

# VI Premio Stephen Hawking

IES de Brión

“INTELIXENCIAS”

---

**SIMULACIÓN COMPUTACIONAL DE LA  
INTERACCIÓN DE LA MAGAININA CON  
MODELOS SIMPLIFICADOS DE MEMBRANAS  
BACTERIANAS Y DE MAMÍFEROS SANOS**

---

**Autores:** Mikel Escobar Díaz, Álvaro Francos Martínez, Unai Peral Fernández

**Tutora do IES de Brión:** Virginia Rodríguez Álvarez

**Coordinadores da USC:** Grupo de investigación de Química Supramolecular y Nanotubos Peptídicos. CIQUS. Rebeca García Fandiño, Fabián Suárez Lestón

## **RESUMEN**

Este proyecto explora el potencial de las membranas celulares como dianas en el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos frente a la resistencia a los antibióticos. Empleando simulaciones computacionales de dinámica molecular, se examina la interacción de múltiples unidades de magainina, un tipo de péptido antimicrobiano natural, con dos tipos distintos de membranas: modelo de bacteria y de mamífero. Esta técnica nos permite cuantificar, visualizar y entender en detalle cómo estos péptidos interactúan a nivel molecular, una información clave para el desarrollo de nuevas terapias que sean capaces de atacar a las bacterias sin dañar a las células sanas.

El proyecto tiene como fin identificar diferencias claras en el comportamiento de los péptidos frente a diferentes tipos de membranas, buscando evidencias que nos ayuden a crear en el futuro, antibióticos más específicos y potentes. Además, la oportunidad de trabajar en el Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA) nos ha permitido acceder a recursos de computación de alta capacidad, facilitando la realización de simulaciones complejas y extensas que de otra manera hubieran requerido un tiempo prohibitivo.

## **ABSTRACT**

This research addresses the potential of cellular membranes as targets in the development of new therapeutic approaches against antibiotic resistance. Using molecular dynamics computational simulations, the interaction between multiple magainin particles, a type of natural antimicrobial peptide, and two types of membrane, bacterial and mammal will be studied. This technique lets us quantify, visualize and understand how these peptides interact molecularly, key information on the development of new therapies capable of attacking bacteria without damaging healthy cells.

The investigation aims for the identification of differences between the behavior of peptides against different membranes, looking for evidence to create, in the future, stronger and more effective antibiotics. Furthermore, the opportunity to work at CESGA allowed us to access high capacity computation resources, easing up the execution of complex and extensive simulation which otherwise would require a prohibitive amount of time.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN
2. FUNDAMENTO TEÓRICO
  - 1.1 Resistencia a los antibióticos.
  - 1.2 Membranas celulares como Dianas terapéuticas: nuevo método de estudio.
  - 1.3. AMPS: Péptidos antimicrobianos y características.
  - 1.4. Magainina y simulaciones computacionales de Dinámica Molecular.
3. METODOLOGÍA
  - 3.1 Programas utilizados para llevar a cabo el proyecto.
  - 3.2 Conexión con el CESGA.
  - 3.3 Preparación del Sistema.
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
  - 4.1 Evolución del número de contactos entre las distintas partes del sistema.
  - 4.2 Análisis cuantitativo de la simulación de dinámica molecular.
    - 4.2.1 Evolución temporal del número de contactos entre las distintas partes del sistema
  - 4.3 Densidad de los componentes del sistema.
5. CONCLUSIONES Y PROPUESTA DE CONTINUIDAD
6. AGRADECIMIENTOS
7. BIBLIOGRAFÍA

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Resistencia a los antibióticos

En el inicio del siglo XXI, las enfermedades infecciosas continúan siendo una de las principales causas de mortalidad en la humanidad. La introducción de antibióticos en la práctica médica representó un hito crucial en el control de estas enfermedades, salvando millones de vidas y marcando una revolución en la medicina. Sin embargo, una amenaza creciente está erosionando la efectividad de estos medicamentos: la resistencia bacteriana a los antibióticos<sup>1</sup>. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera una de sus principales prioridades en salud, dada su proyección de causar más muertes para 2050 que las ocasionadas actualmente por el cáncer, y su significativo impacto económico, estimado en alrededor de 100 billones de dólares anuales según un estudio reciente en el Reino Unido<sup>2</sup>. La rápida aparición de bacterias resistentes a múltiples fármacos y a todos los antibióticos disponibles plantea un desafío global que cuestiona la eficacia de los tratamientos antibióticos.

La primera línea de actuación ante las infecciones bacterianas se trata de la profilaxis antiinfecciosa, o tratamiento preventivo, y de la propia terapia antibiótica. Los antibióticos son sustancias químicas que son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias (bacteriostáticos) o lisarlas (bactericidas). Pueden ser naturales o sintéticos, dependiendo de su origen, más sus diferencias no dependen de esto, sino de su estructura interna y de los mecanismos que emplean para inhabilitar la bacteria.

Los antibióticos son indispensables a día de hoy, siendo este el tratamiento más común y efectivo para las infecciones bacterianas, y, por lo tanto, una terapia a la segunda causa de muerte más común. No obstante, estos microorganismos están mutando constantemente debido a un uso abusivo de estos fármacos, creando inmunidad y resistencia a los mismos, y dificultando, e, incluso, imposibilitando el tratamiento ante las bacterias en cuestión y otros procedimientos mayores en los cuales estar expuesto a infecciones puede ser mortal.

Esto genera una urgencia a la hora de modificar los fármacos actuales, los cuales implicarán más resistencia por parte de las bacterias. Esta modificación tiene que encontrar otros agentes antimicrobianos, ya que hay que cambiar aquel factor que implica esa creación de resistencia ante el medicamento.

## 1.2 Membranas celulares como dianas terapéuticas: nuevo método de estudio basado en la lipidómica

Las investigaciones centradas en el desarrollo de nuevos antibióticos normalmente presentan una metodología en la cual se identifican dianas terapéuticas, como por ejemplo las proteínas y ácidos nucleicos que una bacteria necesita para realizar una determinada función, y entonces se diseñan fármacos para bloquear esas dianas, con el objetivo de que la bacteria no sea capaz de realizar su función y acabe muriendo. Dado el desafío que representa la resistencia a los antibióticos desarrollados mediante este enfoque, los investigadores están buscando estrategias alternativas para concebir fármacos que puedan eludir dicha resistencia.

Una de estas nuevas estrategias se centra en el estudio y alteración de la membrana celular de las bacterias, con el objetivo de descubrir nuevas vías para combatir las infecciones bacterianas. La membrana celular desempeña un rol fundamental, actuando

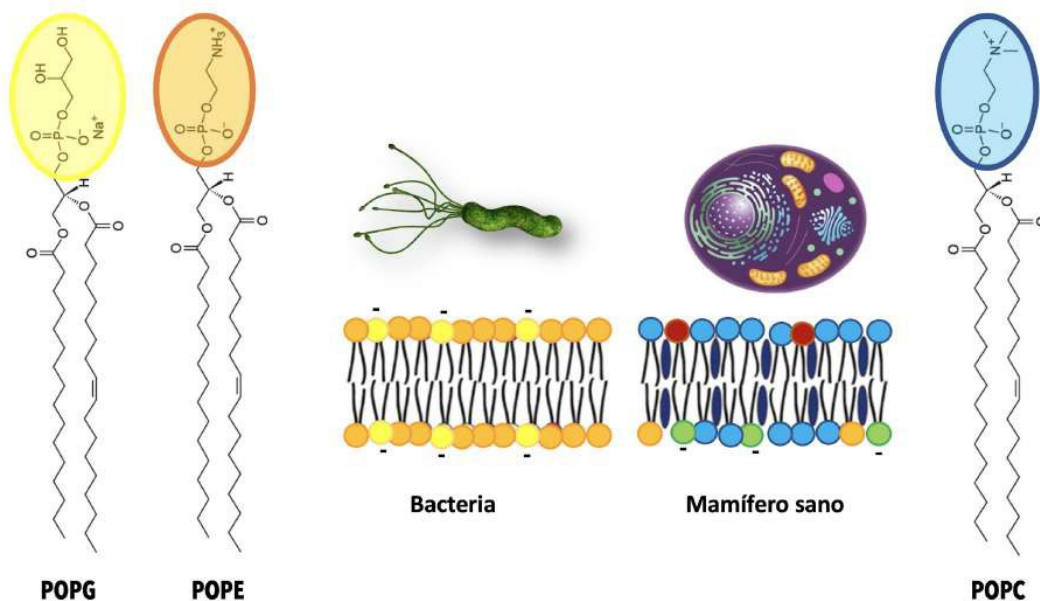
como barrera protectora de la bacteria frente al exterior y regulando la entrada y salida de sustancias de la célula. Hasta hace poco, se las consideraba meras cubiertas celulares; sin embargo, los avances recientes en lipidómica han revelado diferencias significativas entre los lípidos presentes en las membranas de los patógenos y las de las células mamíferas. Estos descubrimientos abren la puerta al desarrollo de nuevos tratamientos que destruyan selectivamente las células bacterianas sin dañar las células del huésped en función de la composición lipídica de su membrana<sup>3</sup>.

Las diferencias estructurales son las que permiten la clasificación de la mayoría de las bacterias en dos tipos: Gram+ y Gram-, según su reacción a la tinción Gram. Las Gram+, cuya pared celular posee este recubrimiento en forma de una gruesa capa, arraigada a la cara interna de la pared celular y a su vez unido a la membrana plasmática, mientras que la pared celular de las Gram- contiene el mismo recubrimiento peptidoglicano pero esta vez se presenta como una fina capa, unida a una segunda membrana plasmática exterior<sup>4</sup>.

Desde el punto de vista de la composición lipídica, las membranas de las células bacterianas a diferencia de las células de mamíferos carecen de colesterol, tienen fosfatidiletanolamina (PE) como lípido zwitteriónico más común y contienen un 20-25% de lípidos cargados negativamente en sus membranas externas, incluyendo fosfatidilglicerol (PG). En los mamíferos el fosfolípido que predomina en las monocapa externa de las membranas es la fosfatidilcolina (PC) (sin carga neta).

Los fosfolípidos son un tipo de lípidos compuestos por una molécula de alcohol (glicerol o de esfingosina), a la que se unen dos ácidos grasos y un grupo fosfato. El fosfato se une mediante un enlace fosfodiéster a otro grupo de átomos, que generalmente contienen nitrógeno, como colina, serina o etanolamina y muchas veces posee una carga eléctrica. Poseen un comportamiento anfipático, ya que presentan una zona polar, hidrófila ( formada por el grupo fosfato unido a un alcohol) y una zona apolar, lipófila (en la que aparecen dos ácidos grasos) Este comportamiento anfipático les permite formar las bicapas lipídicas, principal componente de la membrana plasmática, donde las colas apolares de ambas capas quedan enfrentadas, mientras que las cabezas polares se orientan hacia el medio externo e interno, ambos acuosos.

En los fosfoglicéridos la molécula de alcohol es el glicerol, los grupos -OH del Carbono C1 y C2 se unen a un ácido graso saturado e insaturado, respectivamente , a través de un enlace tipo éster y el grupo OH del C3, se enlaza a una molécula de ácido fosfórico, y ésta, a su vez mediante un enlace éster a un alcohol (aminoalcohol o polialcohol). Los fosfoglicéridos POPG, POPE y POPC, anteriormente citados, presentan una serie de analogías. Todos ellos comparten los mismos ácidos grasos, que constituyen las colas apolares ( ácido palmítico y ácido oleico, C1 y C2 respectivamente). Si atendemos a sus diferencias, éstas estriban en el alcohol unido al grupo fosfórico (cabeza polar). En el PG, el grupo fosfórico está unido a un polialcohol: el glicerol (fosfolípido que a pH neutro tiene una carga negativa). Sin embargo, tanto en el caso del PE como en el PC, el grupo fosfórico está unido a un aminoalcohol: etanolamina en el PE y colina en el PC. Estas moléculas se caracterizan porque se comportan como iones dobles o zwitteriones, presentan tanto cargas positivas (grupo amino) como negativas (grupo fosfato) y, por lo tanto, no presentan carga neta.



**Figura 1.** Representación de las diferencias en la composición lipídica de una membrana de bacteria

Esta diferencia en la composición de los fosfolípidos entre las células de mamíferos y bacterias ha sido explotada desde hace millones de años por una clase especial de “antibióticos naturales”, conocidos como péptidos antimicrobianos (AMPs, de sus siglas en inglés Antimicrobial Peptides), o péptidos terapéuticos endógenos (ETPs), elementos cruciales en la primera barrera de defensa de todos los organismos vivos<sup>5</sup>. Estos péptidos naturales tienen la capacidad de distinguir entre células del patógeno y células del anfitrión, basándose únicamente en su composición lipídica, y atacando selectivamente a los patógenos sin dañar las células del organismo que los alberga. A lo largo de la evolución, los AMPs han demostrado una eficacia notable en la lucha contra las infecciones microbianas, y lo más relevante es que, incluso después de millones de años, las bacterias no han desarrollado resistencia significativa contra estos mecanismos de defensa naturales. Esta persistente efectividad resalta el potencial de los AMPs como inspiración para el desarrollo de nuevos fármacos que puedan superar el desafío de la resistencia a los antibióticos y ofrecer soluciones duraderas en la lucha contra las infecciones bacterianas.

### 1.3. AMPS: Péptidos antimicrobianos y características

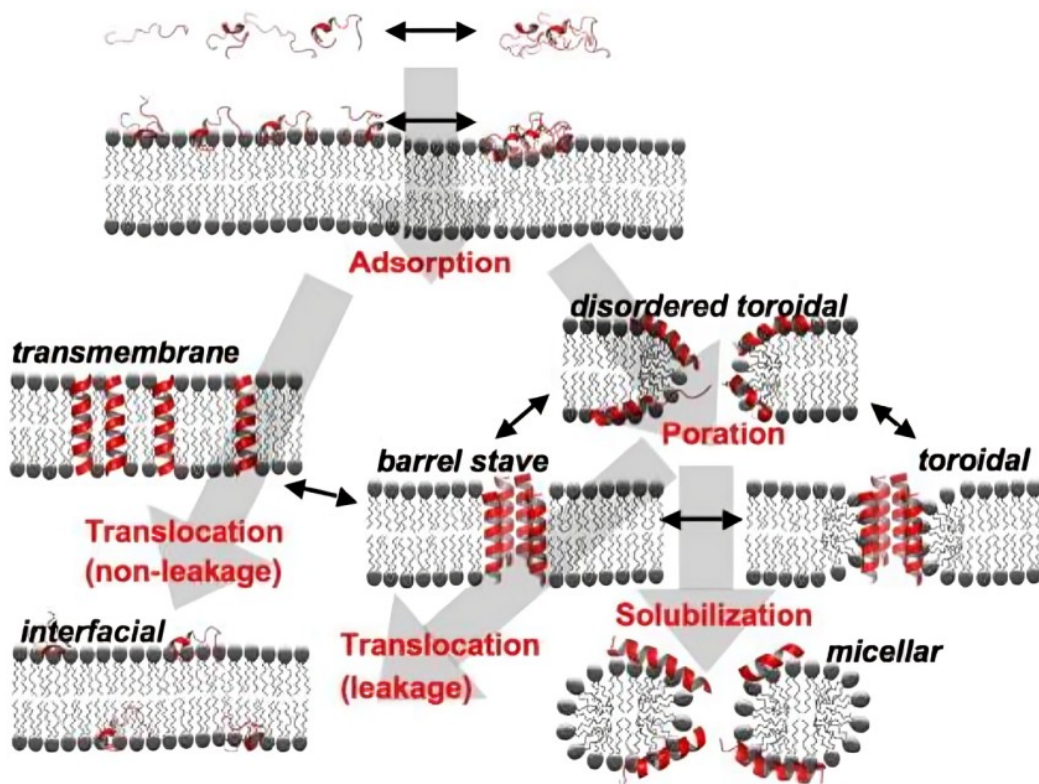
Los péptidos antimicrobianos son un grupo de péptidos que se han conservado en distintos procesos evolutivos. Son moléculas que suelen estar cargadas positivamente y ser anfipáticas, encontradas en diferentes organismos actuando como agentes esenciales efectores del sistema inmune en contra de infecciones bacterianas, víricas o micóticas (producidas por hongos).

Los AMPs se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios: su origen, su actividad (antibacteriana, antivírica, antifúngica, antitumoral, etc), por taxonomía y por su estructura secundaria ( $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -lámina, extendida lineal y ambas  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -lámina, conocido como bucle)<sup>6</sup>. Hasta el momento se han aislado más de 3000 AMPs de microorganismos, insectos, anfibios, plantas y mamíferos<sup>7</sup>. No obstante, solo algunos de ellos se han trasladado comercialmente al mercado y a la práctica clínica<sup>8</sup>. Asimismo se ha aumentado el interés por la síntesis de AMPs, ya que podrían retener o mejorar la potencia

antimicrobiana además de eludir las posibles desventajas de sus análogos naturales, tales como la degradación por proteasas o la toxicidad<sup>9</sup>.

Aunque no siempre el mecanismo de actuación de los AMPs se centra en la membrana del patógeno (algunos tienen como objetivo proteínas, el DNA, RNA etc.)<sup>10</sup>, una gran mayoría sí tiene como diana la bicapa lipídica de las células patógenas. El mecanismo es sencillo, consiste en dañar la integridad de la membrana a través de las fuerzas electrostáticas que se establecen entre la carga negativa de la membrana celular de la bacteria y la carga positiva del péptido en cuestión. En este proceso de ruptura los AMPs suelen adquirir estructura helicoidal en presencia de la bicapa lipídica, y se agregan creando diferentes complejos estructurales a través de principalmente cuatro mecanismos (Figura 2)

- “Barrel-Stave”: tras la unión del péptido y la membrana, los péptidos se reorientan de manera perpendicular respecto a esta, creando un poro hidrofílico por el cual se puede liberar el contenido citoplasmático.
- “Toroidal Pore”: conocido como el “agujero de gusano”, donde la unión provoca un plegamiento de la membrana hacia el interior, creando un conducto formado por las cabezas polares de los fosfolípidos. Por este canal se libera todo el contenido citoplasmático, ocasionando el fallecimiento del patógeno.
- “Carpet model”: en este método el péptido no se inserta en la membrana, si no que se quedan asociados en la región interfásica de la capa externa, formando un “tapiz” que debilita la estructura bicapa. Esto provoca el colapso de la membrana.
- “Aggregate model”: este modelo requiere una concentración específica de péptidos unidos a la interfaz, que se reorganizan extendiendo la bicapa lipídica en un complejo lípido-péptido. Este complejo crea canales por los cuales se liberan iones, causando la muerte celular.



**Figura 2.** Representación esquemática de los diferentes tipos de mecanismos a través de los cuales pueden actuar los AMPs interactuando con las membranas.

#### 1.4 Magainina y simulaciones computacionales de Dinámica Molecular.

El péptido elegido para nuestra investigación es la Magainina. Se trata de una familia de péptidos producidos principalmente por las glándulas mucosas de la piel de determinadas ranas y que presentan un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos y protozoos. Se descubrieron después de que un investigador observara que las ranas rara vez desarrollaban infecciones tras una intervención quirúrgica experimental a pesar de ser colocadas en un entorno totalmente no estéril, un acuario<sup>11</sup>.

Las magaininas, son una familia de AMPs constituidas por una secuencia de 23 aminoácidos<sup>12</sup>, que presentan una carga neta positiva y por lo tanto muestra mayor selectividad por los sitios cargados negativamente en las membranas microbianas. La unión del péptido es favorecida tanto por interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos no polares y el núcleo hidrofóbico de la membrana como por interacciones electrostáticas entre las cargas positivas de los péptidos y las cargas negativas de los lípidos.

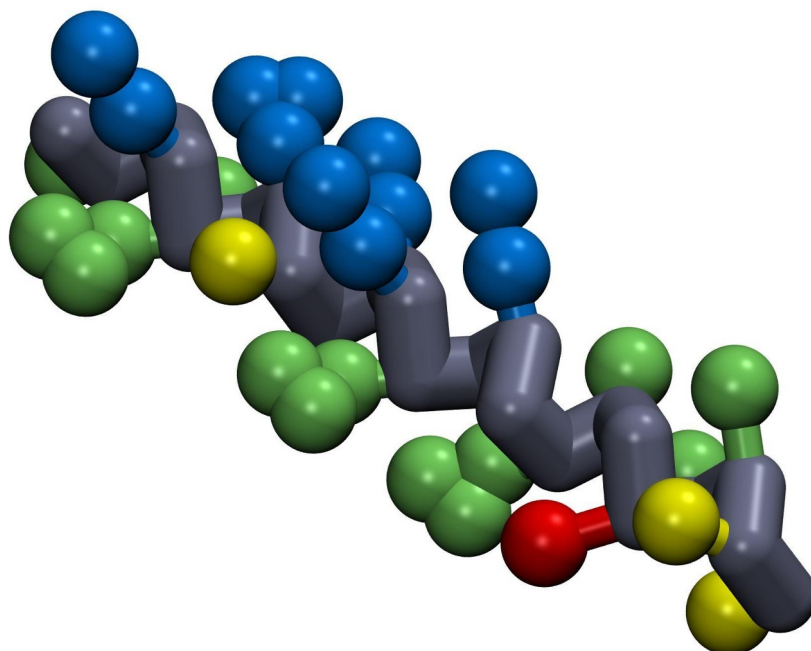
##### Magainin 2

H-Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser-NH<sub>2</sub>



**Figura 3.** Secuencia de aminoácidos y estructura de magainina 2





**Figura 4.** Renderizado de la Magainina con VMD, con un código de colores donde el backbone está representado de color gris, y las cadenas laterales tienen un color según su residuo: los básicos (K, R, H) en azul, los ácidos (D, E) en rojo, los hidrofóbicos (G, A, V, L, I, P, F, M, W) en verde y los polares (S, T, C, Y, N, Q) en amarillo.

Aunque el mecanismo de acción a nivel molecular aún no se comprende completamente, se sabe que la Magainina-2 (Mag-2) ejerce su actividad antimicrobiana según un mecanismo toroidal<sup>13</sup>.

Sin embargo, los eventos moleculares que subyacen a este mecanismo aún están lejos de ser completamente comprendidos. Las técnicas experimentales de laboratorio actuales se encuentran con limitaciones significativas al intentar desentrañar las complejidades a nivel atómico de las interacciones entre las magaininas y las membranas bacterianas. En este contexto, las simulaciones computacionales de dinámica molecular (MD) emergen como una herramienta poderosa que puede ofrecer insights detallados y a nivel molecular que son difíciles, si no imposibles, de obtener en experimentos *in vitro* o *in vivo*. Estas simulaciones permiten a los investigadores modelar sistemas biológicos a una escala atómica y observar la evolución temporal de las interacciones entre moléculas. Con la ayuda de la dinámica molecular, podemos explorar cómo los péptidos antimicrobianos como las magaininas interactúan con la bicapa lipídica, cómo se insertan y forman poros en las membranas, y cómo esto conduce a la pérdida de la integridad celular y eventualmente a la muerte de la bacteria. Esta aproximación computacional no sólo

complementa los métodos experimentales sino que también puede predecir el comportamiento de los AMPs en escenarios que todavía no se han explorado en el laboratorio, acelerando así el desarrollo de nuevos fármacos basados en estos péptidos naturales.

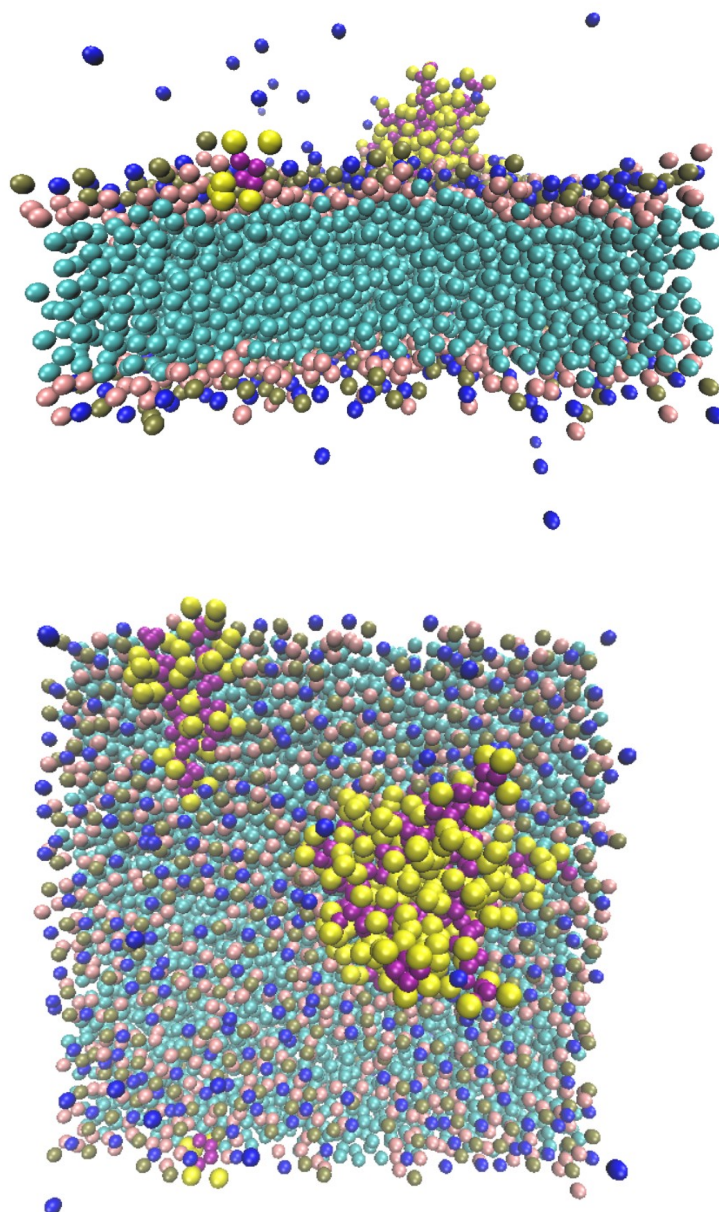
En el grupo de investigación donde se llevó a cabo el proyecto tienen gran experiencia utilizando simulaciones de dinámica molecular para explorar el funcionamiento de los AMPs en el contexto de la membrana celular. Recientemente, han desarrollado Supepmem, una base de datos exhaustiva de simulaciones de dinámica molecular, accesible a través de [www.supepmem.com](http://www.supepmem.com), que incluye una variedad de péptidos y composiciones de membranas, incluyendo modelos de membranas bacterianas<sup>14</sup>.

A pesar de que la base de datos Supepmem constituye un recurso valioso, cabe destacar que hasta el momento, todas las simulaciones se han realizado con la presencia de una única unidad de péptido. Este enfoque no considera cómo la concentración del péptido puede afectar a la membrana. Se sabe que la cantidad de péptidos es clave; puede ser la diferencia entre romper o no la membrana. Por tanto, es muy importante hacer simulaciones con más unidades de péptido para obtener resultados que se acerquen más a la realidad biológica y nos ayuden a comprender mejor cómo los AMPs luchan contra las bacterias. Con estos conocimientos, será posible diseñar tratamientos más eficaces que utilicen los AMPs para enfrentar las infecciones bacterianas.

## **2. OBJETIVO**

El objetivo central de este proyecto es aplicar simulaciones de dinámica molecular para estudiar la interacción de múltiples unidades del péptido antimicrobiano magainina con membranas plasmáticas modelo de bacterias y de mamíferos, empleando POPC y POPE:POPG, respectivamente. Este estudio busca elucidar el mecanismo de acción de la magainina, abriendo vías para el diseño de nuevos agentes antibióticos inspirados en estos péptidos naturales. En lugar de limitar el análisis a una única unidad de péptido, el proyecto se enfoca en examinar el efecto de utilizar múltiples unidades, lo que permitirá una comprensión más completa y realista de la interacción péptido-membrana.

Como objetivo secundario, el proyecto facilitará la introducción a la dinámica molecular, brindando una experiencia práctica sobre cómo las herramientas computacionales pueden ser aplicadas al estudio de procesos biológicos complejos.



**Figuras 5 y 6:** Vista lateral y superior de la interacción péptido-membrana bacteriana en un instante de trayectoria (frame 19733), utilizando la aplicación VMD. Se utilizó un 75% de lípidos de tipo POPE y un 25% de tipo POPG.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Programas utilizados para llevar a cabo el proyecto

-GROMACS (GRoningen Machine for Chemical Simulations), es un paquete versátil para realizar simulaciones de dinámica molecular. En este proyecto, GROMACS se emplea para simular las ecuaciones de movimiento newtonianas aplicadas al sistema compuesto por las distintas membranas plasmáticas (modelo de mamífero y bacteria) así como los péptidos y el propio medio (agua)<sup>15</sup>.

-VMD (visual molecular dynamics), es un programa diseñado para la representación y análisis de moléculas, en particular biopolímeros como proteínas y ácidos nucleicos utilizando gráficos 3D<sup>16</sup>.

-Check Point Mobile, una VPN que nos permite crear una red privada y segura a través de internet, requisito fundamental para conectarse al CESGA desde fuera de la Universidad.

-MobaXterm, una terminal para Windows que simula un entorno Linux.

### **3.2 Conexión con el CESGA**

El CESGA (Centro de Supercomputación de Galicia), fundado en 1993, es un centro de cálculo de altas prestaciones situado en Santiago de Compostela.

Entre las infraestructuras del CESGA destaca el superordenador FinisTerra III (FT3). Para acceder al CESGA y por ende, a este supercomputador, necesitamos una VPN (Check Point Mobile) y una terminal Linux, por lo que al hacer el trabajo desde un ordenador Windows, utilizamos MobaXterm.

### **3.3 Construcción del sistema, preparación y ejecución de las simulaciones de dinámica molecular**

#### **Modelado coarse grained (CG)**

El uso de modelos de grano grueso o Coarse-Grained (CG) ha demostrado ser una herramienta valiosa en una variedad de técnicas de simulación computacional para probar las escalas de tiempo y longitud de los sistemas más allá de lo que es factible con los modelos tradicionales de todos los átomos (all atoms, AA). Los modelos CG aplicados al estudio de sistemas lipídicos en particular, se han vuelto ampliamente utilizados. Se dispone de una gran diversidad de enfoques CG que van desde modelos cualitativos sin moléculas solventes (solvente implícito), pasando por modelos más realistas con agua explícita pero simplificada, hasta modelos que incluyen especificidad química.

De manera general, los modelos CG de un sistema a un nivel de sub-residuo, busca mantener las propiedades químicas relevantes de las estructuras, y pretende establecer un balance fino entre incrementar el muestreo y el valor estadístico de la simulación, pero con una reducción razonable en los detalles del sistema<sup>17</sup>.

Entre sus principales características, la reducción del número de grados de libertad junto con el uso de potenciales de corto alcance lo hace computacionalmente muy eficiente. En comparación con los modelos atomísticos, se puede lograr una ganancia en tiempos de simulación de 3-4 órdenes de magnitud<sup>18</sup>. Por lo tanto, las escalas de longitud de micrómetros o las escalas de tiempo de milisegundos están al alcance de estudio con dicha metodología.

#### **Campo de Fuerza MARTINI**

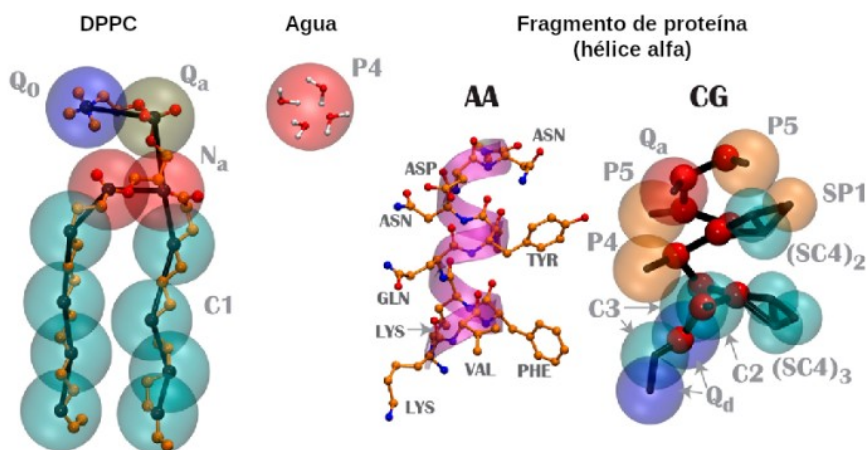
El campo de fuerza MARTINI es un campo de fuerza de grano grueso (CG) adecuado para simulaciones de dinámica molecular de sistemas biomoleculares. Dicho campo proporciona parámetros para una variedad de biomoléculas, que incluyen lípidos, colesterol, aminoácidos, azúcares, ADN, fullereno, colágeno, péptidos y proteínas.

La experiencia en numerosos trabajos demuestra que MARTINI reproduce satisfactoriamente las propiedades de una amplia gama de sistemas, las cuales incluyen

propiedades estructurales (como densidades líquidas, área/lípido para muchos tipos de lípidos en bicapas, conformaciones de lípidos accesibles, ángulo de inclinación de péptidos helicoidales en membrana o motivos de empaquetamiento de hélice-hélice), elásticas (módulo de flexión bicapa, tensión de ruptura), dinámicas (tasas de difusión de lípidos, péptidos y proteínas, agua transmembrana, tasa de permeación, escalas de tiempo para la agregación de lípidos) y termodinámicas (temperaturas de transición de fase bicapa, propensión a la orientación de péptidos interfacial, energía libre de disociación de lípidos, datos de formación del dominio de membrana)<sup>18</sup>.

El sistema a estudiar está compuesto por un gran número de moléculas, lo que requiere demasiado tiempo de cálculo: analizar como varias unidades de AMPs interaccionan con la membrana, si existe interacción entre ellas... En este proyecto, se utilizó el modelo de campo de fuerzas MARTINI para llevar a cabo las simulaciones de dinámica molecular.

MARTINI, como vimos anteriormente, es una técnica de grano grueso que simplifica las representaciones moleculares manteniendo la precisión necesaria para capturar la dinámica e interacciones clave a nivel molecular. En lugar de representar cada átomo de forma individual, MARTINI agrupa varios átomos en una única “bead” o esfera, lo que reduce la complejidad computacional y permite simulaciones de mayor escala y más extensas en el tiempo. Esta aproximación es particularmente valiosa en el estudio de sistemas biológicos complejos, como las interacciones de los péptidos antimicrobianos con las membranas celulares, ya que facilita la exploración de procesos en escalas de tiempo y longitud que serían inaccesibles con modelos totalmente atómicos, a costa de perder resolución.



**Figura 7.** Los modelos de MARTINI. Modelos CG de un fosfolípido, la dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), moléculas de agua y un fragmento helicoidal de una proteína. En este último caso, se comparan la estructura atomística (AA, izquierda) con el modelo CG de MARTINI (derecha). Los hidrógenos solo se muestran para el agua AA. En gris se indican los nombres de algunos tipos de partículas CG<sup>19</sup>.

En nuestras simulaciones incorporamos fragmentos de membranas constituídas únicamente por lípidos (500, 250 por capa)<sup>4</sup> y con ambos lados de la bicapa de igual composición. Para la construcción de la membrana utilizamos una herramienta on-line llamada CHARMM-GUI.

Las membranas creadas para el proyecto cuentan con estas características:

- Utilizamos el campo de fuerza Martini 2.2.
- Para la simulación, utilizamos una caja, en la cual, si una partícula sale por el límite derecho, volvería a entrar al sistema por el izquierdo, eliminando así las colisiones con el propio límite y obteniendo unos resultados más cercanos a la realidad.

La composición de los modelos simplificados de las diferentes membranas celulares que utilizamos se muestran en la siguiente tabla.

Lípido	Mamífero	Bacteria
POPC	100%	—
POPE	—	75%
POPG	—	25%

**TABLA 1.** Composición de los modelos simplificados de las membranas celulares que utilizamos.

Para construir el péptido usamos el script *PeptideBuilder.py*, que nos facilitó la creación de la estructura atomística y de grano grueso a partir de la secuencia primaria del péptido. En este estudio, se incorporaron 10 unidades del péptido en uno de los lados de la bicapa lipídica, y se añadieron los iones necesarios para mantener la neutralidad del sistema. La simulación se llevó a cabo durante 4000 ns (4 microsegundos). Utilizamos 16 procesadores en paralelo durante 30 horas, acumulando un total de 480 horas de procesamiento, equivalentes a más de 20 días si se realizase en un único procesador.

Para lanzar la simulación, se utilizó un script de bash, necesario para interactuar con el sistema de colas FT3. Este sistema está diseñado para optimizar la eficiencia del proceso de simulación, lo que requirió que subiéramos nuestra tarea a la cola de procesamiento. Este enfoque garantiza que la simulación se ejecute de manera eficiente, aprovechando al máximo los recursos computacionales disponibles.

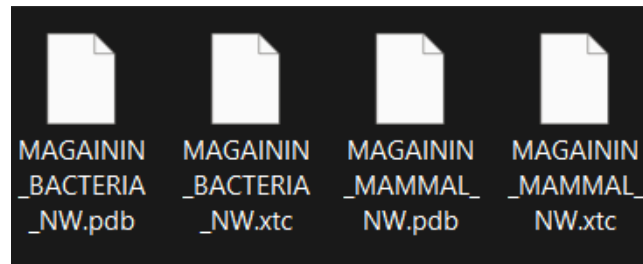
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Análisis cualitativos: Visualización de la simulación

Una vez procesada la simulación, obtuvimos una gran cantidad de archivos con diferentes extensiones, pero nos quedamos con los que tenían la extensión .xtc, un archivo comprimido de trayectoria de GROMACS. Este archivo contiene información esencial sobre las coordenadas de los átomos del sistema a lo largo del tiempo de simulación, además de las velocidades y fuerzas de los átomos en cada paso de tiempo, permitiéndonos analizar la dinámica del sistema y las interacciones moleculares detalladamente.

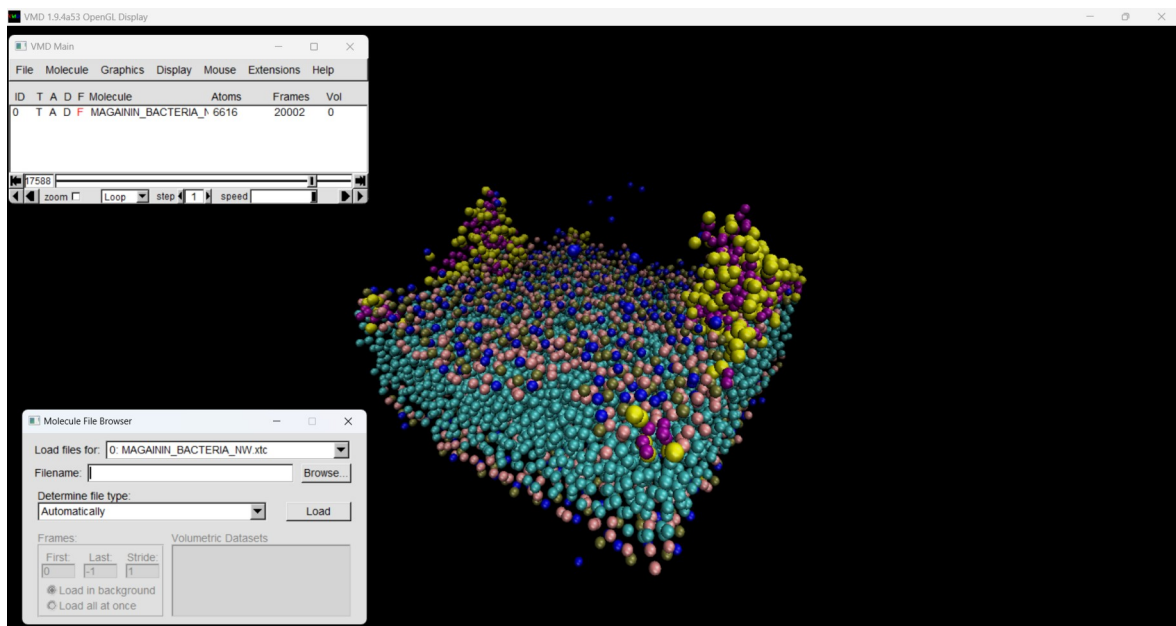
También obtuvimos la estructura de los dos sistemas simulados en el instante final, tras los 4000 ns de simulación, en formato .pdb (Protein Data Bank), un formato de archivo estándar para datos de estructuras moleculares, principalmente de proteínas y ácidos nucleicos. Este archivo incluye detalles como la posición tridimensional de cada átomo en la molécula, permitiéndonos visualizar la estructura final del sistema y realizar análisis estructurales detallados. A mayores, la simulación nos facilitó una serie de gráficas que posteriormente serán analizadas.





**Figura 8.** VMD. Archivos utilizados para la visualización.

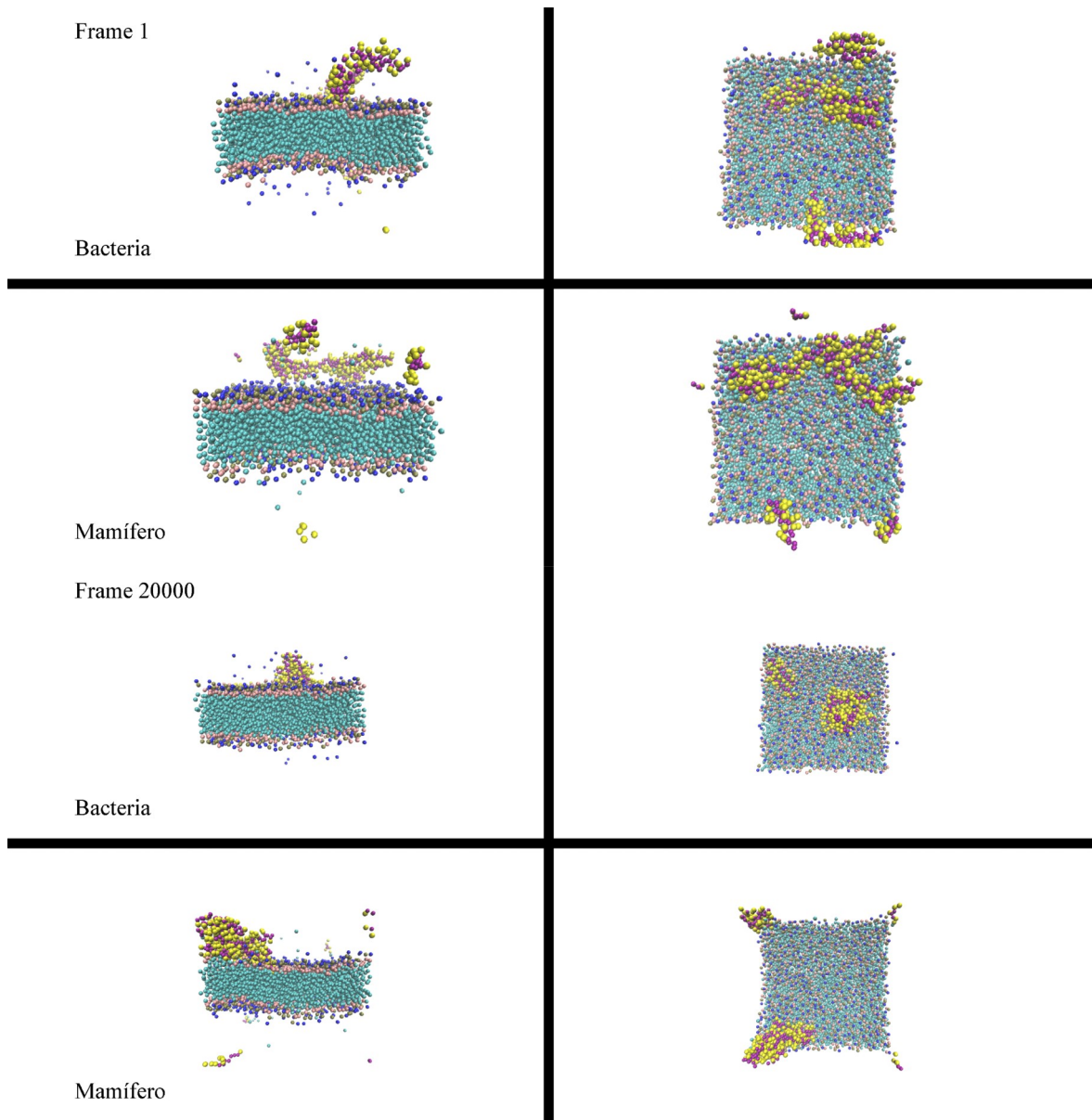
Una vez obtenidos estos archivos, cargamos la trayectoria, con su correspondiente membrana en el software de visualización VMD (.pdb + .xtc), permitiéndonos observar la interacción dinámica péptido-membrana a lo largo del tiempo simulado.



**Figura 9.** Captura de pantalla de la interfaz de VMD (Visual Molecular Dynamics) mostrando una visualización avanzada del sistema molecular. Se combina el archivo .pdb, que define la estructura atómica al final de la simulación, con la trayectoria dinámica contenida en el archivo .xtc. Esta representación resalta la aplicación de condiciones periódicas de contorno, donde el sistema parece estar 'partido' o segmentado, demostrando cómo las partículas que salen por un lado del sistema reaparecen inmediatamente por el lado opuesto, creando la ilusión de continuidad y evitando artefactos de borde en el modelo simulado.

## 4.2. Análisis cuantitativo de la simulación de dinámica molecular

Además de la capacidad de visualizar la trayectoria mediante un visualizador molecular, las simulaciones moleculares nos dan la oportunidad de realizar una amplia gama de análisis cuantitativos sobre las propiedades del sistema. Estos análisis nos permiten cuantificar y caracterizar diversos parámetros, así como monitorear la evolución del sistema a lo largo del tiempo de manera detallada. Esta funcionalidad es esencial para profundizar en la comprensión de los fenómenos observados y para extraer conclusiones significativas sobre el comportamiento molecular durante la simulación.



**Figura 10 y 11:** Vista superior y frontal de la membrana bacteriana y de mamífero en el primer y último frame de trayectoria, obtenidos mediante la aplicación VMD.

#### 4.2.1 Evolución temporal del número de contactos entre las distintas partes del sistema

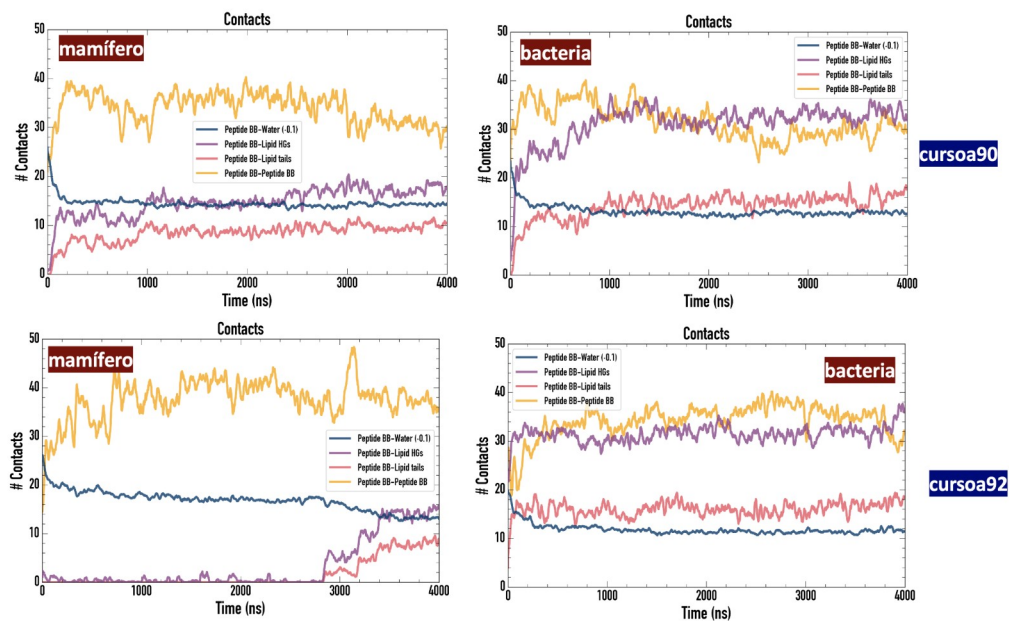
Estas gráficas de la figura 12 se muestran la variación a lo largo del tiempo del número de contactos entre el esqueleto peptídico del péptido (BB), y las cabezas de los lípidos (Lipid HGs), definiendo contacto como positivo si dos beads del BB y las cabezas de los lípidos se encuentran a menos de 0.6 nm de distancia

El número de contactos entre los péptidos y las cabezas de lípidos es mucho mayor en el caso de la membrana de la bacteria, lo que sugiere una interacción más específica, además de una posible mayor afinidad por las características de esta. También podemos apreciar que el número de contactos entre los péptidos (BB) es mayor en el caso de la membrana del mamífero, esto nos sugiere que al estar interactuando menos con la membrana, se están produciendo más interacciones entre ellos. En el análisis de la bacteria vemos que el número de contactos con el agua es ligeramente menor, esto puede



indicarnos que los péptidos están más profundamente incrustados en la membrana de la bacteria. Por otro lado, el hecho de que el número de contactos sea mayor en la membrana del mamífero, nos puede sugerir que los péptidos interactúan de manera diferente, o tienen un impacto más leve en esta membrana. Finalmente, vemos que el contacto entre los péptidos y las colas de los lípidos es bastante mayor en el caso de la bacteria, lo que nos indica que los péptidos se están adentrando más a la zona hidrofóbica de la membrana, de ahí el hecho de que los contactos con el agua sean menores.

Con estos resultados observamos, y podemos deducir que los péptidos (por los motivos comentados anteriormente) van a interactuar más con la membrana de la bacteria. El hecho de que el péptido se introduzca en la membrana puede causar perturbaciones en la estructura de esta, alterando su integridad, además pueden provocar la fuga de componentes celulares esenciales, pudiendo llevar a la muerte celular.



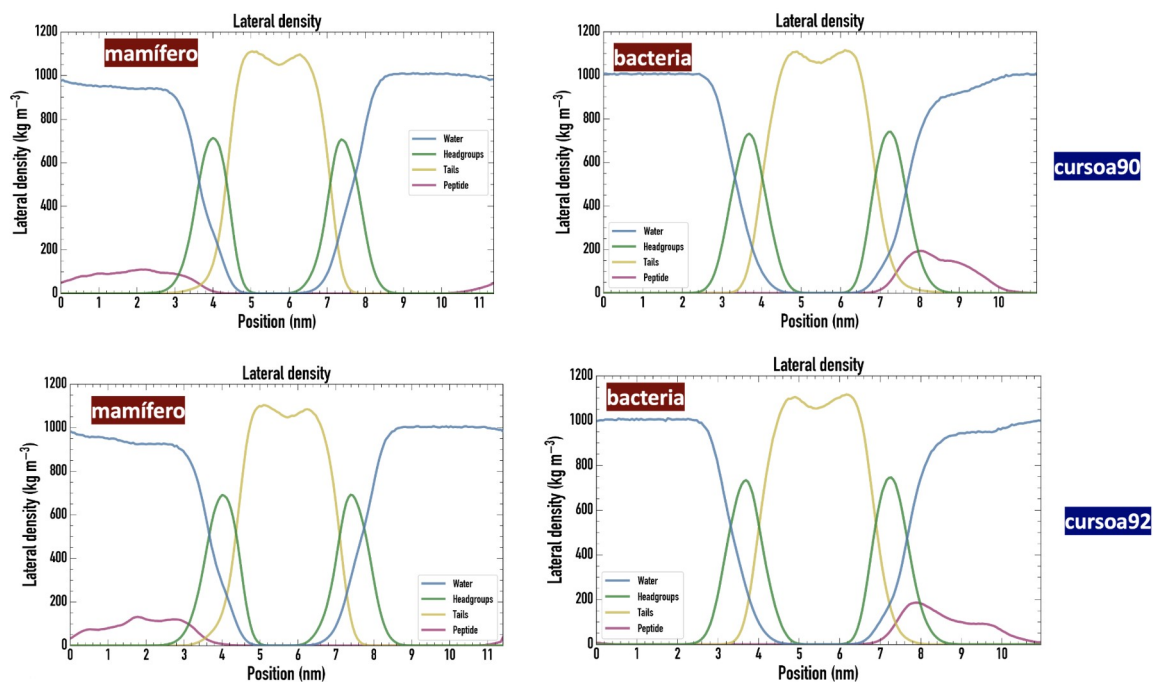
**Figura 12.** Evolución temporal del número de contactos entre diferentes partes de los sistemas simulados, correspondientes a la membrana de mamífero o bacteria. El color azul denota contactos entre el esqueleto de los péptidos y el agua; el violeta, entre el esqueleto de los péptidos y las cabezas de los lípidos; el rosa, entre los péptidos y las colas de los lípidos; y el amarillo, los contactos péptido-péptido. Cada fila se corresponde con la simulación llevada a cabo por un alumno diferente.

### 4.3 Densidad de los componentes del sistema

El análisis de la densidad lateral (Figura 13) nos aporta información similar a la anterior, pero representada de otra forma. Estas gráficas muestran, a lo largo de un tiempo medio de la trayectoria (no un momento instantáneo), un corte transversal del sistema que estamos analizando, permitiéndonos visualizar la densidad de cada componente a lo largo de la dirección z. Importante mencionar que el lado de la membrana por el que interacciona el péptido es irrelevante puesto que las membranas son simétricas y los péptidos pueden interactuar (por condiciones periódicas) por ambos lados.

La primera apreciación que podemos hacer sobre las gráficas es el hecho de que en la zona de las colas (Tails) no hay agua (Water), puesto que estas son hidrofóbicas, los péptidos (violeta) se encuentran situados en la parte exterior de la membrana; además en el caso de la bacteria vemos una mayor densidad de péptidos en las cabezas de lípidos, frente a la membrana del mamífero, significando esto que la tendencia de los péptidos a

interactuar con la membrana va a ser mayor en el caso de la bacteria, afectando así a la integridad y función de esta.



**Figura 13.** Distribución de la densidad lateral de los componentes del sistema en la simulación con la membrana de mamífero y bacteria. Los gráficos muestran la densidad de agua (azul), cabezas de lípidos (verde), colas de lípidos (amarillo) y péptidos (rosa) en función de su posición a lo largo de la membrana. Cada fila corresponde a una simulación independiente llevada a cabo por distintos alumnos, identificados como cursoa90 y cursoa92, respectivamente.

## 5. CONCLUSIONES Y PROPUESTA DE CONTINUIDAD

En este proyecto se ha investigado la interacción de 10 unidades de péptidos antimicrobianos magaininas con modelos de membranas de mamíferos y bacterias a través de simulaciones de dinámica molecular. Estos péptidos, que desempeñan un papel esencial en las defensas naturales contra patógenos, ofrecen una prometedora vía de investigación frente a la creciente resistencia a los antibióticos. La simulación de múltiples unidades de péptido proporciona una representación más fidedigna de la realidad biológica, permitiendo apreciar el impacto colectivo de los AMPs sobre las membranas y su posible uso en terapias innovadoras.

Los resultados demuestran que los péptidos tienden a insertarse más profundamente en las membranas bacterianas en comparación con las de mamíferos. Esto se evidencia en la disminución de los contactos péptido-agua y un aumento de las interacciones péptido-cabezas y péptido-colas de lípidos en bacterias. Además, se observa una variación significativa en las interacciones péptido-péptido, lo que indica distintas dinámicas de agrupamiento y asociación en cada tipo de membrana.

A nivel cualitativo, se visualizó mediante VMD la dinámica temporal de la interacción péptido-membrana, y cuantitativamente, se caracterizó la evolución del sistema a través de gráficos detallados que mostraron los cambios en el número de contactos entre los diferentes componentes del sistema. El análisis de densidad lateral confirmó la

tendencia de los péptidos a una asociación más estrecha con las membranas bacterianas, lo que sugiere una mayor perturbación y posible compromiso de su integridad estructural y funcional en comparación con las membranas de mamíferos.

La comprensión detallada de la interacción entre los AMPs y las membranas a nivel molecular abre la posibilidad de diseñar nuevos péptidos sintéticos o modificados que mantengan la eficacia de los AMPs naturales mientras minimizan los riesgos de resistencia y toxicidad. Este conocimiento es muy importante para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que puedan complementar o reemplazar los antibióticos convencionales y abordar el desafío global de la resistencia a los antibióticos.

El proyecto también ha demostrado el valor de las simulaciones de dinámica molecular como una herramienta educativa para introducir a los estudiantes en el uso de técnicas computacionales avanzadas. En el proyecto no sólo hemos aprendido sobre la estructura y función de las membranas celulares y los AMPs, sino que también adquirimos experiencia práctica en la realización de simulaciones moleculares y la interpretación de datos complejos.

## **6. AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo no habría sido posible sin la gran ayuda, guía y colaboración de nuestros coordinadores de la USC: Rebeca García Fandiño y Fabián Suárez Lestón, que nos apoyaron en todo momento de la investigación y redacción del trabajo. Por otro lado, hemos de agradecer por su trabajo y paciencia a Virginia Rodríguez Álvarez, «Viqui», quien nos acompañó durante todo el trabajo, ofreciéndonos otros puntos de vista y animándonos ante estancamientos del mismo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Darby, E.M., Trampari, E., Siasat, P. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol* 21, 280–295, 2023. [[Link](#)]
2. World Health Organization, Antimicrobial resistance, 2023 [[Link](#)]
3. Richard M. Epan, Chelsea Walker, Raquel F. Epan, Nathan A. Magarvey, Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1858, Issue 5, 2016, Pages 980-987, ISSN 0005-2736 [[Link](#)]
4. Brender Jeffrey R., McHenry Austin J., Ramamoorthy Ayyalusamy, Does Cholesterol Play a Role in the Bacterial Selectivity of Antimicrobial Peptides?, *Frontiers in Immunology*, Volume 3, 2012, ISSN 1664-3224 [[Link](#)]
5. Huan Yuchen, Kong Qing, Mou Haijin, Yi Huaxi, Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields, *Frontiers in Microbiology*, Volume 11, 2020 [[Link](#)]
6. Huan, Y., Kong, Q., Mou, H. & Yi, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.* 11, (2020). [[Link](#)]
7. Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C. & Yang, X. Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. *Botanical Studies* vol. 62 (2021). [[Link](#)]
8. Dijksteel, G. S., Ulrich, M. M. W., Middelkoop, E. & Boekema, B. K. H. L. Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs). *Frontiers in Microbiology* vol. 12 (2021). [[Link](#)]
9. Dijksteel Gabrielle S. , Ulrich Magda M. W. , Middelkoop Esther, Boekema Bouke K. H. L. , Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs), *Frontiers in Microbiology*, Volume 12, 2021 [[Link](#)]
10. Olascoaga-Del Angel, K. S. et al. Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Gac. Med. Mex.* 154, (2018) [[Link](#)]
11. Michael Zasloff, Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 84, pp. 5449-5453 (1987) [[Link](#)]
12. Coquet L., Kolodziejek J., Jouenne T., Nowotny N., King J.D., Conlon J.M. Peptidomic analysis of the extensive array of host-defense peptides in skin secretions of the dodecaploid frog *Xenopus ruwenzoriensis* (Pipidae) *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genom. Proteom.* 2016;19:18–24. doi: 10.1016/j.cbd.2016.04.006. [[Link](#)]
13. Di Somma A, Cané C, Moretta A, Illiano A, Pinto G, Cavasso D, Amoresano A, Paduano L and Duilio A (2022) The antimicrobial peptide Magainin-2 interacts with BamA impairing folding of *E. coli* membrane proteins. *Front. Chem.* 10:1013788. doi: 10.3389/fchem.2022.1013788 [[Link](#)]
14. Fabián Suarez-Leston, Martin Calvelo, Gideon F. Tolufashe, Alicia Muñoz, Uxía Veleiro, César Porto, Margarida Bastos, Ángel Piñeiro, Rebeca Garcia-Fandino, SuPepMem: A database of innate immune system peptides and their cell membrane interactions, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, Volume 20, 2022, Pages 874-881, ISSN 2001-0370 [[Link](#)]
15. Mark James Abraham, Teemu Murtola, Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, Erik Lindahl, GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*, Volumes 1–2, 2015, Pages 19-25, ISSN 2352-7110 [[Link](#)]
16. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996 Feb;14(1):33-8, 27-8. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5. PMID: 8744570. [[Link](#)]
17. Marrink, Siewert J. and Risselada, H. Jelger and Yefimov, Serge and Tieleman, D. Peter and de Vries, Alex H. , The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for

Biomolecular Simulations, The Journal of Physical Chemistry B, Volume 111, 2007  
[\[Link\]](#)

18. Marrink, S. J., De Vries, A. H., Mark, A. E. Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations. The Journal of Physical Chemistry B, 108 (2), 750–760, 2004 [\[Link\]](#)
19. Franco Cometto Vincente. Análisis de redes aplicado a dinámicas moleculares de tipo coarse-grain. Estudio de la relación entre oligomerización y señalización de los receptores de la familia del factor de necrosis tumoral. Departamento de Física Médica – Centro Atómico Bariloche (2021) [\[Link\]](#)