<b>rmsd u.b.</b>
-----+-----+-----			
<b>1</b>	<b>-5.4</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
2	-5.3	15.542	20.888
3	-5.3	3.427	6.534
4	-5.2	3.885	7.212
5	-5.2	16.489	20.106
6	-5.1	16.524	20.424
7	-5.1	2.341	2.834
8	-5.1	3.344	8.047
9	-5.0	2.760	4.759
10	-4.8	16.040	20.604





**Figura 15.** Representación esquemática del acoplamiento e interacciones del péptido Tx4-6-1\_CGD. A. Acoplamiento del péptido Tx4-6-1\_CGD con el receptor NMDA. B. Acoplamiento del péptido 1 de Tx 4-6-1 con la subunidad GluN2B del receptor NMDA. C. Acercamiento del sitio de interacción del péptido Tx4-6-1\_CGD en la subunidad GluN2B del receptor NMDA. D. Diagrama de interacciones 2D presentes entre el péptido Tx4-6-1\_CGD (Diagrama de líneas) y aminoácidos del receptor NMDA (Círculos de colores).

A continuación, como se observa en la tabla 9 para el péptido Tx4-6-1\_CGD hay diez interacciones estabilizando la unión del péptido al receptor NMDA, de estas diez predominan las interacciones de tipo puente de hidrógeno las cuales son un total de cinco. El resto de las interacciones presentes son de tipo electrostáticas e hidrofóbicas. En este caso no hay un residuo específico del péptido que predomine sobre el resto en cuanto a frecuencia en la aparición en las interacciones, no obstante, hay cuatro residuos que se encuentran en dos interacciones cada uno haciéndolos probablemente importantes para la interacción del péptido y el receptor; estos residuos son la cisteína 1 que forma un puente salino con el aspartato 2388 del receptor y tiene una interacción de tipo atractiva con el aspartato 1562 del receptor, el siguiente residuo es el aspartato 3 el cual forma dos puentes de hidrógeno con la serina 1313 y la lisina 1561 respectivamente, luego, está la asparagina 5 que también forma dos puentes de hidrógeno, uno con el aspartato 1317 del receptor y el otro lo forma con la glutamina 2392 del receptor, en último lugar está la alanina 7 que tiene una interacción de tipo atractiva con la lisina 1566 del receptor y una interacción hidrofóbica con la arginina 1567 del receptor NMDA.

**Tabla 9.** Interacciones presentes en el acople del péptido Tx4-6-1\_CGD con el receptor NMDA.

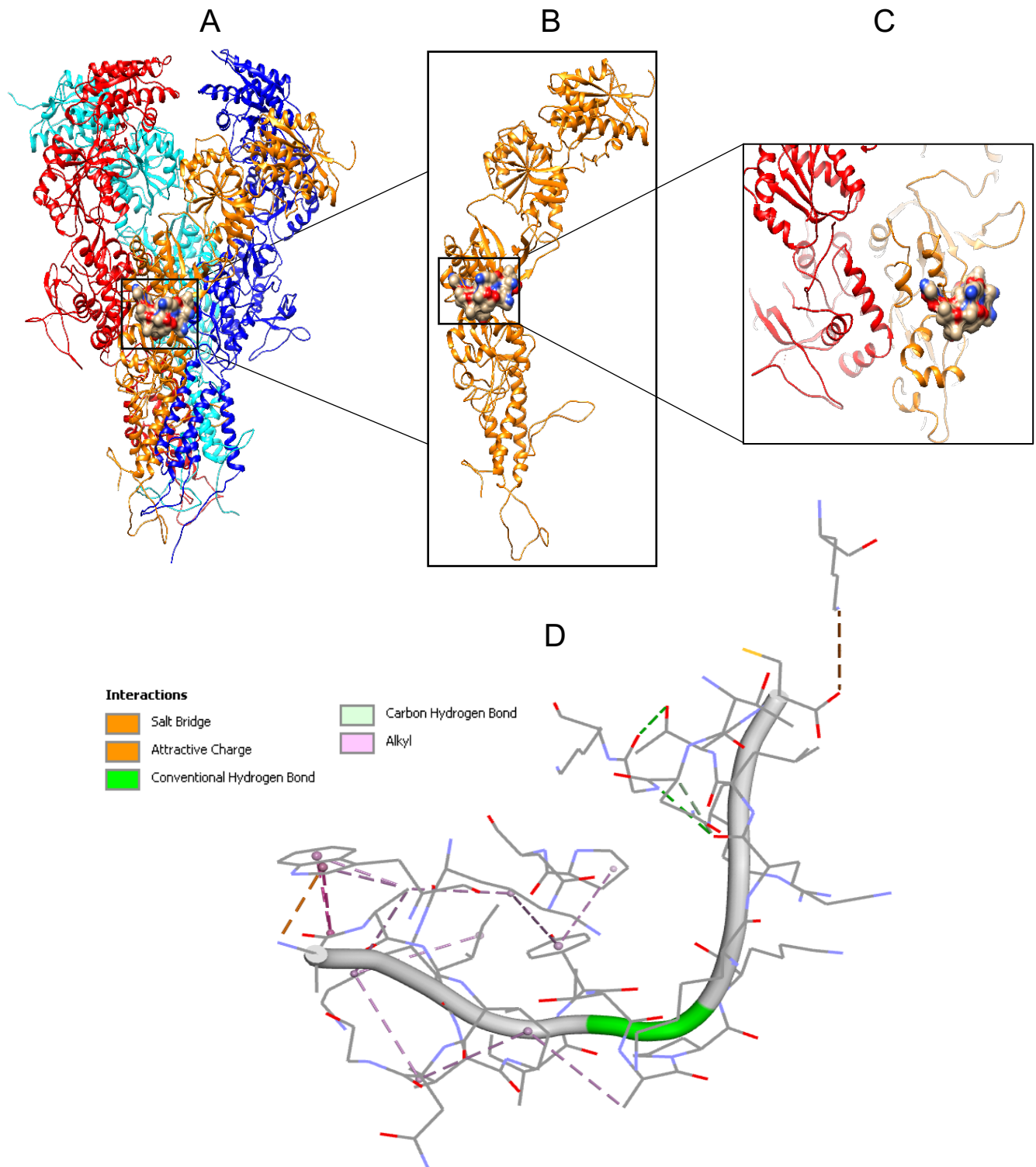
<b>Interacción</b>	<b>Distancia (Å)</b>	<b>Categoría</b>	<b>Tipo</b>
E:CYS1:N - C:ASP2388:OD2	3,85319	Electrostática	Puente salino
E:CYS1:N - B:ASP1562:OD1	4,60205	Electrostática	Atractiva
B:LYS1566:NZ - E:ALA7:O	4,8201	Electrostática	Atractiva
E:GLY2:N - B:ASP1317:OD2	3,10286	Puente de Hidrógeno	Convencional
E:ASN5:ND2 - B:ASP1317:OD2	2,89561	Puente de Hidrógeno	Convencional
B:SER1313:OG - E:ASP3:OD2	3,37926	Puente de Hidrógeno	Convencional
C:GLN2393:NE2 - E:ASN5:OD1	3,38627	Puente de Hidrógeno	Convencional
B:LYS1561:CA - E:ASP3:O	3,76188	Puente de Hidrógeno	Carbono
E:ALA6 - B:VAL1320	4,40902	Hidrofóbica	Alkyl
E:ALA7 - B:ARG1567	3,27373	Hidrofóbica	Alkyl

#### 6.6.4 Docking e interacción del péptido Tx4-6-1\_AAI

Por último, el péptido Tx4-6-1\_AAI (Figura 16) se ubicó en el dominio de unión al ligando cerca al sitio de unión del glutamato, en la cara externa de la subunidad GluN2B. Aunque en este sitio de acoplamiento el péptido este no interactúa con los residuos involucrados en el sitio de unión del glutamato, por la posición de unión del péptido podría generar algún tipo de modulación en el receptor ya sea evitando un sitio de entrada del agonista glutamato o induciendo un cambio conformacional que afecte su unión. La energía de unión resultado de esta conformación es de -5,6 kJ/mol (tabla 10), un acople favorable teniendo en cuenta la energía de unión negativa.

**Tabla 10.** Resultados del Docking Tx4-5-5\_AAI

mode	affinity	dist from best mode	
	(kcal/mol)	rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-5.6	0.000	0.000
2	-5.3	1.774	2.944
3	-5.1	6.874	14.468
4	-5.1	5.512	10.639
5	-4.9	7.861	13.989
6	-4.9	7.672	13.797
7	-4.9	8.500	16.287
8	-4.9	15.586	21.716
9	-4.8	14.273	21.500
10	-4.8	5.057	9.636



**Figura 16.** Representación esquemática del acoplamiento e interacciones del péptido Tx4-6-1\_AAI. En representación de superficie coloreada por heteroátomo con el receptor NMDA. A. Acoplamiento del péptido 2 de Tx 4-6-1 con el receptor NMDA. B. Acoplamiento del péptido Tx4-6-1\_AAI con la subunidad GluN2B del receptor NMDA. C. Acercamiento del sitio de interacción Tx4-6-1\_AAI en la subunidad GluN2B del receptor NMDA. D. Diagrama de interacciones 2D presentes entre el péptido Tx4-6-1\_AAI (Representación de línea sólida) y aminoácidos del receptor NMDA (Diagrama de líneas).

Los resultados de las interacciones presentes en el acoplamiento del péptido Tx4-6-1\_AAI con el receptor NMDA (Tabla 10) muestra el mayor número de interacciones siendo un total de diecisiete, de las cuales predominan las hidrofóbicas con doce. En este caso los aminoácidos que más resaltan son las alaninas 1 y 2 del péptido las cuales se encuentran participando en siete interacciones; una electrostática con el triptófano 1287 del receptor NMDA y seis hidrofóbicas de tipo amida-Pi también con el triptófano 1287 del receptor, tipo alkyl con las lisinas 1281 y 1282 del receptor y Pi-alkyl con el triptófano 1287 del receptor, por lo cual estas dos alaninas parecen ser de gran importancia para la unión efectiva del péptido Tx4-6-1\_AAI al receptor NMDA. Teniendo en cuenta lo anterior, por parte del receptor NMDA se destaca la presencia del triptófano 1287 el cual está en cinco de las interacciones ya mencionadas.

**Tabla 11.** Interacciones presentes en el acople del péptido Tx4-6-1\_AAI con el receptor NMDA

<b>Interacción</b>	<b>Distancia (Å)</b>	<b>Categoría</b>	<b>Tipo</b>
B:LYS1231:NZ - E:CYS15:O	4,20986	Electrostática	Atractiva
E:THR14:OG1 - B:GLY1277:O	2,46132	Puente de Hidrógeno	Convencional
B:GLY1277:N - E:LYS12:O	2,93255	Puente de Hidrógeno	Convencional
B:ASN1276:CA - E:LYS12:O	2,88569	Puente de Hidrógeno	Carbono
E:ALA1:N - B:TRP1287	3,37117	Electrostática	Pi catión-Pi donador
E:ALA1:C,O;ALA2:N - B:TRP1287	2,99334	Hidrofóbica	Amida-Pi
E:ALA1:C,O;ALA2:N - B:TRP1287	3,20381	Hidrofóbica	Amida-Pi
E:ALA2 - B:LYS1281	4,73563	Hidrofóbica	Alkyl
E:ALA2 - B:LYS1282	4,71658	Hidrofóbica	Alkyl
E:VAL4 - B:LYS1282	5,03314	Hidrofóbica	Alkyl
E:VAL4 - B:ILE1283	4,80906	Hidrofóbica	Alkyl
E:ALA8 - B:ILE1283	5,14919	Hidrofóbica	Alkyl
B:LYS1282 - E:ILE3	4,90682	Hidrofóbica	Alkyl
E:TYR6 - B:LYS1281	5,4199	Hidrofóbica	Pi-Alkyl
E:TYR6 - B:PRO1480	5,43438	Hidrofóbica	Pi-Alkyl
B:TRP1287 - E:ALA2	3,86101	Hidrofóbica	Pi-Alkyl
B:TRP1287 - E:ALA2	3,51045	Hidrofóbica	Pi-Alkyl

Tomando en conjunto los resultados del docking se puede decir que los cuatro péptidos derivados de las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1, pueden interactuar con el dominio de unión al ligando de la subunidad GluN2B. Su unión se estabiliza por diferentes interacciones dónde se destaca el péptido Tx4-6-1\_CGD con la formación de 5 puentes de hidrógeno. En todos los casos las conformaciones y orientaciones de los péptidos no se ubicaron en el sitio de unión al ligando del receptor, lo podría sugerir que estos péptidos podrían llegar a tener un efecto como reguladores alostéricos. Para probar esto es necesario realizar pruebas *in vitro* que permitan validar estos resultados *in silico*.

## 7 Conclusiones

- Se proponen modelos de estructura terciaria obtenidos por homología y por dinámica molecular para las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1.
- Los modelos tridimensionales indican que la toxina Tx4-5-5 posee una conformación de 3 láminas  $\beta$  antiparalelas, bajo contenido de hélice alfa y un segmento largo de zonas irregulares alrededor de las láminas  $\beta$ . Para la toxina Tx4-6-1 la correspondencia estructural indica que tiene 2 láminas  $\beta$  antiparalelas, 2 hélices alfa ubicadas en el extremo carboxilo y amino respectivamente, además de zonas irregulares.
- Las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1 son ricas en cisteínas por lo que se propone la formación de 3 puentes disulfuro para Tx4-5-5 (cisteínas 8-29, 14-31 y 21-47) y dos puentes disulfuro para Tx4-6-1 (cisteínas 1-31 y 8-29).
- Simulaciones de dinámica molecular para los modelos por homología de las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1, indican que los puentes disulfuro son importantes para mantener la estabilidad de la estructura a lo largo de la simulación y en presencia de ambientes hidrofílicos e hidrofóbicos.
- Se sugiere unos segmentos de secuencias de las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1 como los probables responsables del antagonismo de estas hacia el receptor NMDA. Específicamente los péptidos y secuencias Tx 4-5-5\_CAD (secuencia: CADINGA), Tx4-5-5\_MAI (secuencia: MAIRKKFC), Tx4-6-1\_CGD (secuencia: CGDINA) y Tx4-6-1\_AAI (secuencia: AAIVIYTAPKKKLTC).
- Resultados de simulaciones de acoplamiento molecular de los péptidos propuestos indican que termodinámica y conformacionalmente pueden ser favorables en la interacción alostérica con la subunidad GluN2B del receptor NMDA.

- El proponer péptidos más pequeños que las toxinas Tx4-5-5 y Tx4-6-1, pueden favorecer procesos de internalización, de interacción con el receptor NMDA y posterior degradación.



## 8. Perspectivas

De acuerdo con la contingencia de la pandemia por COVID-19, limitaciones para el desarrollo del trabajo experimental y demoras en la importación de reactivos entre otros, no se pudo cumplir con todos los objetivos propuestos para este trabajo de grado de maestría y fue necesario replantear y entregar los objetivos correspondientes al componente *in silico*. Se espera continuar con la evaluación del efecto modulador de al menos tres péptidos sintéticos sobre la actividad del receptor NMDA, empleando la técnica *patch clamp* en configuración de célula entera (*whole-cell*), en neuronas de hipocampo de rata Wistar.

## **9. Agradecimientos**

A MINCIENCIAS Por el financiamiento del proyecto “Diseño, síntesis y evaluación de péptidos moduladores de la actividad del receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA)”, código 110477757069. Contrato 678 del 2018.

A la Universidad Antonio Nariño, a la facultad de ciencias y en especial al programa de Maestría en Bioquímica por permitirme formarme académicamente.

Al Dr. Edwin Alfredo Reyes Guzmán, mi director de tesis, quien con sus enseñanzas enriqueció mi formación profesional, su orientación y compromiso permitieron el éxito de este proyecto.

Al grupo de investigación en Modelado y Computación Científica y al grupo de investigación Biología celular y funcional e ingeniería de Biomoléculas. En especial al Dr. Gilles Paul Pieffet y la Dra. María Elisa Forero Vivas por su colaboración en el diseño y realización de este documento.

A mis padres, hermana y en especial a Ivi Violetta y Francisco Javier por su comprensión, apoyo y paciencia durante la elaboración de este trabajo.

## 10. Referencias Bibliográficas

- Aizenman, E., Frosch, M. P., & Lipton, S. A. (1988). Responses mediated by excitatory amino acid receptors in solitary retinal ganglion cells from rat. *The Journal of Physiology*, 396(1), 75–91. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp016951>
- Asztély, F., & Gustafsson, B. (1996). Ionotropic glutamate receptors: Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Molecular Neurobiology*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/BF02740744>
- Bianchi, R., Wong, R. K. S., & Merlin, L. R. (2013). Glutamate Receptors in Epilepsy. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 116, 132–142. <https://doi.org/10.1093/med/9780199746545.003.0011>
- Bleich, S., Römer, K., Wiltfang, J., & Kornhuber, J. (2003). Glutamate and the glutamate receptor system: A target for drug action. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 18(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1002/gps.933>
- Bliss, T. V. ., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic mechanism of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Group*.
- Bowery, N. G., & Smart, T. G. (2006). GABA and glycine as neurotransmitters: A brief history. *British Journal of Pharmacology*, 147(SUPPL. 1), 109–119. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706443>
- Bradley, P., Misura, K. M. S., & Baker, D. (2005). Toward High-Resolution de Novo

Structure Prediction for Small Proteins. *Science*, 309(5742), 1868 LP – 1871.

<https://doi.org/10.1126/science.1113801>

Brosnan, J. T. (2018). Glutamate, at the Interface between Amino Acid and Carbohydrate Metabolism. *The Journal of Nutrition*, 130(4), 988S-990S.

<https://doi.org/10.1093/jn/130.4.988s>

de Souza, J. M., Goncalves, B. D. C., Gomez, M. V., Vieira, L. B., & Ribeiro, F. M.

(2018). Animal toxins as therapeutic tools to treat neurodegenerative diseases.

*Frontiers in Pharmacology*, 9(FEB), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00145>

de Lima M.E. et al. (2016) Phoneutria nigriventer Venom and Toxins: A Review. In:

Gopalakrishnakone P., Corzo G., de Lima M., Diego-García E. (eds) Spider Venoms.

Toxinology. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6389-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6389-0_6).

Doctoral, T. (n.d.). *Mecanismos de regulación del receptor de glutamato tipo NMDA en excitotoxicidad e isquemia cerebral*.

Dunnett, S. B., & Björklund, A. (1999). Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature*, 399(SUPPL.).

<https://doi.org/10.1038/399a032>

F. Traynelis, S., P. Wollmuth, L., J. McBain, C., S. Menniti, F., M. Vance, K., K. Ogden,

K., ... Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure,

Regulation, and Function Stephen. *Pharmacological Reviews*, 62, 405–496.

<https://doi.org/10.1124/pr.109.002451.405>

Fang G. Xiao-XuChenaQian-QianYangbLiang-JingZhubNing-NingLibHai-ZhuYubXiang-

MingMengb. (2018). Discovery, structure, and chemical synthesis of disulfide-rich

peptide toxins and their analogs. *Chinese Chemical Letters*. Volume 29, Issue 7, Pages 1033-1042

- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*, 27(5), 301–310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.10.014>
- Florey, E. (1954). An inhibitory and an excitatory factor of mammalian central nervous system, and their action on a single sensory neuron. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 62(1), 33–53. <https://doi.org/10.3109/13813455409145367>
- Fosgerau, K., & Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, 20(1), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>
- Francis, P. T. (2005). Dopaminergic and glutamatergic systems in alzheimer's disease. *Dopamine and Glutamate in Psychiatric Disorders*, (March), 569–581. [https://doi.org/10.1007/978-1-59259-852-6\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-852-6_24)
- Gill, S. S., & Pulido, O. M. (2001). Review Article: Glutamate Receptors in Peripheral Tissues: Current Knowledge, Future Research, and Implications for Toxicology. *Toxicologic Pathology*, 29(2), 208–223. <https://doi.org/10.1080/019262301317052486>
- Green, A. R. (2002). Why do neuroprotective drugs that are so promising in animals fail in the clinic? An industry perspective. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29(11), 1030–1034. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03767.x>
- Harreveld, A. Van. (1959). Compounds in Brain Extracts Causing Spreading Depression of

- Cerebral Cortical Activity and Contraction of Crustacean Muscle. *Journal of Neurochemistry*, 3(4), 300–315. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1959.tb12636.x>
- Karakas, E., & Furukawa, H. (2014). Supplementary materials Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science*, 344(6187), 992–997. <https://doi.org/10.1126/science.1251915>
- Kemp, J. A., & McKernan, R. M. (2002). NMDA receptor pathways as drug targets. *Nature Neuroscience*, 5(11s), 1039–1042. <https://doi.org/10.1038/nn936>
- Kotermanski, S. E., & Johnson, J. W. (2009). Mg<sup>2+</sup> Imparts NMDA Receptor Subtype Selectivity to the Alzheimer's Drug Memantine. *Journal of Neuroscience*, 29(9), 2774–2779. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3703-08.2009>
- Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C., Beck, J. S. (1992). <sup>2</sup>»ÉŒÍ,ĐŒμÄ © 19 9 2 Nature Publishing Group. *Nature*, 359, 710–713.
- Kronfol, Z. (2002). Immune dysregulation in major depression: A critical review of existing evidence. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 5(4), 333–343. <https://doi.org/10.1017/S1461145702003024>
- Lareo, L. (2006). El Receptor Ionotrópico De Glutamato Activado Por N-Metil-D-Aspartato, Molécula Clave De La Conciencia. *Universitas Scientiarum*, 11, 13–33. Retrieved from <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4992>
- Mansbach, R. A., Travers, T., McMahon, B. H., Fair, J. M., & Gnanakaran, S. (1923). *Snails In Silico : A Review of Computational Studies on the Conopeptides*. 1–34. <https://doi.org/10.3390/md17030145>

- Matthews, C. C., Zielke, H. R., Wollack, J. B., & Fishman, P. S. (2000). Enzymatic degradation protects neurons from glutamate excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 1045–1052. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751045.x>
- McMurray, C. T. (2004). Huntington's disease: new hope for therapeutics. *Trends in Neurosciences*, 24(11), 32–38. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(01\)00006-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(01)00006-6)
- Meldrum, B. S. (2018). *Glutamate and Glutamine in the Brain Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain : Review of Physiology and Pathology I*. (May), 1007–1015.
- Mellor, G. L. (2003). a. The three-dimensional current and surface wave equations. *J. Phys. Oceanogr.*, 33, 1978–1989. [https://doi.org/10.1175/1520-0485\(2003\)033<1978:TTCASW>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0485(2003)033<1978:TTCASW>2.0.CO;2)
- Michaelis, E. K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology*, 54(4), 369–415. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00055-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00055-5)
- Muir, K. W. (2006). Glutamate-based therapeutic approaches: Clinical trials with NMDA antagonists. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(1 SPEC. ISS.), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.12.002>
- Paiva, A. L. B., Matavel, A., Peigneur, S., Cordeiro, M. N., Tytgat, J., Diniz, M. R. V., & de Lima, M. E. (2016). Differential effects of the recombinant toxin PnTx4(5-5) from the spider *Phoneutria nigriventer* on mammalian and insect sodium channels. *Biochimie*, 121, 326–335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.12.019>

- Parsons, C. G., Danysz, W., & Lodge, D. (1970). *Preface Introduction to Glutamate Receptors , Their Function and Pharmacology*. (58), 1–28.
- Parsons, M. P., & Raymond, L. A. (2014). Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron*, 82(2), 279–293.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.030>
- Pimienta-Jiméne, H. J., Medina-Marín, A. M., & Escobar-Betancourth, M. I. (2003). Sistema glutamatérgico II: alteraciones en isquemia, alzheimer y esquizofrenia Hernán. *Revista Colombiana de Psiquiatria*, 32(1), 51.
- Reyes-Guzman, E. A., Vega-Castro, N., Reyes-Montaña, E. A., & Recio-Pinto, E. (2017). Antagonistic action on NMDA/GluN2B mediated currents of two peptides that were conantokin-G structure-based designed. *BMC Neuroscience*, 18(1), 1–13.  
<https://doi.org/10.1186/s12868-017-0361-4>
- Reyes-Guzman, EA, Vega-Castro, N., Reyes-Montaña, EA y Recio-Pinto, E. (2017). Acción antagonista sobre las corrientes mediadas por NMDA / GluN2B de dos péptidos que se diseñaron en base a la estructura de conantokina-G. *Neurociencia de BMC* , 18 (1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12868-017-0361-4>
- Salazar Fajardo, P. D., & Elenes Zepeda, S. H. (2010). “ *Impacto funcional de las propiedades biofísicas y farmacológicas del receptor NMDA compuesto por subunidades NR2(A-D)* .”
- Sasaki, T., & Kaneko, A. (1996). L-glutamate-induced responses in OFF-type bipolar cells of the cat retina. *Vision Research*, 36(6), 787–795. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(95\)00176-X](https://doi.org/10.1016/0042-6989(95)00176-X)



- Scallet, A. C., Schmued, L. C., & Johannessen, J. N. (2005). Neurohistochemical biomarkers of the marine neurotoxicant, domoic acid. *Neurotoxicology and Teratology*, 27(5), 745–752. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2005.06.018>
- Shohami, E., & Biegon, A. (2014). Novel Approach to the Role of NMDA Receptors in Traumatic Brain Injury. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 13(4), 567–573. <https://doi.org/10.2174/18715273113126660196>
- Simons, K. T., Kooperberg, C., Huang, E., & Baker, D. (1997). Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and bayesian scoring functions<sup>1</sup> Edited by F. E. Cohen. *Journal of Molecular Biology*, 268(1), 209–225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0959>
- Sze, C. I., Bi, H., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Filley, C. M., & Martin, L. J. (2001). N-Methyl-D-aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 182(2), 151–159. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(00\)00467-6](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(00)00467-6)
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., ... Vyklicky, L. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research*, 63 Suppl 1, S191-203. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24564659>
- Wang, C., & Shuaib, A. (2005). NMDA/NR2B Selective Antagonists in the Treatment of Ischemic Brain Injury. *Current Drug Target -CNS & Neurological Disorders*, 4(2), 143–151. <https://doi.org/10.2174/1568007053544183>

- Williams, A. J., Dave, J. R., Lu, X. M., Ling, G., & Tortella, F. C. (2002). Selective NR2B NMDA receptor antagonists are protective against staurosporine-induced apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, 452(1), 135–136. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02327-0](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02327-0)
- Yurkewicz, L., Weaver, J., Bullock, M. R., & Marshall, L. F. (2006). The Effect of the Selective NMDA Receptor Antagonist Traxoprodil in the Treatment of Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 22(12), 1428–1443. <https://doi.org/10.1089/neu.2005.22.1428>
- Zhou, Q., & Sheng, M. (2013). NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology*, 74(September), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.030>

## 11. Anexos

### 11.1 Anexo 1. Comparación de la secuencia de aminoácidos de las toxinas Tx4-5-5, Tx4-6-1 de *Phoneutria nigriventer*, con canales de sodio, calcio y potasio

Tx1	AELTSCFPVGH	EC	GD	AS	NC	NC	CG	DD	VY	CG	CG	WR	WN	CK	KV	AD	QS	YAY	GI	CK	DK	VN	CP	60										
Tx4_5_5	----	CAD	INGA	---	CK	SD	CC	CG	DS	VT	CD	CY	WS	---	SCK	RES	NFK	IG	MA	IR	KK	FC	---	47										
		*	:		*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:										
Tx1	RHL	WPA	KV	CK	KP	CR	RC	CGG															79											
Tx4_5_5	-----																						47											
tx2_1	AT	CA	GQ	DK	PCK	ET	CD	CC	GER	GE	CV	CA	LS	YEG	KY	RC	IC	RQ	GN	FL	IA	WH	KL	AS	CKK	54								
tx4	--	CAD	INGA	CK	SD	CC	CG	DS	VT	CD	CY	WS	---	SCK	RES	NFK	IG	MA	IR	KK	FC					47								
		**	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:									
Tx3_1	AE	CA	AV	YER	CG	KGY	KR	CC	EE	RP	CK	CN	IV	MD	NCT	CK	KF	IS	EL	FG	FG	FK	-----	46										
Tx4_5_5	--	CAD	INGA	CK	SD	CC	CG	DS	VT	CD	CY	W	---	SD	SCK	RES	---	NFK	IG	MA	IR	KK	FC	47										
		**	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*										
tx1	AEL	TSC	FP	VGH	EC	GD	AS	NC	NC	CG	DD	VY	CG	CG	WR	WN	CK	KV	AD	QS	YAY	GI	CK	DK	VN	CP	60							
tx4	-----	CG	D	I	NA	ACK	ED	C	DC	CG	YT	T	A	C	D	CY	W	S	---	SCK	CRE	AA	I	-	VI	Y	T	AP	KK	KL	TC	---	48	
		*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:							
tx1	RHL	WPA	KV	CK	KP	CR	RC	CGG																	79									
tx4	-----																								48									
tx2	AT	CA	GQ	DK	PCK	ET	CD	CC	GER	GE	CV	CA	LS	YEG	KY	RC	IC	RQ	GN	FL	IA	W	---	H	KL	AS	CKK	54						
tx4	--	CG	D	I	NA	ACK	ED	C	DC	CG	YT	T	A	C	D	CY	W	S	---	CK	CRE	AA	I	-	VI	Y	T	AP	KK	KL	TC	---	48	
		*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:							
tx3	AE	CA	AV	YER	CG	KGY	KR	CC	EE	RP	CK	CN	IV	MD	NCT	CK	KF	IS	EL	FG	FG	FK	-----	46										
tx4	--	CG	D	I	NA	ACK	ED	C	DC	CG	YT	T	A	C	D	CY	W	S	---	SK	SCK	CRE	AA	I	-	VI	Y	T	AP	KK	KL	TC	---	48
		*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:	*	:									

## 11.2 Anexo 2. Participación en el evento “Latin American Workshop in Structural Bioinformatics of Proteins”

### 3D-prediction of the structure of peptides presents in animal poisons with antagonist effect on NMDA receptor



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

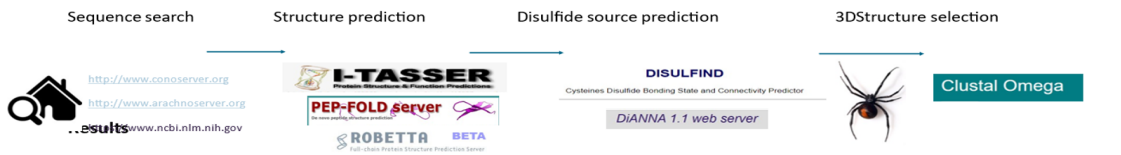
Katherin Alejandra Gamboa Rodríguez<sup>1</sup>, María Elisa Forero Vivas<sup>1</sup>, Gilles Pieffet<sup>2</sup>, Nohora A Vega-Castro<sup>3</sup>, Edgar A Reyes-Montaño<sup>3</sup>, Edwin Alfredo Reyes-Guzmán<sup>2,3</sup>  
<sup>1</sup>Grupo de Investigación En Biología Celular y Funcional e Ingeniería de Biomoléculas, Universidad Antonio Nariño  
<sup>2</sup>Grupo de Investigación en Modelado y Computación científica, Universidad Antonio Nariño  
<sup>3</sup>Grupo de Investigación en Proteínas, Universidad Nacional de Colombia.  
 Correo autor: kgamboa@uan.edu.co



#### Abstract

Peptides in animal poisons have an interesting pharmacological potential, some of them having an antagonistic effect towards different ion channels. One of these channels is the N-Methyl-D-Aspartate (NMDAR) receptor, which is an ionic-cationic channel permeable primarily to calcium ion and involved in physiological processes but also in pathological conditions such as ischemic damage and degenerative disorders. An excessive increase in calcium influx through NMDAR produces neuronal death. It is essential to search for peptide toxins that modulate the activity of the NMDAR and avoid the processes of cell death activated by the overstimulation of this receptor. In this study, we did a database search to select the peptides Tx4-5-5 and Tx4-6-1 from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* and the peptides Pb48 and Pb53 from the venom of *Phoneutria boliviensis*. These peptides, which are rich in cysteines have an antagonistic effect on the NMDAR. The 3D structure prediction of each peptide was made using PEP-FOLD 2.0 and I-TASSER server and a GROMACS simulation with explicit solvent to determine the best structure and a disulfide bridge prediction. Our results show that Tx4-5-5 could have 3 antiparallel  $\beta$ -sheet conformation, together with some alpha-helix content and an important random coil segment organized compactly around the  $\beta$ -sheets. This conformation indicates the possible presence of three disulfide bridges. The results obtained for the peptide Pb48, Pb53 and Tx4-6-1 couldn't reach a well-defined stable structure and as such are not conclusive so far, indicating that extra simulations are required to obtain converged structures.

#### Methodology



#### Structure prediction

TOXINA	I-TASSER	PEP-FOLD 2.0	ROSETTA	GROMACS
Tx4-5-5				
Tx-4-6-1				
Pb48				
Pb53				

#### 3D Structure selection

#### Disulfide source prediction

predictors	
DISULFIND (POSITION OF CYSTEINES)	
TX4-5-5	TX4-6-1
1, 12	1, 12
8, 14	8, 14
15, 21	15, 21
23, 29	23, 29

#### alignment and structure

```

TX4-5-5  --CADINGACKSDCDCCGDSVTCDCYMSDSCCKRESNFKIGMAIRKKFC- 47
TX2-5   ATCAGDDQTKVTCDCCGERGEVCV--GGPCICRQGNFLIANYKLASCCK 48
TX2-6   ATCAGDDQPKETDCCGERGEVCV--GGPCICRQGYFHWIANYKLANCKK 48
      ** : ** *****: * * .. * ** : * *
    
```

#### Conclusions

- The formation of disulfide bridges at UCSF Chimera was forced where the model for Pb45 is more conformationally more likely than that of Robetta for tx4-6-1.
- From the toxins Tx25 and Tx2-6 of which there is an experimental report of disulfide bridges (Atavelet al., 2009), alignments of these toxins were made with Tx8-5 and with Tx4-6-1. With the specified results it is proposed that the disulfide bridges could be in the same positions.
- It is expected to obtain a 3D model of each toxin that allows to see if the proposed segments could be exposed and interact with the structure of the NMDA receptor.

#### References

- Estrella-Gómez S, Muñoz-Liz, Lancho P, Latorra CS. Partial characterization of venom from the Colombian spider *Phoneutria boliviensis* (Araneae:Chimidae). *Toxins* [Basel]. 2015;7(8):2872-87.
- Frédéric Pieffet, C. Zhou, Q. NMDA receptor subunits define the important receptor properties, synaptic plasticity and diverse Net-like Neuronal [Internet]. 2013 May 20;14:383. Available from: <http://doi.org/10.1038/nrn3>
- Fava AD, Matsuoka A, Pagnoux S, Corbière MN, Tytgat L, Diviz MR, et al. Differential effects of the recombinant toxin PnTx45-5) from the spider *Phoneutria nigriventer* on mammalian and insect sodium channels. *Biochimie* [Internet]. 2016;121:326-35. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304396415008332>
- Nie S, Kuhn C, Wei Der Spahr G, Lindner E. "GROMACS 4: Algorithms for highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation". *J Chem Theory Comput*. 2008;4(2): 435-447. <https://doi.org/10.1021/ct070030z>
- Yang, R. Wu, A. Roy, D. Xu, J. Francois Y Zhang. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12: 7-14 (2015).

### 11.3 Anexo 3. Certificado de participación en congreso internacional

