



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA NANOESTRUCTURADO DE
GELATINA Y ANÁLOGOS DE SAXITOXINA: ESTUDIO *in silico*.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Leonel Arturo García Pérez

La Paz, Baja California Sur, marzo de 2023.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14 horas del día 21 del Mes de Febrero del 2023, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"EVALUACIÓN DE UN SISTEMA NANOESTRUCTURADO DE GELATINA Y ANÁLOGOS DE SAXITOXINA: ESTUDIO *in silico*"

Presentada por el alumno:

Leonel Arturo García Pérez

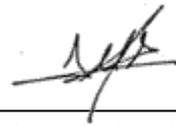
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



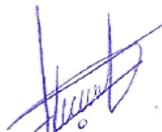
Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz
Co-Directora de Tesis



Dr. Luis Hernández Adame
Co-Director de Tesis



Dr. Erik Díaz Cervantes
Co-Tutor de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a 21 de febrero de 2023.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante **Leonel Arturo García Pérez** del Programa de **Maestría en el uso manejo y conservación de los recursos naturales**, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Excluir citas
Excluir bibliografía
- Porcentajes de similitud:
El porcentaje de similitud del documento es del **14%**
Se muestra captura de pantalla



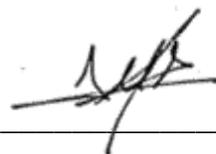
The screenshot shows the iThenticate plagiarism report interface. The main title is "EVALUACIÓN DE UN SISTEMA NANOESTRUCTURADO DE GELATINA Y ANALOGOS". The overall similarity percentage is 14%. The report includes the logo of the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. and the title of the thesis: "EVALUACIÓN DE UN SISTEMA NANOESTRUCTURADO DE GELATINA Y ANALOGOS DE SAKITOXINA: ESTUDIO in silico". A red box highlights "TESIS" and another red box says "Que para obtener el grado de". On the right side, there is a "Resumen de Coincidencias" table with the following data:

Item	Match	Similarity
1	Match: 20 palabras Copied in 5/16/2022 www.scribd.com/doc/14567890	3%
2	Match: 20 palabras Copied in 5/16/2022 www.scribd.com/doc/14567890	3%
3	Match: 10 palabras Copied in 5/16/2022 www.scribd.com/doc/14567890	1%
4	Match: 10 palabras Copied in 5/16/2022 www.scribd.com/doc/14567890	1%
5	Match: 10 palabras Copied in 5/16/2022 www.scribd.com/doc/14567890	1%
6	Match: 10 palabras Copied in 5/16/2022 www.scribd.com/doc/14567890	1%
7	Match: 10 palabras Copied in 5/16/2022 www.scribd.com/doc/14567890	<1%

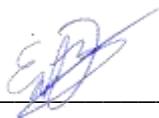
Firmas del comité



Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz



Dr. Luis Hernández Adame



Dr. Erik Díaz Cervantes

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dr. Luis Hernández Adame
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dr. Erik Díaz Cervantes
Universidad de Guanajuato
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz
Dr. Luis Hernández Adame
Dr. Erik Díaz Cervantes

Jurado de Examen

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz
Dr. Luis Hernández Adame
Dr. Erik Díaz Cervantes

Suplente

Dra. Elizabeth Monreal Escalante

Resumen

Las toxinas paralizantes (TP) provenientes de dinoflagelados marinos, son un grupo de alcaloides neurotóxicos. Las TP están conformadas por una estructura heterocíclica con dos grupos guanidina, los cuales son responsables de la polaridad positiva y de su propiedad bloqueadora de canales de sodio dependientes de voltaje en vertebrados en un pH de 7. Estas propiedades han sido motivo de estudio en el campo biomédico, principalmente para tratamientos de enfermedades relacionadas con el sistema nervioso. Sin embargo, estos alcaloides presentan una elevada toxicidad por lo que se requiere controlar de manera efectiva la dosis terapéutica. Una alternativa es utilizar nanoacarreadores como la gelatina tipo A (GelNP) la cual es un biopolímero natural derivado de la hidrólisis del colágeno, cuyo uso en el campo biomédico es muy versátil debido a su biocompatibilidad y propiedades coloidales. En este sentido, el presente trabajo pretende hacer predicciones *in silico* de un novedoso sistema nanoestructurado entre nanopartículas de GelNP como vehículo de transporte y las TP, con el objetivo de modular el tiempo de acción y disminuir su toxicidad. Las predicciones se hicieron desarrollando el modelado, la simulación y la visualización de las mismas. Con el programa Avogadro, se modelaron 36 análogos de las TP, los cuales se identifican por sus sustituyentes, así como; de igual manera, se consideró como modelo de la gelatina tipo A, un monómero y un polímero de la misma. Se corrigieron las distancias y ángulos de enlace de los átomos de estas moléculas con el método de optimización del campo de fuerza universal (UFF), así como, se les asignó la carga neta correspondiente. La visualización se llevó a cabo con el programa Chimera 1.5.3. Finalmente, se evaluó el acoplamiento molecular *in silico* (*docking*) y la afinidad de las TP y la GelNPs con el programa Molegro Virtual Docker (MVD). Los resultados indican que las TP que tienen una mayor afinidad con la GelNP son la Saxitoxina (STX), Carbamatos 1 y 3 (C1 y C3), y los epímeros Goniautoxinas 2 y 3 (GTX 2/3). Esto nos demuestra que dichas toxinas son candidatos óptimos para la síntesis del complejo nanoestructurado.

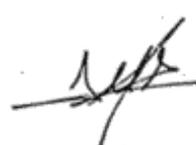
Palabras claves: Toxinas paralizantes, gelatina tipo A, nanoacarreadores, acoplamiento molecular

ORCID 0000-0003-0142-1520

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz



Dr. Luis Hernández Adame

Summary

Paralyzing toxins (PT) from marine dinoflagellates are a group of neurotoxic alkaloids. PTs are heterocyclic structures with two guanidine groups responsible for their positive polarity and blocking properties of voltage-gated sodium channels in vertebrates at a physiological pH of 7. These properties have been the subject of study in the biomedical field, mainly for treating diseases related to the nervous system. However, these alkaloids have high toxicity, so it is necessary to control the therapeutic dose effectively. An alternative is to use nanocarriers such as type A gelatin (GelNP), a natural biopolymer derived from the hydrolysis of collagen, whose use in the biomedical field is very versatile due to its biocompatibility and colloidal properties. In this sense, the present work intends to make *in silico* predictions of a novel nanostructured system between GelNP nanoparticles as a transport vehicle and PT to modulate the action time and reduce its toxicity. The predictions were made by developing the modeling, simulation, and visualization. With the Avogadro program, 36 PTs analogs were modeled and identified by their substituents; similarly, type A gelatin, a monomer, and a polymer were considered models. The distances and bond angles of the atoms of these molecules were corrected with the universal force field (UFF) optimization method, and the corresponding net charge was assigned to them. The visualization was carried out with the Chimera 1.5.3 program. The *in silico* molecular docking and the affinity of the PTs and GelNPs were evaluated with the Molegro Virtual Docker (MVD) program. The results indicate that the PTs that have a higher affinity with GelNP are Saxitoxin (STX), Carbamates 1 and 3 (C1 and C3), and the Gonyautoxins 2 and 3 (GTX 2/3) epimers. These toxins are optimal candidates for the synthesis of the nanostructured complex.

Keywords: Paralyzing toxins, type A gelatin, nanocarriers, molecular docking

ORCID 0000-0003-0142-1520

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz



Dr. Luis Hernández Adame

Dedicatoria

Este trabajo se lo quiero dedicar a mi familia y mis amigos que siempre me apoyaron en este proceso de crecimiento personal y académico.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., por permitirme cursar la maestría de forma virtual durante la contingencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada No. 1086773.

A la Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz por su constante apoyo y por facilitarme un lugar donde trabajar.

Al Dr. Luis Hernández Adame por su guía y apoyo durante la realización del proyecto.

Al Dr. Erik Díaz Cervantes por la disposición a la hora de resolver mis dudas.

A la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del CIBNOR por estar siempre disposición de los alumnos.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vi
Lista de tablas	viii
Abreviaturas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Toxinas paralizantes	1
1.2 Nanopartículas	3
1.2.1 Biopolímero de gelatina	4
1.3 Sistemas nanoestructurados	5
1.3.1 Bioacarreadores para el transporte y liberación de biomoléculas y toxinas	6
1.4 Acoplamiento molecular (docking)	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Toxinas paralizantes y nanoparticulas	10
2.2 Gelatina como nanoacarreador	11
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS	16
5.1 Objetivo general	16
5.2 Objetivos particulares	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS	17
6.1 Modelado de moléculas	17
6.2 Acoplamiento molecular <i>in silico</i> (docking)	18
7. RESULTADOS	21
8. DISCUSIÓN	35
9. CONCLUSIONES	38
10. LITERATURA CITADA	39

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama esquemático que representa objetos en la nanoescala y que corresponde a una dimensión menor que 100 nm.....	3
Figura 2. Clasificación general de las nanopartículas dependiendo de su composición elemental.	4
Figura 3. Estructura química primaria de los biopolímeros a base de gelatina. Su cadena está compuesta principalmente de diferentes aminoácidos como la prolina, alanina y glicina.....	5
Figura 4. Representación de un sistema de liberación de fármacos, toxinas y biomoléculas.	8
Figura 5. Fórmula química básica de las toxinas paralizantes. A) Estructura 2D de la saxitoxina. B) estructura optimizada en 3D con su nomenclatura de colores.	17
Figura 6. Fórmula química del monómero de la gelatina tipo A (GelNP). A) Estructura 2D de la GelNP. B) Estructura optimizada en 3D con su nomenclatura de colores.....	18
Figura 7. Zona de interacción del modelo de la GelNP.....	19
Figura 8. Gráfico de barras con las 36 toxinas paralizantes (TP) y sus valores de eficiencia del ligando en kcal/mol. Para seleccionar la mejor pose para cada ligando se utilizó el criterio de LE1 donde se consideró como mejor pose aquella que reporta la menor energía de unión entre todas las poses evaluadas, obteniendo un total de 36 resultados.	28
Figura 9. Interacción entre las toxinas paralizantes (TP) más afines y la gelatina tipo A (GelNP). Las toxinas se muestran de diferentes colores: rojo [01]STX, azul [00]dcGTX2, guinda [00]gtx2, verde [00]dcSTX, y en color amarillo [00]GC6a.	29
Figura 10. Estructura tipo “resorte” de la gelatina tipo A (GelNP). Las flechas señalan la parte interna del resorte donde se observó que las 5 toxinas paralizantes (TP) tienden a unirse a la parte interna de la GelNP.....	29
Figura 11. Representación de la interacción de la [01]STX con la gelatina tipo A. Los residuos marcados con un círculo verde son los residuos que interactúan con [01]STX, Arg (arginina), Pro (prolina), Glu (glutamina) El nitrógeno se representa con el color azul, el oxígeno en rojo, el carbono en gris y el hidrógeno en blanco. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas punteadas de color azul.	30
Figura 12. Interacciones de [01]STX con la gelatina tipo A. Arg (arginina), Pro (prolina), Glu (ácido glutámico), las líneas punteadas en azul son representaciones de puentes de hidrógeno, los puntos rojos son oxígeno, los azules son nitrógeno y las líneas blancas los enlaces.....	30
Figura 13. Representación de la interacción de la [00]GTX2 con la gelatina tipo A. los residuos marcados con un círculo verde son los residuos que interactúan con la [00]GTX2, Pro (prolina), Arg (arginina), Glu (ácido glutámico), Ala (alanina). El nitrógeno se representa con el color azul, el oxígeno en rojo, el carbono en gris y el hidrógeno en blanco. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas punteadas de color azul.	31
Figura 14. Interacciones de [00]GTX2 con la gelatina tipo A. Arg (arginina), Pro (prolina), Glu (ácido glutámico), Ala (alanina), los puntos rojos son oxígeno, los azules son nitrógeno, los amarillos fósforo y las líneas blancas representan los enlaces, las líneas punteadas en azul son representaciones de puentes de hidrógeno, las verdes nos indican una interacción electrostática de atracción y las rojas de repulsión.....	31
Figura 15. Representación de la interacción de la [00]dcSTX con la gelatina tipo A. los residuos marcados con un círculo verde son los residuos que interactúan con la [00] dcSTX, Pro (prolina), Arg (arginina), Glu (ácido glutámico) Ala (alanina), Gly (glicina). El nitrógeno se representa con el	

color azul, el oxígeno en rojo, el carbono en gris y el hidrógeno en blanco. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas punteadas de color azul.	32
Figura 16. Interacciones de [00]dcSTX con la gelatina tipo A. Pro (prolina), Glu (ácido glutámico), Ala (alanina), Gly (glicina), los puntos rojos son oxígeno, los azules son nitrógeno y las líneas blancas representan los enlaces. Las líneas punteadas en azul son representaciones de puentes de hidrógeno.	32
Figura 17. Representación de la interacción de la [00]GC6a con la gelatina tipo A. los residuos marcados con un círculo verde son los residuos que interactúan con la [00]GC6a, Pro (prolina), Ala (alanina). El nitrógeno se representa con el color azul, el oxígeno en rojo, el carbono en gris y el hidrógeno en blanco. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas punteadas de color azul.	33
Figura 18. Interacciones de [00]GC6a con la gelatina tipo A. Pro (prolina), Ala (alanina), los puntos rojos son oxígeno, los azules son nitrógeno y las líneas blancas representan los enlaces, las líneas punteadas en azul son representaciones de puentes de hidrógeno.	33
Figura 19. Representación de la interacción de la [00]dcGTX2 con la gelatina tipo A. los residuos marcados con un círculo verde son los residuos que interactúan con la [00]dcGTX2, Pro (prolina), Arg (arginina). El nitrógeno se representa con el color azul, el oxígeno en rojo, el carbono en gris y el hidrógeno en blanco. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas punteadas de color azul.	34
Figura 20. Interacciones de [00]dcGTX2 con la gelatina tipo A Arg (arginina), Pro (prolina), los puntos rojos son oxígeno, los azules son nitrógeno, los amarillos fósforo y las líneas blancas representan los enlaces, las líneas punteadas en azul son representaciones de puentes de hidrógeno.	34

Lista de tablas

Tabla 1. Estructuras químicas representativas de las toxinas paralizantes tomadas de Durán-Riveroll <i>et al.</i> , (2016). Estructura de las toxinas paralizantes STX, saxitoxina; GTX, goniautoxina; Neo, neosaxitoxina; dc, decarbamoilo; GC, toxina de <i>Gymnodinium catenatum</i> . *Estructuras químicas teóricas de GC4, GC5, y GC6, sugeridas por Vale (2008).....	2
Tabla 2. Resultados del acoplamiento molecular entre la gelatina tipo A (GelNP) y 36 toxinas paralizantes (TP) con 5 conformaciones estructurales (poses) cada una. La tabla muestra valores de energía total de la molécula, interacciones por fuerzas de Van der Walls (VdW), y eficiencia de ligando (LE1) con valores en kcal/mol.....	23
Tabla 3. Se muestran las 36 poses de las toxinas paralizantes (TP), seleccionadas por su afinidad, con la gelatina tipo A (GelNP). La tabla muestra valores de energía total de la molécula, interacciones por fuerzas de Van der Walls (VdW), y eficiencia de ligando (LE1) con valores en kcal/mol.....	27
Tabla 4. Poses más afines a la gelatina tipo A (GelNP) seleccionadas de la Tabla 2. La tabla muestra valores de energía total de la molécula, interacciones por fuerzas de Van der Waals (VdW), y eficiencia de ligando (LE1) con valores en kcal/mol.	29

Abreviaturas

GelNP	Nanopartículas de gelatina
TDP	poli (trioil dicarboxílico ácido)-co-poli(etilenglicol)
TTX-EV	Vesículas extracelulares de tetrodotoxina
TP	Toxinas paralizantes
TTX	Tetrodotoxina
STX	Saxitoxina
NEO	Neosaxitoxina
GTX	Gonyoatoxina
B1	Toxina B1
B2	Toxina B2
C1	Toxina C1
C2	Toxina C2
C3	Toxina C3
C4	Toxina C4
dcSTX	Decarbamoil saxitoxina
dcNEO	Decarbamoil neosaxitoxina
dcGTX	Decarbamoil gonyoatoxina 1
GC	Toxina GC
LE1	Eficiencia del ligando
NPs	Nanopartículas

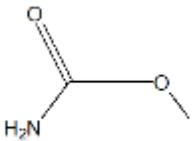
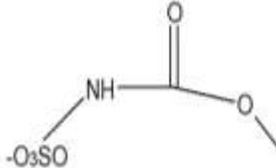
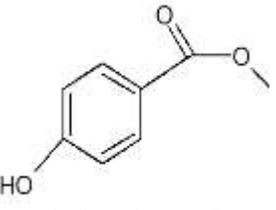
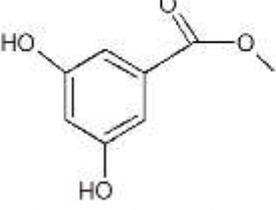
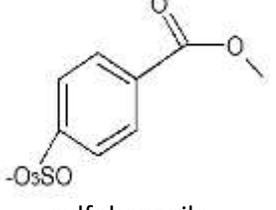
1. INTRODUCCIÓN

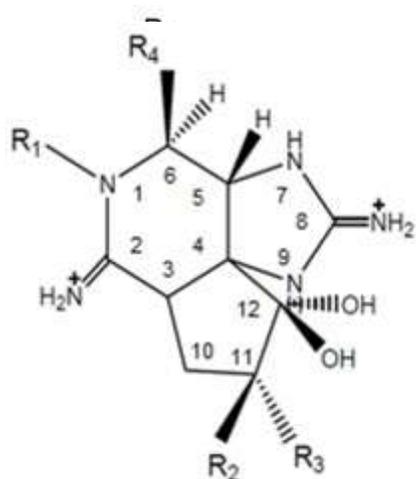
1.1 Toxinas paralizantes

Las toxinas paralizantes (TP) son alcaloides neurotóxicos no proteicos producidos por dinoflagelados marinos de los géneros *Gymnodinium*, *Alexandrium* y *Pyrodinium*, así como otros organismos tanto eucariotas como procariotas (Morey-Gaines, 1982). Estas toxinas ocurren en todo el mundo y son consideradas un serio problema para el desarrollo de la industria comercial, representan un riesgo para la salud pública, así como, son una amenaza para el ambiente marino en general (La Barbera-Sánchez y Gamboa-Maruez, 2001). El efecto perjudicial en la salud se debe a la acción de toxinas presentes en los dinoflagelados, los cuales son ingeridos por moluscos bivalvos por filtración de agua, y transferidos a la cadena trófica, siendo consumidos por los humanos (Maeda-Martínez *et al.*, 2001). En el humano y otros vertebrados actúan principalmente sobre el sistema nervioso periférico, produciendo diversos síntomas que dependen de la gravedad de la intoxicación, como adormecimiento de la boca, encías y lengua, dolor de cabeza, mareos, náuseas, dificultad respiratoria, taquicardia, y en casos graves se produce parálisis muscular, dificultad para respirar y hasta la muerte por parálisis respiratoria (Hallegraeff 2003; Stommel y Watters 2004; Knaack *et al.*, 2016).

La TP son un sistema tricíclico 3,4-propinoperhidropurina, estrechamente relacionadas, de potencia y actividad biológica variable. (Tabla 1) (Wiese *et al.*, 2010). Las más comunes son la saxitoxina (STX), neosaxitoxina (neoSTX), goniaulotoxinas I, II, III, IV (GTX 1-4), B1 (GTX5), B2 (GTX6) y C1-C4 (Bricelj y Shumway 1998). Se han caracterizado fisicoquímica y toxicológicamente más de 57 análogos de las TP, estructuralmente relacionados en dinoflagelados tóxicos y bivalvos filtro-alimentadores, los cuales varían en potencia tóxica y se subclasifican en grupos de alta a baja toxicidad (carbamoil>sulfocarbamoil>decarbamoil>benzoatos) (Faber, 2012; Wiese *et al.*, 2010). La STX es la TP mejor caracterizada, es soluble en agua, termoestable y resistente a soluciones ácidas (Mons *et al.*, 1998), y las GTX son las más abundantes tanto en las algas como en las especies que las consumen (Lagos, 1998; Lagos, 2003).

Tabla 1. Estructuras químicas representativas de las toxinas paralizantes tomadas de Durán-Riveroll *et al.*, (2016). Estructura de las toxinas paralizantes STX, saxitoxina; GTX, goniautoxina; Neo, neosaxitoxina; dc, decarbamoilo; GC, toxina de *Gymnodinium catenatum*. *Estructuras químicas teóricas de GC4, GC5, y GC6, sugeridas por Vale (2008).

Toxina	R1	R2	R3	R4
STX	H	H	H	
NEO	OH	H	H	
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	Carbamoilo
B1	H	H	H	
B2	OH	H	H	
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	
C3	OH	H	OSO ₃ ⁻	
C4	OH	OSO ₃ ⁻	H	N-sulfocarbamoilo
dcSTX	DH	H	H	
dcNEO	OH	H	H	
dcGTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	
dcGTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	Decarbamoilo
GC1	H	H	OSO ₃ ⁻	
GC2	H	OSO ₃ ⁻	H	
GC3	H	H	H	
GC4	OH	H	OSO ₃ ⁻	
GC5	OH	OSO ₃ ⁻	H	
GC6	OH	H	H	P-hidroxibenzoilo
GC1a	H	H	OSO ₃ ⁻	
GC2a	H	OSO ₃ ⁻	H	
GC3a	H	H	H	
GC4a	OH	H	OSO ₃ ⁻	
GC5a	OH	OSO ₃ ⁻	H	
GC6a	H	H	H	di-hidroxibenzoilo
GC1b	H	H	OSO ₃ ⁻	
GC2b	H	OSO ₃ ⁻	H	
GC3b	OH	H	H	
GC4b	OH	H	OSO ₃ ⁻	
GC5b	OH	OSO ₃ ⁻	H	
GC6b	OH	H	H	sulfobenzoilo



1.2 Nanopartículas

Una nanopartícula (NP) es una partícula muy pequeña imperceptible para el ojo humano. Su tamaño se encuentra en la región de la llamada “nanoescala” que corresponde a dimensiones menores de 100 nanómetros (nm) (Angel-Olarte *et al.*, 2019). La Fig. 1 presenta algunos ejemplos diminutos que pueden llegar a estar en la nanoescala, entre los cuales encontramos algunos virus, anticuerpos, el ADN o aún más pequeño, la estructura atómica. La palabra “nano”, proviene del prefijo griego “enano” y en la escala métrica corresponde a la mil millonésima parte de un metro ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$).

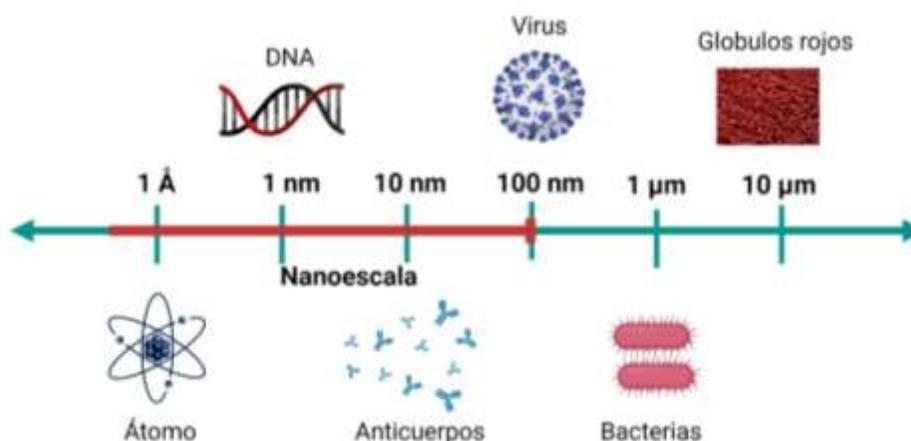


Figura 1. Diagrama esquemático que representa objetos en la nanoescala y que corresponde a una dimensión menor que 100 nm.

Las NPs presentan propiedades fisicoquímicas y biológicas únicas y es por esto por lo que se vuelven interesantes para diferentes áreas tecnológicas y científicas. Sus aplicaciones son muy diversas e incluyen campos como la producción de energía, cosmetología, electrónica, agricultura, ingeniería de tejidos, desarrollo y ciencia de materiales, biomedicina, etc. (Khan *et al.*, 2019).

Las NPs se dividen en dos principales grupos (Fig. 2): 1) NPs orgánicas y 2) NPs inorgánicas. Las primeras están constituidas principalmente por carbono (C), moléculas orgánicas y biopolímeros de entre las que destacan por ejemplo el grafeno, el fullereno, los nanotubos de carbono, las NPs lipídicas, las NPs tipo virus (VLPs por sus siglas en inglés), NPs de quitosano, NPs de

algintato, NPs de gelatina etc. Mientras que, las NPs inorgánicas, corresponden a todas las formadas por metales nobles (Au, Ag, Cu, Pd, Pt, etc.), óxidos metálicos, sulfuros, oxisulfuros, etc.

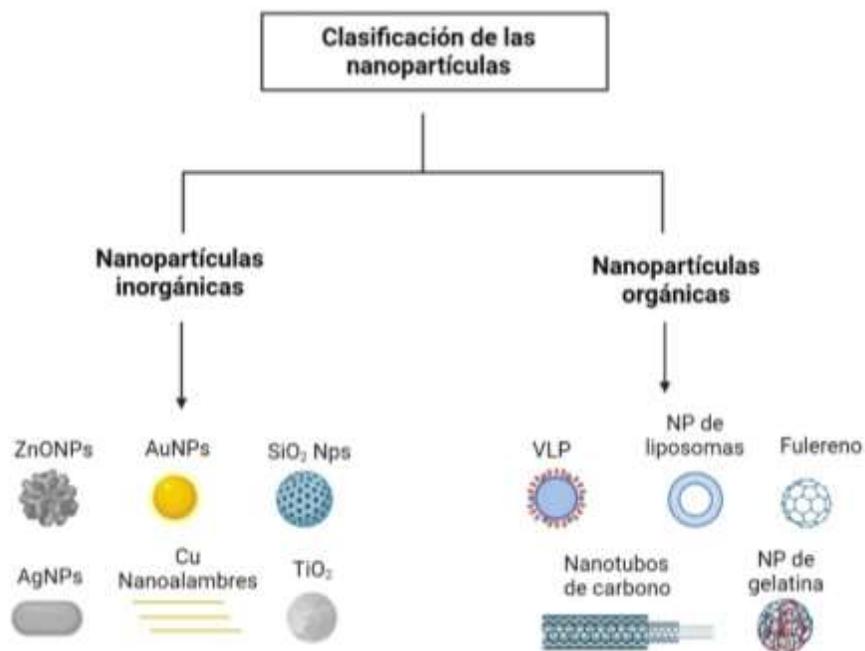


Figura 2. Clasificación general de las nanopartículas dependiendo de su composición elemental.

En el área biomédica, se han utilizado una gran cantidad de NPs como bioacarreadores para moléculas de interés. Las formuladas a base de biopolímeros han ido ganando terreno y esto se debe principalmente a su alta biocompatibilidad, nula toxicidad, gran área superficial y alta capacidad para poder transportar y liberar sustancias de interés biológico.

1.2.1 Biopolímero de gelatina

La gelatina es un producto natural ampliamente utilizado en la producción de alimentos, bebidas, cosméticos y formulación de fármacos. Consiste en un biopolímero derivado principalmente de la hidrólisis del colágeno. Su estructura química consiste en una mezcla heterogénea de polipéptidos monocatenarios o multicatenarios, cada uno con conformaciones de hélice de prolina levógiros extendidas y que contienen entre 300 y 4000 aminoácidos. Los aminoácidos que más destacan en su cadena principal son la glicina, prolina y alanina (Patel *et al.*, 2008).

Comercialmente, dependiendo su origen, puede clasificarse en dos tipos: 1) gelatina tipo A y 2) gelatina tipo B. El tipo A se obtiene del colágeno de la piel porcina, mientras que, la Tipo B, se obtiene de huesos y piel bovina (Ninal *et al.*, 2010). Su estructura química primaria se presenta en la Fig. 3 donde puede observarse el sitio y repeticiones de cada aminoácido en la cadena principal.

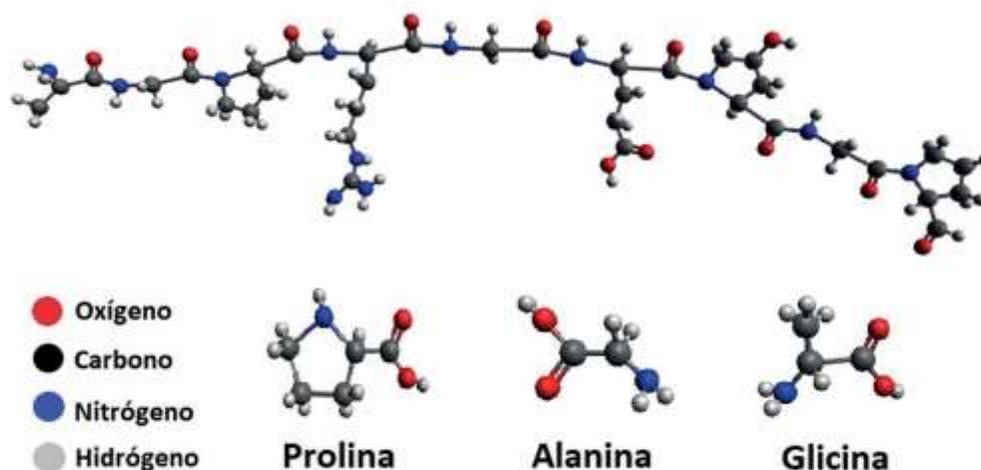


Figura 3. Estructura química primaria de los biopolímeros a base de gelatina. Su cadena está compuesta principalmente de diferentes aminoácidos como la prolina, alanina y glicina.

La gelatina tipo A es un polímero natural con grandes propiedades coloidales. Su amplio uso en la producción de fármacos y alimentos deriva de su nula toxicidad, alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. Ha sido ampliamente usada para el consumo humano y se ha demostrado que no genera subproductos dañinos; su principal ruta de eliminación es a través de la degradación enzimática (Wang *et al.*, 2012).

1.3 Sistemas nanoestructurados

Un sistema nanoestructurado puede definirse como un material de tamaño nanométrico que contenga algún arreglo estructural ya sea internamente o en su superficie, o bien, que contenga la combinación de dos o más nanomateriales (Rafique *et al.*, 2020). Estas nanoestructuras pueden ser poros, nano-objetos tales como nanopartículas, nanofibras, nanoalambres, etc.

Estos sistemas se dividen en 4 principales grupos: 1) Polvos nanoestructurados, 2) Nanocompuestos, 3) Materiales nanoporosos y 4) Nanoespumas.

En relación con los polvos nanoestructurados, como su nombre lo dice, son materiales en polvo con partículas individuales que tienen tamaños inferiores a 100 nanómetros. Algunos ejemplos son los polvos de óxidos metálicos, sulfuros, oxisulfuros, etc (Razali y Ismail, 2021). Los nanocompuestos son sólidos que involucran una mezcla de dos o más materiales separados en fases y al menos una de estas fases es de dimensión nanométrica. Algunos ejemplos pueden ser nanopartículas, nanobarras, nanofibras o nanotubos incrustados o encapsulados en un material que sirve como soporte y que puede ser cerámico, metálico o polimérico. Aquí, el material usado como soporte es considerado como una fase continua que rodea a los nano-objetos y comúnmente es denominado “matriz” (Vidu *et al.*, 2014).

Por otra parte, los materiales nanoporosos son materiales sólidos con cavidades con al menos una dimensión en la nanoescala. Algunos ejemplos pueden ser el carbón activado o las zeolitas. Las cavidades de los materiales nanoporosos pueden contener gases o líquidos. Dependiendo del tamaño del poro los podemos clasificar en: 1) materiales microporosos, cuando los poros son menores de 2 nanómetros; 2) materiales mesoporosos, si miden entre 2 a 50 nanómetros; y 3) materiales macroporosos, si miden más de 50 nanómetros (Kim *et al.*, 2011).

En relación con las nanoespumas, estas se componen de una matriz que puede ser líquida o sólida y otra fase que es gaseosa. Para que estos materiales sean considerados nanoespumas, puede ser que la matriz tenga columnas y paredes de tamaño dentro de la nanoescala, o bien, que la fase gaseosa contenga burbujas de tamaño nanométrico.

1.3.1 Bioacarreadores para el transporte y liberación de biomoléculas y toxinas

En los últimos años, la nanotecnología ha desarrollado distintos materiales con alta capacidad de almacenar, transportar y liberar de manera controlada moléculas y fármacos. Varios de ellos se han utilizado en el campo de la biomedicina, cuyo principal objetivo ha sido el transportar fármacos o biomoléculas a un tejido, órgano o grupo de células en específico, además de

modular la liberación de manera gradual para controlar los procesos fisiológicos y/o patológicos de alguna enfermedad. Estos nanosistemas son herramientas prometedoras para la administración eficiente y selectiva de fármacos terapéuticos a los sitios de infección objetivo.

Algunos sistemas a base de liposomas, nano- y micro- partículas poliméricas, nano- y micro-partículas metálicas, geles y ciclodextrinas, han sido utilizados para transportar una gran cantidad de moléculas, fármacos y toxinas. Un esquema representativo de estos sistemas se muestra en la Fig. 4. El principal objetivo de anclar o encapsular toxinas en una partícula de este tipo es la de incrementar la eficiencia en su transporte, mejorar la actividad farmacológica y reducir los efectos secundarios. Los bioacarreadores también ayudan a abordar los problemas asociados con la estabilidad fisicoquímica de las toxinas, como la solubilidad, la agregación, la baja biodisponibilidad, la mala biodistribución y la falta de selectividad (García-Silva et al., 2022). Así mismo, el diseño de un buen bioacarreador, abre la posibilidad de utilizar diversas vías de administración que incluyen la vía oral, nasal y parenteral, para con esto incrementar la posibilidad de utilizar estas formulaciones en diferentes condiciones ambientales, sin la necesidad de personal capacitado y en regiones de difícil acceso.

Un bioacarreador ideal debe ser capaz de entregar el compuesto activo en un destino específico, que pueden ser células, tejidos u órganos con niveles terapéuticos. Para fines de administración, los bioacarreadores deben tener características para controlar la liberación, que puede basarse en la difusión, degradación, hinchazón o interacciones específicas entre el compuesto activo y los materiales estructurales del bioacarreador (Harting et al., 2019). Con fines de direccionamiento, la superficie del bioacarreador puede ser funcionalizada con ligandos que tienen afinidad específica por las moléculas ubicadas en el sitio objetivo (Singh y Lillard, 2009). Con fines de activación, los bioacarreadores se puede funcionalizar aún más para responder a un estímulo particular, que inicia o favorece la liberación del fármaco. En este sentido, se siguen varios enfoques para la activación, como el uso de ultrasonido (Boissenot et al., 2016), radiación de infrarrojo cercano (Cho et al., 2015) y fuerza mecánica (Zhang et al., 2016). Los materiales utilizados para producir un bioacarreador también pueden ser sensibles a

cambios en el pH, la presencia de enzimas o cambios en el campo magnético (Tietze et al., 2015).

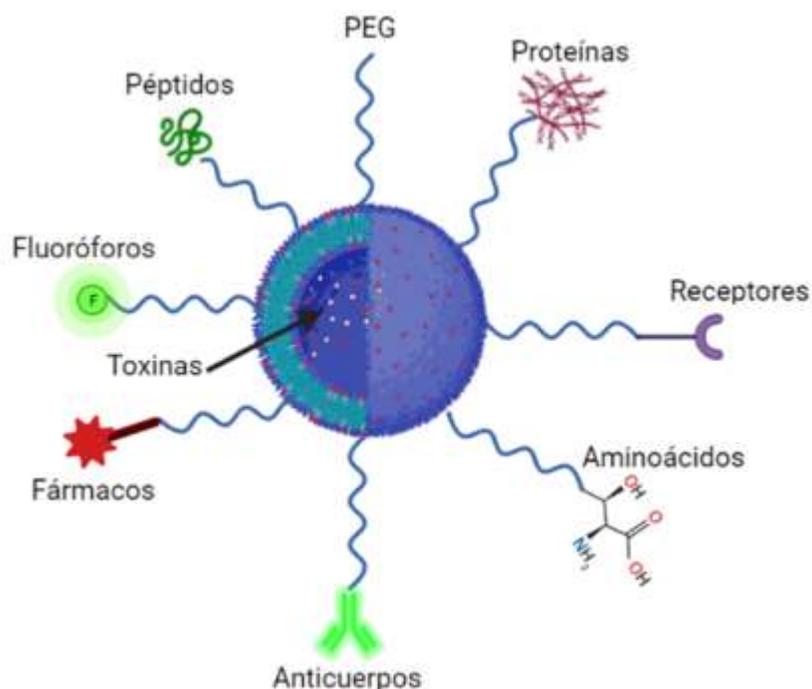


Figura 4. Representación de un sistema de liberación de fármacos, toxinas y biomoléculas.

1.4 Acoplamiento molecular (docking)

El presente trabajo llevó a cabo predicciones de la unión *in silico* del novedoso sistema nanoestructurado entre nanopartículas de GeINP y las TP. Una herramienta computacional muy útil para evaluar el acoplamiento y evaluar la afinidad de diversas moléculas *in silico* es el acoplamiento molecular (docking), técnica de gran utilidad para predecir la estructura de los complejos intermoleculares que se establecen entre dos o más moléculas. Es un método bioinformático que permite predecir y calcular computacionalmente la posición más favorable de interacción entre un ligando (TP) y un blanco (GeINP) a partir de sus representaciones tridimensionales. Mientras más estable, específica y favorable sea la unión entre un ligando y su blanco, mayor será su actividad biológica (Ballón-Paucara y Grados-Torrez, 2019). El objetivo principal de esta herramienta es predecir energías y modos de enlace, que suele hacerse previamente a un estudio experimental (Zúñiga y Domínguez, 2002; Shoichet *et al.*, 2002).

El acoplamiento molecular comúnmente emplea dos algoritmos por separado. Un primer algoritmo de muestreo que predice todas las configuraciones o conformaciones estructurales (poses) que el ligando puede asumir dentro de un dominio o sitio activo en el blanco proteico, y un segundo algoritmo con una función de puntuación que predice las energías de unión entre el ligando y el receptor para cada una de las configuraciones establecidas por el primer algoritmo. En estudios donde se aplica el acoplamiento molecular, usualmente se considera la mejor pose aquella que reporta la menor energía de unión (Schulz–Gasch y Stahl, 2004; Wong, 2008). Luego, con base en la función de estos dos algoritmos, todas las configuraciones de unión del ligando y su receptor son clasificadas (o jerarquizadas) de acuerdo a sus energías de unión. Por tanto, las funciones de puntuación son capaces de filtrar compuestos a partir de grandes bases de datos en una búsqueda virtual, donde la configuración de un compuesto con el más alto puntaje debe corresponder a la configuración con una energía de unión más favorable (Phatak *et al.*, 2009).

El acoplamiento molecular no tiene una regla que se adapte a todos los casos. La mayoría de los programas empleados con esta finalidad, tienen diferentes métodos para tratar cada caso en particular. También, debe tomarse en cuenta que cada blanco es diferente y la capacidad de replicar los resultados experimentales y fisiológicos depende en gran medida del programa utilizado y del criterio del usuario (Ballón-Paucara y Grados-Torrez, 2019).

2. ANTECEDENTES

2.1 Toxinas paralizantes y nanoparticulas

El acoplamiento molecular es un método bioinformático que permite predecir y calcular computacionalmente la posición más favorable de interacción entre un ligando y un blanco (usualmente proteico) a partir de sus representaciones tridimensionales (Ballón-Paucara y Grados-Torrez, 2019). No hay trabajos que evalúen el acoplamiento molecular de las toxinas paralizantes provenientes de dinoflagelados tóxicos con algún tipo de nanopartícula. Podemos mencionar un estudio de acoplamiento molecular de las TP con un blanco molecular llevado a cabo por Durán-Riveroll *et al.*, (2016), donde acoplan *in silico* a las TP (ligandos) con un blanco molecular que es canal de sodio dependiente de voltaje (Nav_v1.4). Sometieron a las TP a una simulación de acoplamiento teórica basada en dos modelos tridimensionales alternativos de Nav1.4 para encontrar una relación entre las propiedades de unión y la toxicidad conocida en mamíferos de los análogos de TP. Demostraron que estas toxinas exhiben diferentes modos de unión con energías de unión libres similares y que estos modos de unión alternativos son igualmente probables. Ellos proponen que la unión principal que gobierna el reconocimiento de ligandos está mediada por interacciones electrostáticas.

Existe otra toxina paralizante que posee el mismo modo de acción que las TP de dinoflagelados tóxicos que es la tetrodotoxina (TTX), de la cual hay algunos estudios de acoplamiento con nanopartículas *in vitro*. Estos estudios se han derivado del interés clínico y científico en el desarrollo de anestésicos locales con duraciones prolongadas, propiedades anestésicas que comparten la TTX y las TP.

Liu *et al.*, (2018) argumentan que la eficacia de la tetrodotoxina (TTX), un anestésico local muy potente, está limitada por su escasa penetración a través de las barreras de las superficies axonales. Para solucionar este problema, encapsularon la TTX en nanopartículas de sílice huecas (TTX-HSN) y las inyectaron en el nervio ciático de ratas. El complejo TTX-HSN logró una mayor frecuencia de bloqueos exitosos, prolongó la duración del bloqueo y disminuyó la toxicidad en comparación con la TTX libre. En animales a los que se les inyectó HSN marcado con

fluorescencia, las imágenes de secciones congeladas de nervio demostraron que HSN podía penetrar en el nervio y que la capacidad de penetración de las nanopartículas de sílice dependía en gran medida del tamaño.

Zhao *et al.*, (2019), argumentan que los bloqueadores de los canales de sodio del sitio 1, como la TTX y las TP, son extremadamente potentes y pueden proporcionar bloqueos nerviosos muy prolongados, pero la duración está limitada por la toxicidad sistémica asociada. Ellos utilizaron un sistema nanoestructurado de la TTX con un polímero biocompatible y biodegradable, poli(triol dicarboxílico ácido)-co-poli(etilenglicol) (TDP), mediante hidrólisis de enlaces éster. In vivo, 1.0–80.0 µg de TTX liberados de estos polímeros produjeron un rango de duraciones de bloqueo nervioso, desde varias horas hasta 3 días, con una toxicidad sistémica o local mínima.

Ma *et al.*, (2020) prepararon vesículas extracelulares de tetrodotoxina (TTX-EV) y evaluaron su capacidad para retener anestesia local a largo plazo sin daño al sistema nervioso o sistémico. Encontraron que este complejo TTX-EVs tenía una mínima toxicidad muscular e inflamación, y que el complejo formado con la TTX puede prolongar el tiempo de bloqueo nervioso, y el vehículo de liberación sostenida no provoca neurotoxicidad o toxicidad sistémica.

2.2 Gelatina como nanoacarreador

La gelatina, es una macromolécula utilizada en la administración de vacunas y fármacos debido a su alta biocompatibilidad, antigenicidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y bajo costo. Se ha utilizado como vehículo de transporte en forma de nanopartículas cuya superficie, en algunos casos, ha sido modificada con ligandos específicos del sitio de interés. Por ejemplo, Balthasar *et al.* (2005), utilizaron ligandos catiónicos derivados de amina, PEG y grupos tiol para lograr la administración de fármacos de manera dirigida y sostenida en el sistema ocular. En comparación con otros sistemas coloidales, las nanopartículas de gelatina resultan ser más estables en fluidos biológicos, resistentes a cambios de pH y temperatura. Igualmente, (Uesugi *et al.*, 2005) modificaron la superficie de las nanopartículas de gelatina para transportar anticuerpos. Para esto, la superficie de las nanopartículas fue modificada con grupos tiol y el derivado de avidina NeutrAvidin™ que se une covalentemente a las nanopartículas a través de

un espaciador bifuncional. Los anticuerpos se unen al sistema mediante un fuerte complejo avidina-biotina en la superficie de las NPs de gelatina. De este modo, los anticuerpos anti-CD3 biotinilados específicos para el antígeno CD3 en las células linfocíticas se unen a las NPs de gelatina para que el fármaco específico se dirija a los linfocitos T.

Por otra parte, las NPs de gelatina también se han utilizado para transportar péptidos, por ejemplo, los péptidos Tat y Syn B que son péptidos de penetración celular, muestran selectividad por la barrera hematoencefálica (BBB) mediada por carga. En este caso, la modificación de nanopartículas de gelatina-siloxano (G SNP) con el péptido Tat o Syn B mejoran la eficiencia de los péptidos en el cruce de la BBB. La penetración de la membrana es impulsada principalmente por la interacción iónica entre las cargas catiónicas de estos péptidos y las cargas aniónicas de las cabezas de fosfolípidos en la biomembrana y posteriormente se internalizan en las células por endocitosis (Tian *et al.*, 2012). Cuando el plásmido que codifica el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) se encapsula en Tat G SNP, se ha logrado ver una sobreexpresión de CGRP 1.71 y 6.92 veces mayor en las células endoteliales que los G SNP no modificados y el pLXSNCGRP desnudo (Tian *et al.*, 2013).

Las Nanopartículas de gelatina también se han utilizado para transportar fármacos anticancerígenos, por ejemplo, Lee *et al.* (2006), reportaron que las nanopartículas de gelatina pueden ser conjugadas con DOX después del bloqueo del grupo amino usando acetaldehído. En este sentido, las nanopartículas de gelatina-DOX mostraron resultados notables al inhibir el crecimiento tumoral y suprimir la metástasis pulmonar en comparación con la DOX pura. Así mismo, NPs de gelatina cargadas con paclitaxel también han sido utilizadas en la terapia contra el cáncer de vejiga intravesicular. Tanto la hidrofobicidad de la gelatina como la nanoencapsulación de paclitaxel en estado amorfo dentro de las NPs de gelatina pueden ser responsables de la solubilidad mejorada y la liberación rápida del fármaco (87 % en 2 h sin enzimas), lo cual es muy deseable en la terapia vesical intravesical en la que la formulación del fármaco normalmente se mantiene en la vejiga durante un período corto (es decir, 2 horas) (Mahapatro *et al.*, 2008).

Las NPs de gelatina también se han utilizado como un sistema de transporte eficiente para fármacos y proteínas. Li *et al.*, (1997) evaluó las NPs de gelatina para la administración de albúmina sérica bovina (BSA) como proteína modelo. Observó que las NPs son capaces de inducir una liberación sostenida y prevenir la desnaturalización de proteínas. Así mismo, se ha reportado que las NPs de gelatina son eficientemente captadas por parte de las células dendríticas (DC) de la médula ósea, por lo cual también se han realizado varios estudios para dirigir antígenos a las DC, ya que puede ser un adyuvante inmunitario adecuado (Coester *et al.*, 2006).

Las nanopartículas de gelatina están ganando terreno en la administración de fármacos y genes a través de todas las diversas vías de administración disponibles. Sin embargo, la preparación homogénea y menos dispersa de este tipo de nanopartículas sigue siendo una tarea desafiante debido a la variación de la calidad de la gelatina según su fuente y debido a su peso molecular variable (Hathout y Metwally, 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

Las toxinas paralizantes tienen un amplio potencial en la investigación farmacológica. Su alta toxicidad y rápida acción dificultan su manejo y control adecuado de dosis terapéuticas. Una alternativa a dicha problemática es el uso de biomateriales utilizados como vehículos de transporte para reducir su toxicidad, controlar su administración y dosificación. La gelatina es un biopolímero natural inerte, cuyas características fisicoquímicas lo hacen un potencial candidato como acarreador. En este sentido, conocer las interacciones fisicoquímicas entre la gelatina y la familia de las toxinas paralizantes a través de simulación por acoplamiento molecular, nos permitirá inferir en su estabilidad, mecanismos de interacción y la capacidad que tiene este biopolímero para anclar, transportar y liberar toxinas paralizantes.

4. HIPÓTESIS

La simulación por acoplamiento molecular entre la gelatina tipo A y la familia de las toxinas paralizantes, nos permitirá conocer la estabilidad y mecanismos de interacción física entre los grupos amino y carboxilo expuestos sobre la superficie del biopolímero, así como con la parte polar de las toxinas paralizantes. Este hecho nos ayudará a determinar la magnitud de la adsorción y la integridad química del compuesto gelatina-toxina paralizante.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Realizar predicciones *in silico* del acoplamiento molecular de un modelo de sistema nanoestructurado de la gelatina tipo A (GelNP, blanco) con una familia de análogos de toxinas paralizantes (TP, ligandos).

5.2 Objetivos particulares

- Modelar las estructuras químicas tridimensionales de la GelNP y las TP.
- Optimizar las estructuras químicas por el método de campo de fuerza universal (UFF, por su acrónimo en inglés).
- Predecir las conformaciones estructurales (poses) que el ligando puede asumir dentro del sitio activo del blanco.
- Predecir las energías de unión entre los ligandos y el blanco.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Modelado de moléculas

Las estructuras moleculares de las TP se modelaron a partir de lo reportado por Durán-Riveroll *et al.*, (2016), ver Tabla 1. Para lo anterior se utilizó Avogadro 1.2.0 (Hanwell *et al.*, 2012). Una vez obtenida la estructura en 3D el siguiente paso fue optimizar la estructura a través del método de campos de fuerza universal (UFF; Rappe *et al.*, 1996), utilizando el mismo software. La estructura tridimensional de la GelNP también se modeló y optimizó con el método antes mencionado considerando 5 monómeros solamente, ver Fig. 6, y la secuencia de aminoácidos que conforman un monómero de la gelatina fue obtenida de Devi *et al.* (2017).

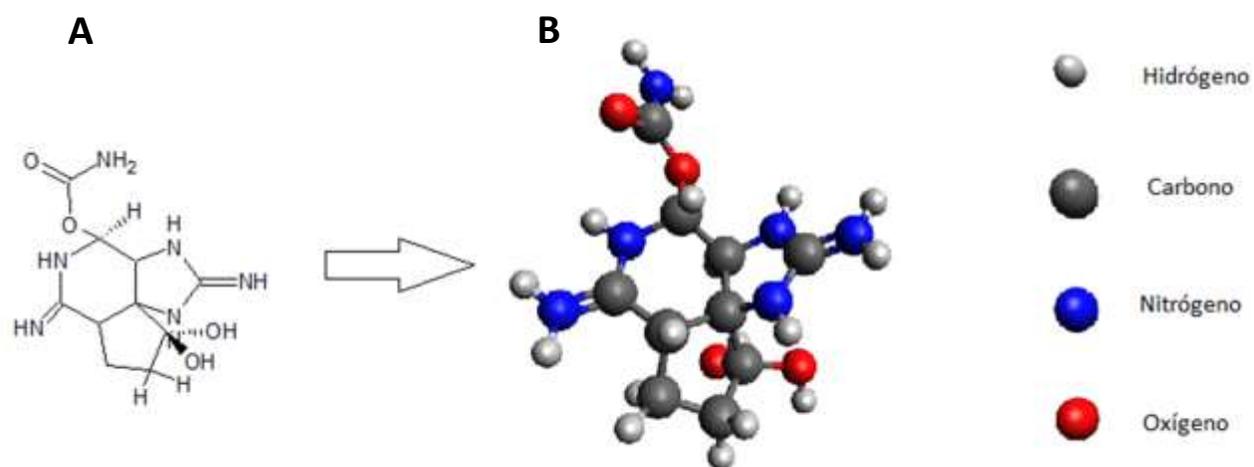


Figura 5. Fórmula química básica de las toxinas paralizantes. A) Estructura 2D de la saxitoxina. B) estructura optimizada en 3D con su nomenclatura de colores.

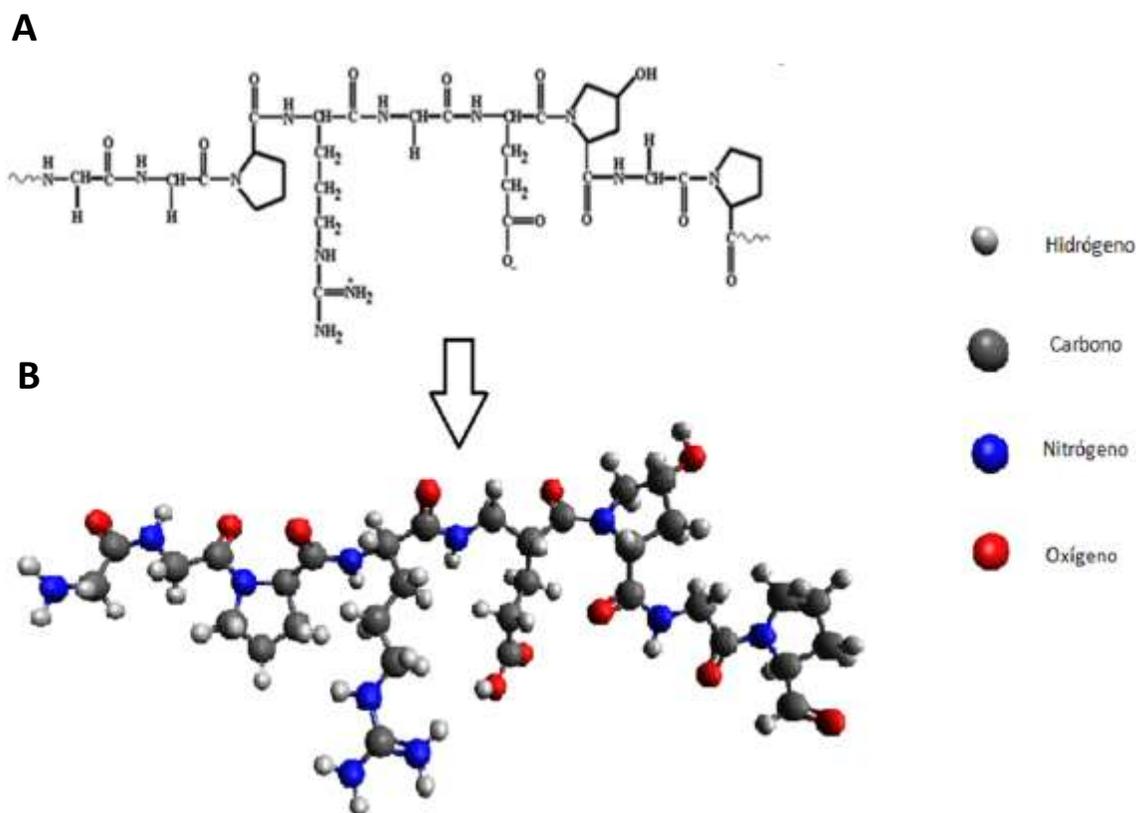


Figura 6. Fórmula química del monómero de la gelatina tipo A (GelNP). A) Estructura 2D de la GelNP. B) Estructura optimizada en 3D con su nomenclatura de colores.

6.2 Acoplamiento molecular *in silico* (docking)

Una vez que las estructuras fueron optimizadas, la carga electrostática total de cada modelo fue asignada de acuerdo con su fórmula química utilizando el *software* Chimera 1.5.3 (Pettersen *et al.*, 2004). El acoplamiento molecular *in silico* (*docking*) se realizó considerando estructuras rígidas (GelNP) y flexibles (TP). Se realizaron simulaciones de interacción individuales entre las TP y el polímero de la GelNP, bajo un principio de química computacional llamado mecánica molecular. El acoplamiento molecular se llevó a cabo con el *software* Molegro virtual docker 1.5.0.0 (Thomsen y Christensen, 2006). La zona de acoplamiento se delimitó al sitio mostrado en la Fig. 7. Para realizar el acoplamiento se estableció un radio de 29 Å de la esfera de acoplamiento.

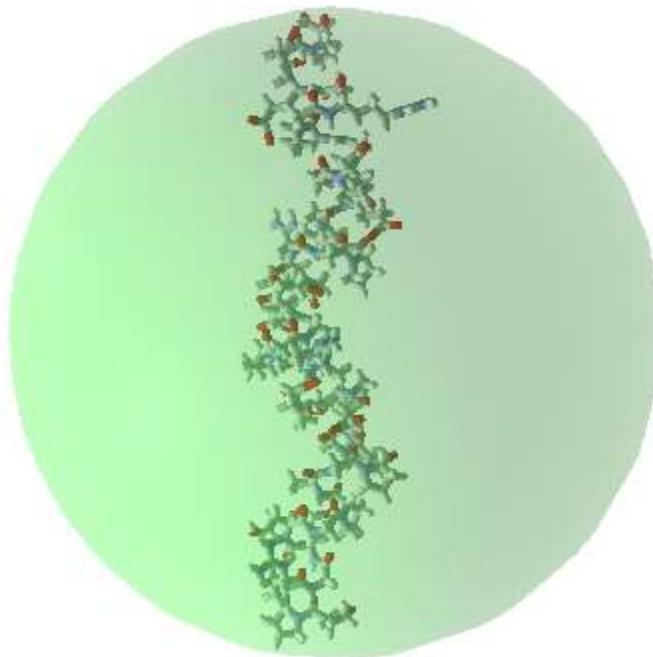


Figura 7. Zona de interacción del modelo de la GelNP.

En la simulación, las TP fueron consideradas como ligandos y la GelNP se consideró como la molécula diana, a la cual se unieron los ligandos. Se utilizaron 36 análogos de las TP (Tabla 1) para establecer las simulaciones con el polímero de la GelNP y se corrieron 5 configuraciones estructurales (poses) para cada análogo de las TP. Para reducir el error estadístico, cada simulación se corrió 10 veces por ligando, lo cual nos da un total de 1800 simulaciones de acoplamiento molecular de la GelNP con las TP. Se utilizaron cálculos de mecánica molecular para encontrar la energía de unión entre la diana y ligandos (la cual toma en cuenta las fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals).

De todas las simulaciones se eligieron 5 poses para cada análogo, con el software Molegro virtual docker el cual toma en cuenta las interacciones electrostáticas entre los ligandos y la diana, buscando el mejor lugar de acoplamiento dentro del sitio de búsqueda de unión. De esta simulación se obtuvieron 180 datos (Tabla 2). Para seleccionar la mejor pose se utilizó el criterio de la energía de unión del complejo por átomo del ligando (eficiencia del ligando o $LE1 = E_{total} / \#átomos \text{ pesados}$). El criterio considerado fue que, la mejor pose es aquella que reporta la energía más negativa de unión entre todas las poses evaluadas, obteniendo un total

de 36 resultados. Finalmente, bajo el mismo criterio de LE1 de estos 36 resultados se eligieron las 5 poses con una mayor afinidad hacia la GelNP, obteniendo así los 5 análogos de las TP que mostraron el mejor acoplamiento con el polímero de la GelNP.

7. RESULTADOS

La Tabla 2 muestra el acoplamiento molecular de los 36 análogos de las TP con 5 conformaciones estructurales en relación a la molécula de GeINP. En la Tabla 2 también se muestran los valores de la energía total, las fuerzas de Van Der Waals (VdW) y la eficiencia del ligando (LE1), que nos indican la energía electrostática que presenta la molécula, la energía que se requiere para romper el enlace entre el ligando y la diana, así como, la energía de unión entre la proteína y el ligando, respectivamente. Para seleccionar la mejor pose para cada ligando se utilizó el criterio de LE1 donde se consideró como mejor pose aquella que reporta la menor energía de unión entre todas las poses evaluadas, obteniendo un total de 36 resultados (Tabla 3). La Fig. 8 muestra de forma gráfica los valores de LE1 de las poses de los análogos de TP más afines a la GeINP. Posteriormente se realizó una selección de los 5 ligandos que mostraron mayor afinidad con la GeINP, y sus respectivas poses que se muestran en la Tabla 4.

La Fig. 9 representa la unión de las 5 TP más afines en los probables sitios de unión con el polímero de la GeINP. El polímero de la GeINP se conforma como un “resorte” con una parte interna y una externa. Se observó que las 5 TP tienden a unirse a la parte interna de la GeINP (Fig. 10).

Las Figs. 11 y 12 muestran la interacción de la [01]STX con la GeINP. La Fig. 11 muestra que la [01]STX se une con interacciones de enlace de hidrógeno a los aminoácidos Pro34 (prolina), Arg31 (arginina), Glu42 (Ácido glutámico). En la Fig. 12 podemos observar que la Glu42 interacciona con los grupos amino y el nitrógeno de las posiciones 2 y 3 de la molécula de TP (Tabla 1). Se observa que la Arg31 interactúa con puentes de hidrógeno en el grupo hidroxilo (OH, posición 12), con el nitrógeno en la posición 9 y con el grupo amino (NH₂) ubicado en la posición 8. La Pro34 interactúa por medio de un puente de hidrógeno con el grupo amino externo ubicado en la posición 8, y la Glu42 interacciona con la TP por medio de dos interacciones de enlace de hidrógeno en las posiciones 1 y 2.

Las Figs. 13 y 14 muestran la interacción de la [00]GTX2 con la GeINP. La Fig. 13 muestra que la [00]GTX2 interactúa con los residuos de aminoácidos Pro7 (prolina), Arg4 (arginina), Glu15

(ácido glutámico) Ala10 (alanina). En la Fig. 14 se observa que La Pro7 forma un puente de hidrógeno con el grupo amino expuesto en el sitio 8 (Tabla 1), a su vez tiene una interacción electrostática de repulsión con un oxígeno expuestos del OSO_3 ubicado en la posición 11. La Arg4 interacciona con fuerzas electrostáticas de atracción con los tres oxígenos del grupo OSO_3 . El Glu15, tiene una interacción de atracción electrostática con el carbono 2 y con el grupo amina expuesto ligado al mismo carbono. La Ala10 interactúa por medio de fuerzas electrostáticas de atracción con los carbonos 6 y 8.

Las Figs. 15 y 16 muestran la interacción de la [00]dcSTX con la GelNP. La Fig. 15 muestra que la [00]dcSTX interactúa con los residuos de aminoácidos Pro 16 (prolina), Ala19 (alanina), Gly23 (glicina), y Glu24 (ácido glutámico). En la Fig. 16 se observa que la Pro16 forma un puente de hidrógeno con el carboxilo ubicado en la posición 11 (Tabla 1). La Ala19 y la Gly23 forman dos puentes de hidrógeno con el nitrógeno ubicado en la posición 9 y con el grupo amino expuesto en la posición 8. El Glu24 forma un puente de hidrógeno con el grupo amino expuesto ubicado en la posición 2.

Las Figs. 17 y 18 muestran la interacción entre la [00]GC6a con la GelNP. La Fig. 17 muestra como la [00]GC6a interactúa con la Pro16 (prolina), Ala19 (alanina), Pro25 (prolina), Pro18 (prolina). En la Fig. 18 se observa que la Pro16 interactúa con un grupo funcional hidroxilo expuesto en la posición 1 (Tabla 1) por medio de fuerzas de atracción electrostática. La Ala19 interactúa con un grupo funcional hidroxilo expuesto en la posición 12 por medio de fuerzas de atracción electrostática. La Pro25 interactúa con fuerzas de atracción electrostática con un hidroxilo expuesto en la posición 1 del anillo bencénico del grupo funcional di-hidroxibenzoilo. La Pro18 interactúa con fuerzas de atracción electrostática con un hidroxilo expuesto en la posición 3 del anillo bencénico del grupo funcional di-hidroxibenzoilo.

Las Figs. 19 y 20 muestran la interacción de la [00]dcGTX2 con la GelNP. La Fig. 19 muestra que la [00]dcGTX2 interactúa con la Arg31 (arginina) y la Pro34 (prolina). En la Fig. 20 se observa que la Arg31 forma un puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo funcional OSO_3 unido al carbono ubicado en la posición 11 (Tabla 1). La Pro34 forma dos puentes de hidrogeno, uno con

un hidroxilo externo del grupo funcional OSO_3 y otro con un hidroxilo expuesto en la posición 12.

Tabla 2. Resultados del acoplamiento molecular entre la gelatina tipo A (GelNP) y 36 toxinas paralizantes (TP) con 5 conformaciones estructurales (poses) cada una. La tabla muestra valores de energía total de la molécula, interacciones por fuerzas de Van der Waals (VdW), y eficiencia de ligando (LE1) con valores en kcal/mol.

Nombre	Energía total	VdW	LE1 (kcal/mol)
[00]GTX1	-83.1	-8.0	-3.1
[01]GTX1	-77.2	-10.2	-3.0
[02]GTX1	-72.7	-13.8	-2.6
[03]GTX1	-68.8	-8.4	-2.6
[04]GTX1	-68.2	-7.6	-2.7
[00]GTX2	-88.5	-18.3	-3.4
[01]GTX2	-83.4	-10.8	-3.3
[02]GTX2	-79.6	-15.7	-3.1
[03]GTX2	-82.0	-7.6	-3.2
[04]GTX2	-77.8	-9.5	-3.0
[00]GTX3	-67.2	-0.3	-2.7
[01]GTX3	-71.2	-5.8	-2.7
[02]GTX3	-65.6	-7.1	-2.7
[03]GTX3	-64.5	-15.2	-2.6
[04]GTX3	-69.3	-14.5	-2.8
[00]GTX4	-66.3	20.9	-2.5
[01]GTX4	-58.0	-12.0	-2.2
[02]GTX4	-53.6	18.9	-2.3
[03]GTX4	-57.0	-14.1	-2.2
[04]GTX4	-58.1	-14.4	-2.3
[00]NEO	-68.4	-15.0	-3.2
[01]NEO	-66.9	-12.4	-3.2
[02]NEO	-63.6	-12.6	-3.0
[03]NEO	-61.5	-7.2	-2.9
[04]NEO	-64.5	-8.8	-3.1
[00]STX	-72.4	-11.8	-3.6
[01]STX	-74.0	-15.5	-3.7
[02]STX	-66.4	13.6	-3.4
[03]STX	-70.0	-10.9	-3.5
[04]STX	-62.4	-11.4	-3.2
[00]dcGTX1	-67.9	-15.2	-3.0
[01]dcGTX1	-70.6	-8.5	-2.9
[02]dcGTX1	-59.9	-6.4	-2.6
[03]dcGTX1	-61.8	-7.9	-2.7

[04]dcGTX1	-65.4	-12.2	-2.7
[00]dcGTX2	-72.4	-11.6	-3.3
[01]dcGTX2	-68.2	-9.8	-3.2
[02]dcGTX2	-57.9	-10.8	-2.6
[03]dcGTX2	-64.8	-10.3	-2.9
[04]dcGTX2	-58.4	-10.8	-2.7
[00]dcGTX3	-68.9	-14.7	-3.2
[01]dcGTX3	-61.6	-13.9	-2.8
[02]dcGTX3	-59.0	-10.9	-2.7
[03]dcGTX3	-51.1	-7.3	-2.4
[04]dcGTX3	-56.7	-9.7	-2.7
[00]dcGTX4	-68.2	-15.5	-3.0
[01]dcGTX4	-58.9	-12.0	-2.5
[02]dcGTX4	-47.9	-10.0	-2.4
[03]dcGTX4	-55.2	-14.1	-2.5
[04]dcGTX4	-57.6	-12.4	-2.5
[00]dcNEO	-59.5	-13.9	-3.3
[01]dcNEO	-53.3	-11.3	-2.8
[02]dcNEO	-45.8	-10.4	-2.6
[03]dcNEO	-48.3	-3.2	-2.6
[04]dcNEO	-44.8	31.6	-2.5
[00]dcSTX	-58.5	-13.0	-3.4
[01]dcSTX	-49.7	-10.9	-3.1
[02]dcSTX	-51.4	-10.4	-3.0
[03]dcSTX	-51.5	-9.0	-3.1
[04]dcSTX	-50.8	-8.5	-3.0
[00]GC1a	-91.7	1.1	-2.7
[01]GC1a	-88.3	-5.0	-2.7
[02]GC1a	-80.6	-7.2	-2.6
[03]GC1a	-87.5	-16.4	-2.6
[04]GC1a	-77.7	-2.1	-2.4
[00]GC2a	-87.3	-14.9	-2.8
[01]GC2a	-82.9	-2.1	-2.6
[02]GC2a	-86.1	-11.2	-2.7
[03]GC2a	-82.7	-14.0	-2.5
[04]GC2a	-76.8	17.2	-2.4
[00]GC3a	-88.9	-10.2	-2.7
[01]GC3a	-84.4	1.4	-2.6
[02]GC3a	-88.6	-17.0	-2.6
[03]GC3a	-83.4	-7.2	-2.4
[04]GC3a	-76.3	-11.8	-2.5
[00]GC4a	-90.7	23.3	-2.7
[01]GC4a	-84.6	-3.5	-2.5
[02]GC4a	-87.0	-13.4	-2.7

[03]GC4a	-85.5	-10.6	-2.7
[04]GC4a	-83.3	4.6	-2.5
[00]GC5a	-92.8	-12.3	-2.7
[01]GC5a	-76.1	28.8	-2.6
[02]GC5a	-87.1	11.3	-2.6
[03]GC5a	-76.9	4.4	-2.3
[04]GC5a	-83.1	-5.0	-2.5
[00]GC6a	-91.8	-16.4	-3.3
[01]GC6a	-86.6	-16.6	-3.1
[02]GC6a	-85.6	-10.2	-3.1
[03]GC6a	-80.9	14.0	-2.9
[04]GC6a	-83.1	-10.2	-2.9
[00]B1	-72.4	-10.5	-3.1
[01]B1	-76.0	22.1	-3.1
[02]B1	-78.2	-6.4	-3.1
[03]B1	-73.0	9.8	-3.0
[04]B1	-78.1	-12.5	-3.0
[00]B2	-67.4	40.0	-2.6
[01]B2	-70.5	-11.5	-2.7
[02]B2	-64.4	3.0	-2.4
[03]B2	-68.9	-9.1	-2.5
[04]B2	-70.0	-13.8	-2.7
[00]C1	-79.4	-18.0	-2.7
[01]C1	-76.2	-9.4	-2.6
[02]C1	-78.8	-15.8	-2.6
[03]C1	-73.1	-13.0	-2.5
[04]C1	-68.5	-14.0	-2.4
[00]C2	-79.2	16.7	-2.7
[01]C2	-79.9	-13.5	-2.6
[02]C2	-73.6	-9.3	-2.6
[03]C2	-71.9	-13.9	-2.4
[04]C2	-74.6	-11.2	-2.5
[00]C3	-72.3	37.6	-2.5
[01]C3	-76.7	-4.6	-2.5
[02]C3	-73.8	12.5	-2.5
[03]C3	-63.7	30.0	-2.2
[04]C3	-69.6	-18.4	-2.3
[00]C4	-77.3	-15.2	-2.5
[01]C4	-76.5	22.0	-2.5
[02]C4	-71.0	-8.9	-2.2
[03]C4	-66.3	-8.1	-2.1
[04]C4	-65.4	-10.8	-2.2
[00]GC1	-83.5	-10.0	-2.7
[01]GC1	-82.9	-16.9	-2.5

[02]GC1	-84.9	-17.2	-2.7
[03]GC1	-86.2	1.0	-2.6
[04]GC1	-84.8	-14.9	-2.7
[00]GC2	-83.3	16.8	-2.8
[01]GC2	-81.1	-9.8	-2.6
[02]GC2	-73.8	13.5	-2.4
[03]GC2	-78.7	-9.4	-2.6
[04]GC2	-83.4	-8.8	-2.7
[00]GC3	-89.5	-17.9	-2.8
[01]GC3	-83.3	-0.3	-2.6
[02]GC3	-79.7	22.3	-2.5
[03]GC3	-83.2	-1.5	-2.6
[04]GC3	-77.0	0.1	-2.6
[00]GC4	-89.2	18.3	-2.7
[01]GC4	-87.0	-4.2	-2.5
[02]GC4	-84.5	-12.0	-2.5
[03]GC4	-75.7	-6.6	-2.4
[04]GC4	-86.8	-14.1	-2.6
[00]GC5	-90.7	-15.1	-2.8
[01]GC5	-86.4	-17.9	-2.7
[02]GC5	-82.3	26.9	-2.6
[03]GC5	-78.3	-9.0	-2.4
[04]GC5	-88.5	-18.1	-2.7
[00]GC6	-81.0	-7.1	-3.0
[01]GC6	-81.5	-6.2	-3.0
[02]GC6	-78.8	0.9	-3.0
[03]GC6	-77.6	-9.9	-2.9
[04]GC6	-79.8	-15.7	-2.9
[00]GC1b	-94.2	-18.5	-2.8
[01]GC1b	-92.5	-10.0	-2.6
[02]GC1b	-90.7	-11.9	-2.5
[03]GC1b	-82.6	-7.1	-2.4
[04]GC1b	-80.6	-9.3	-2.3
[00]GC2b	-95.0	-10.5	-2.8
[01]GC2b	-88.2	-14.1	-2.5
[02]GC2b	-85.3	5.7	-2.5
[03]GC2b	-87.5	-8.1	-2.5
[04]GC2b	-87.2	16.2	-2.5
[00]GC3b	-94.1	-18.5	-3.1
[01]GC3b	-81.1	-2.5	-2.8
[02]GC3b	-84.9	-10.8	-3.0
[03]GC3b	-84.8	-17.7	-2.9
[04]GC3b	-85.8	-10.5	-2.9
[00]GC4b	-101.5	-14.9	-2.7

[01]GC4b	-89.3	-5.1	-2.5
[02]GC4b	-91.2	-6.1	-2.6
[03]GC4b	-94.4	0.2	-2.6
[04]GC4b	-89.3	-5.3	-2.5
[00]GC5b	-96.4	-5.6	-2.6
[01]GC5b	-83.7	2.8	-2.4
[02]GC5b	-91.7	-9.7	-2.5
[03]GC5b	-85.6	-11.5	-2.4
[04]GC5b	-92.0	-19.4	-2.5
[00]GC6b	-79.9	-10.7	-2.7
[01]GC6b	-81.2	-15.2	-2.6
[02]GC6b	-86.9	-3.3	-2.7
[03]GC6b	-82.9	28.7	-2.7
[04]GC6b	-75.2	4.9	-2.5

Tabla 3. Se muestran las 36 poses de las toxinas paralizantes (TP), seleccionadas por su afinidad, con la gelatina tipo A (GelNP). La tabla muestra valores de energía total de la molécula, interacciones por fuerzas de Van der Waals (VdW), y eficiencia de ligando (LE1) con valores en kcal/mol.

Pose	Energía total	VdW	LE1
[00]GTX1	-83.1	-8.0	-3.1
[00]GTX2	-88.5	-18.3	-3.4
[04]GTX3	-69.3	-14.5	-2.8
[00]GTX4	-66.3	20.9	-2.5
[00]NEO	-68.4	-15.0	-3.2
[01]STX	-74.0	-15.5	-3.7
[00]dcGTX1	-67.9	-15.2	-3.0
[00]dcGTX2	-72.4	-11.6	-3.3
[00]dcGTX3	-68.9	-14.7	-3.2
[00]dcGTX4	-68.2	-15.5	-3.0
[00]dcNEO	-59.5	-13.9	-3.3
[00]dcSTX	-58.5	-13.0	-3.4
[00]GC1a	-91.7	1.1	-2.7
[00]GC2a	-87.3	-14.9	-2.8
[00]GC3a	-88.9	-10.2	-2.7
[00]GC4a	-90.7	23.3	-2.7
[00]GC5a	-92.8	-12.3	-2.7
[00]GC6a	-91.8	-16.4	-3.3
[00]B1	-72.4	-10.5	-3.1
[01]B2	-70.5	-11.5	-2.7
[00]C1	-79.4	-18.0	-2.7
[00]C2	-79.2	16.7	-2.7
[00]C3	-72.3	37.6	-2.5

[00]C4	-77.3	-15.2	-2.5
[00]GC1	-83.5	-10.0	-2.7
[00]GC2	-83.3	16.8	-2.8
[00]GC3	-89.5	-17.9	-2.8
[00]GC4	-89.2	18.3	-2.7
[00]GC5	-90.7	-15.1	-2.8
[00]GC6	-81.0	-7.1	-3.0
[00]GC1b	-94.2	-18.5	-2.8
[00]GC2b	-95.0	-10.5	-2.8
[00]GC3b	-94.1	-18.5	-3.1
[00]GC4b	-101.5	-14.9	-2.7
[00]GC5b	-96.4	-5.6	-2.6
[00]GC6b	-79.9	-10.7	-2.7

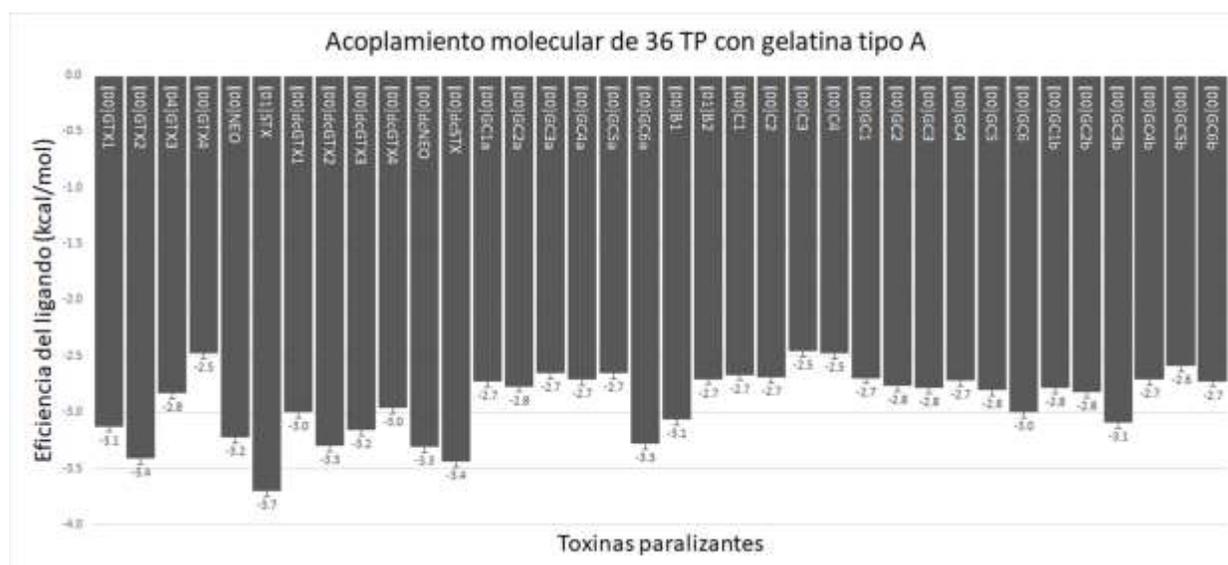


Figura 8. Gráfico de barras con las 36 toxinas paralizantes (TP) y sus valores de eficiencia del ligando en kcal/mol. Para seleccionar la mejor pose para cada ligando se utilizó el criterio de LE1 donde se consideró como mejor pose aquella que reporta la menor energía de unión entre todas las poses evaluadas, obteniendo un total de 36 resultados.

Tabla 4. Poses más afines a la gelatina tipo A (GelNP) seleccionadas de la Tabla 2. La tabla muestra valores de energía total de la molécula, interacciones por fuerzas de Van der Waals (VdW), y eficiencia de ligando (LE1) con valores en kcal/mol.

Nombre	Energía total	VdW	LE1
[01]STX	-74.0	-15.5	-3.7
[00]GTX2	-88.5	-18.3	-3.4
[00]dcSTX	-58.5	-13.0	-3.4
[00]GC6a	-91.8	-16.4	-3.3
[00]dcGTX2	-72.4	-11.6	-3.3

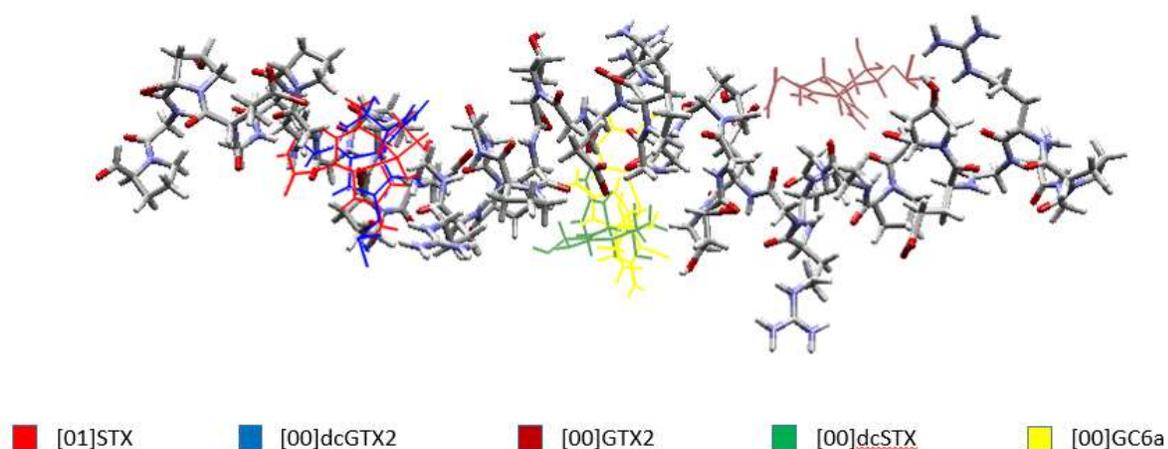


Figura 9. Interacción entre las toxinas paralizantes (TP) más afines y la gelatina tipo A (GelNP). Las toxinas se muestran de diferentes colores: rojo [01]STX, azul [00]dcGTX2, guinda [00]gtx2, verde [00]dcSTX, y en color amarillo [00]GC6a.

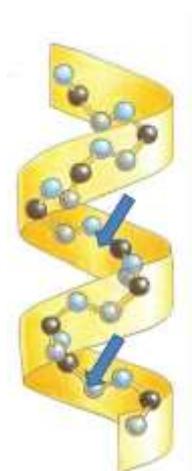


Figura 10. Estructura tipo “resorte” de la gelatina tipo A (GelNP). Las flechas señalan la parte interna del resorte donde se observó que las 5 toxinas paralizantes (TP) tienden a unirse a la parte interna de la GelNP.

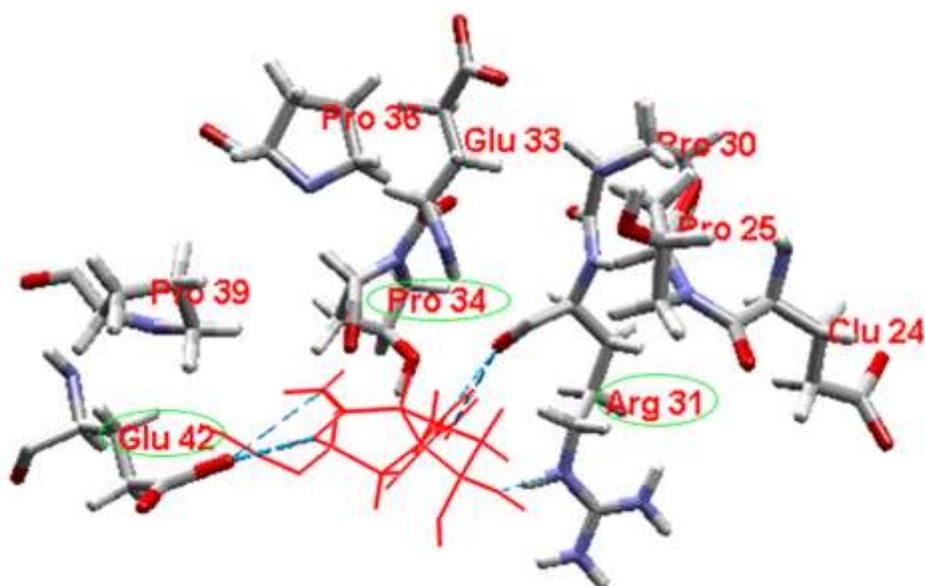


Figura 11. Representación de la interacción de la [01]STX con la gelatina tipo A. Los residuos marcados con un círculo verde son los residuos que interactúan con [01]STX, Arg (arginina), Pro (prolina), Glu (glutamina) El nitrógeno se representa con el color azul, el oxígeno en rojo, el carbono en gris y el hidrógeno en blanco. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas punteadas de color azul.

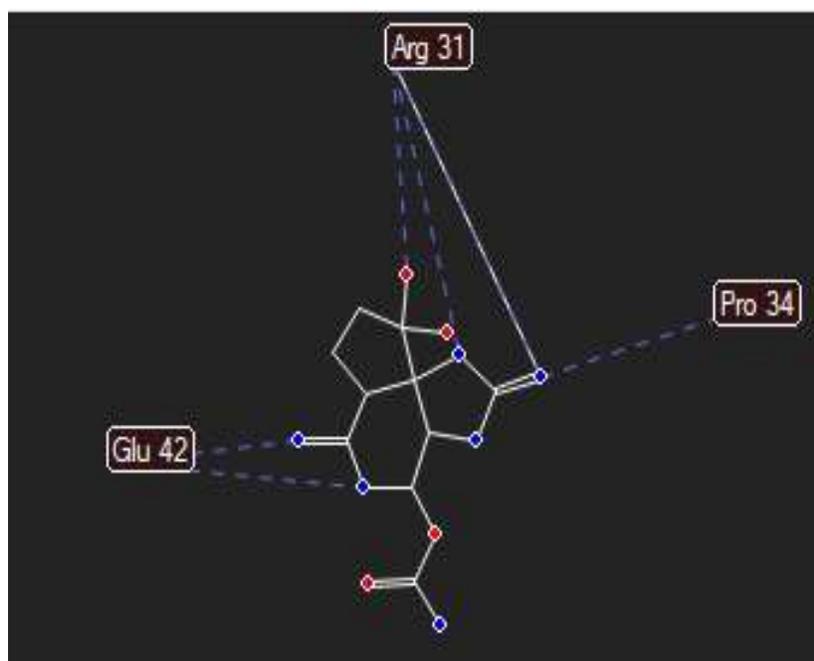


Figura 12. Interacciones de [01]STX con la gelatina tipo A. Arg (arginina), Pro (prolina), Glu (ácido glutámico), las líneas punteadas en azul son representaciones de puentes de hidrógeno, los puntos rojos son oxígeno, los azules son nitrógeno y las líneas blancas los enlaces.

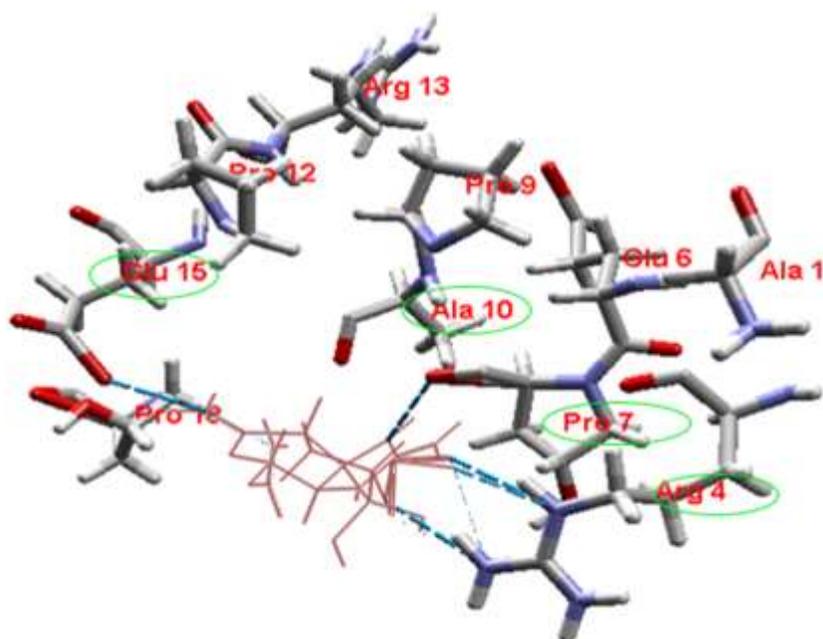


Figura 13. Representación de la interacción de la [00]GTX2 con la gelatina tipo A. los residuos marcados con un círculo verde son los residuos que interactúan con la [00]GTX2, Pro (prolina), Arg (arginina), Glu (ácido glutámico), Ala (alanina). El nitrógeno se representa con el color azul, el oxígeno en rojo, el carbono en gris y el hidrógeno en blanco. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas punteadas de color azul.

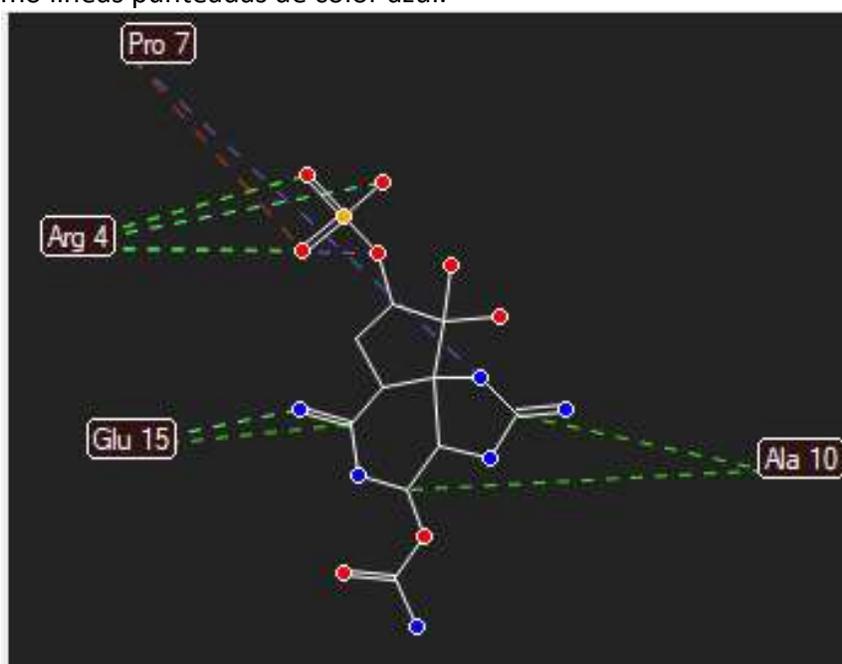


Figura 14. Interacciones de [00]GTX2 con la gelatina tipo A. Arg (arginina), Pro (prolina), Glu (ácido glutámico), Ala (alanina), los puntos rojos son oxígeno, los azules son nitrógeno, los amarillos fósforo y las líneas blancas representan los enlaces, las líneas punteadas en azul son representaciones de puentes de hidrógeno, las verdes nos indican una interacción electrostática de atracción y las rojas de repulsión.

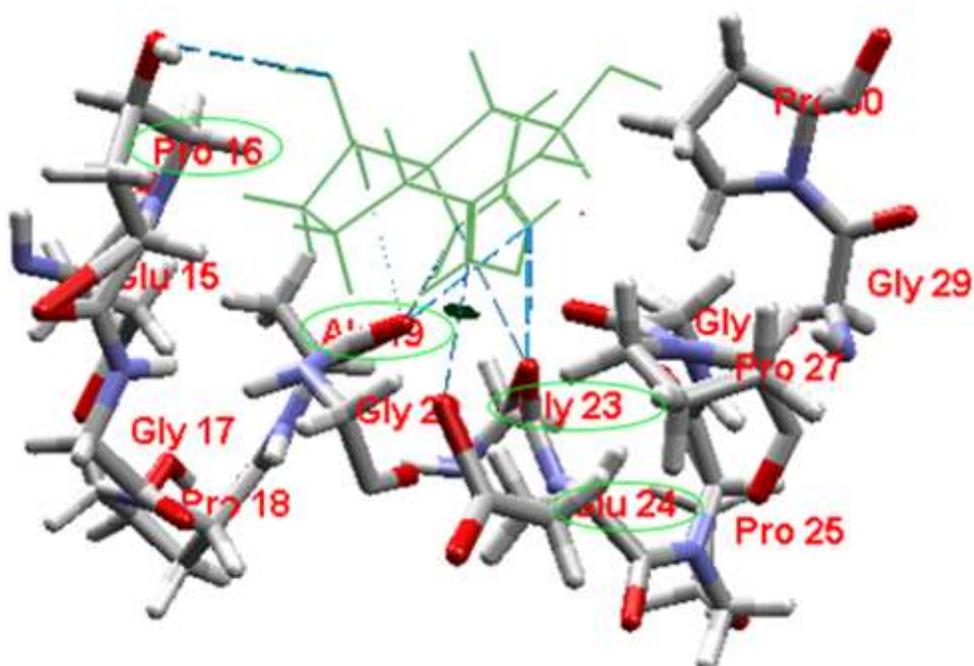


Figura 15. Representación de la interacción de la [00]dcSTX con la gelatina tipo A. los residuos marcados con un círculo verde son los residuos que interactúan con la [00] dcSTX, Pro (prolina), Arg (arginina), Glu (ácido glutámico) Ala (alanina), Gly (glicina). El nitrógeno se representa con el color azul, el oxígeno en rojo, el carbono en gris y el hidrógeno en blanco. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas punteadas de color azul.

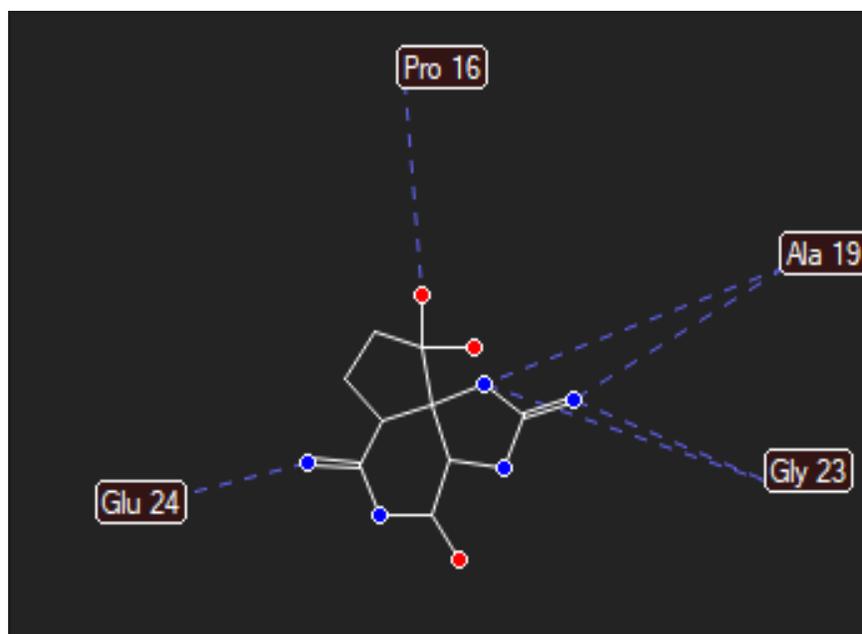


Figura 16. Interacciones de [00]dcSTX con la gelatina tipo A. Pro (prolina), Glu (ácido glutámico) Ala (alanina), Gly (glicina), los puntos rojos son oxígeno, los azules son nitrógeno y las líneas blancas representan los enlaces. Las líneas punteadas en azul son representaciones de puentes de hidrógeno.

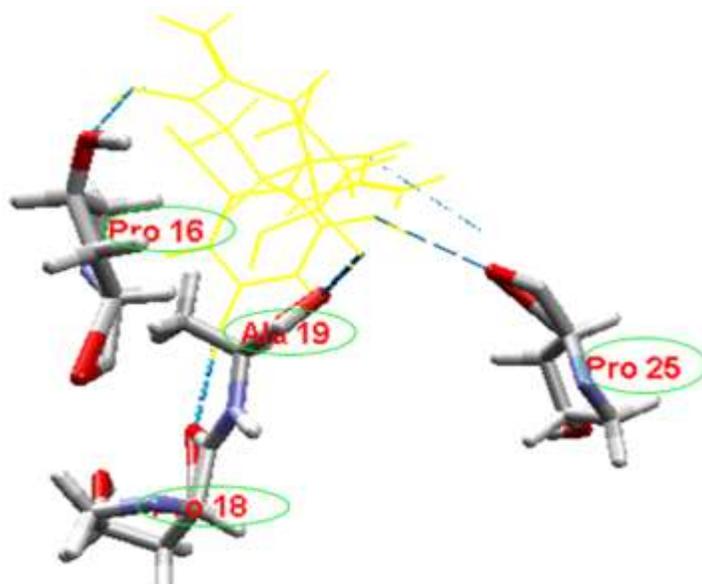


Figura 17. Representación de la interacción de la [00]GC6a con la gelatina tipo A. los residuos marcados con un círculo verde son los residuos que interactúan con la [00]GC6a, Pro (prolina), Ala (alanina). El nitrógeno se representa con el color azul, el oxígeno en rojo, el carbono en gris y el hidrógeno en blanco. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas punteadas de color azul.

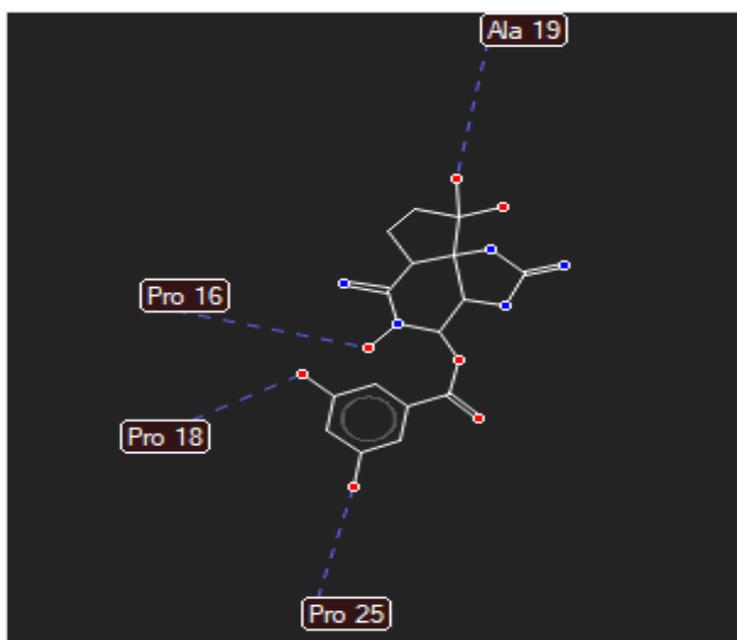


Figura 18. Interacciones de [00]GC6a con la gelatina tipo A. Pro (prolina), Ala (alanina), los puntos rojos son oxígeno, los azules son nitrógeno y las líneas blancas representan los enlaces, las líneas punteadas en azul son representaciones de puentes de hidrógeno.

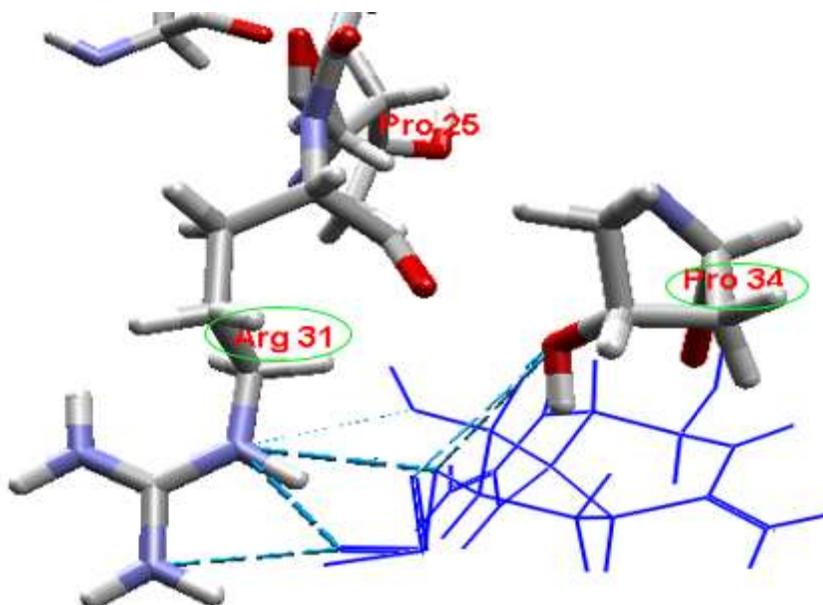


Figura 19. Representación de la interacción de la [00]dcGTX2 con la gelatina tipo A. los residuos marcados con un círculo verde son los residuos que interactúan con la [00]dcGTX2, Pro (prolina) Arg (arginina). El nitrógeno se representa con el color azul, el oxígeno en rojo, el carbono en gris y el hidrógeno en blanco. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas punteadas de color azul.

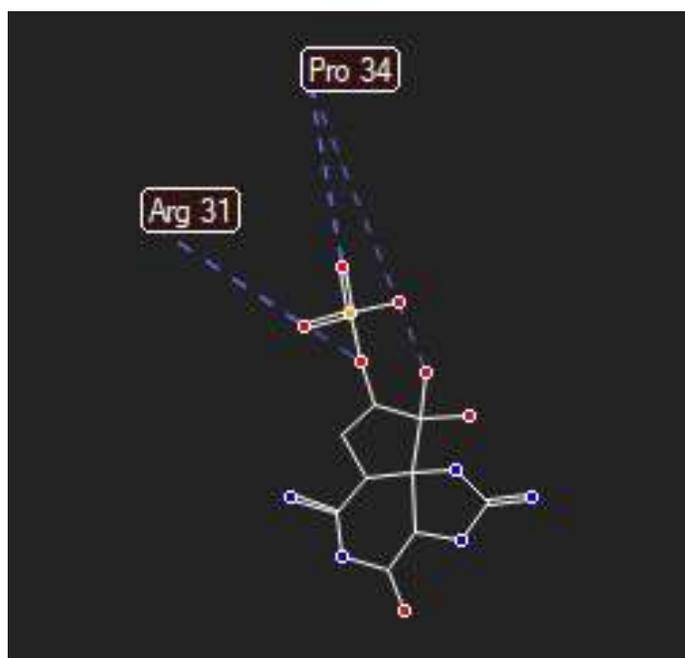


Figura 20. Interacciones de [00]dcGTX2 con la gelatina tipo A Arg (arginina), Pro (prolina), los puntos rojos son oxígeno, los azules son nitrógeno, los amarillos fósforo y las líneas blancas representan los enlaces, las líneas punteadas en azul son representaciones de puentes de hidrógeno.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo utilizando la matriz estructural de la GelNP, identificamos que las energías de interacción con los diferentes análogos de las TP están influenciadas por la hidrofiliidad de los sustituyentes de las TP, como se puede observar en las Figs. 5 y 6. Las TP son toxinas con carácter hidrofílico que pueden o no presentar carga neta positiva dependiendo del tipo de análogo (Oshima, 1995; Chen *et al.*, 2016). Asimismo, las GelNP son construcciones tridimensionales que contienen cadenas poliméricas hidrofóbicas o hidrofílicas que pueden absorber una gran cantidad de agua sin que se disuelva, por lo que la estructura del polímero es reversible, siendo esta, una de las principales características de los geles, su capacidad de absorber agua e hincharse (Rahadar *et al*, 2019).

Las moléculas diana varían según sus sustituyentes, la cuales afectan el reconocimiento de ligandos y también influyen en su disponibilidad biológica. Estos factores deben tenerse en cuenta al relacionar las propiedades de los biopolímeros como la GelNP, con los aspectos biológicos (toxicidad) de los análogos de la STX (Durán-Riveroll *et al*, 2016). Por lo tanto, para elegir la mejor configuración estructural (pose) para cada ligando se utilizó el criterio de la eficiencia del ligando (LE1) donde se consideró como mejor aquella que reporta la menor energía de unión entre todas las poses evaluadas, obteniendo un total de 36 interacciones de las cuales solo cinco mostraron mayor afinidad, siendo [01]STX, [00]GTX2, [00] dcSTX, [00]GC6a y [00]dcGTX las mejores. Cabe señalar que a la izquierda del nombre de cada toxina se encuentran dos números entre corchetes, que van desde el 00 hasta el 04, éstos indican el número de pose, ya que cada pose interactúa con un lugar diferente de la GelNP. Esto nos ayuda a identificar con mayor precisión las afinidades de cada TP; como se muestra en la Tabla 2, hay una diferencia en el valor del LE1 entre la [00]STX con un valor de -3.6 y la [04]STX con un valor de -3.2, lo cual nos sugiere que la STX tiene mayor afinidad a la GelNP cuando interactúa en el sitio de la pose [00]STX.

La ausencia de correlación directa entre ΔG (energía) y la potencia de la toxina podría deberse a que estos análisis no consideran los parámetros biológicos externos que modifican el comportamiento de la misma, como las moléculas del agua y los componentes del gel. Lo

anterior podría estar asociado con comportamiento farmacocinético y procesos de reconocimiento de ligandos, incluidos los movimientos moleculares que tampoco son considerados por el acoplamiento molecular (Durán-Riveroll *et al.*, 2016). Esto podría explicar lo que se observa en la Tabla 4 donde los valores muestran la energía total de la molécula, interacciones por fuerzas de Van der Waals (VdW), y eficiencia de ligando (LE1) en kcal/mol. En este caso las poses más afines mostraron una LE1 muy similar.

Choudhary *et al.* (2002) mencionan a las gonyautoxinas (GTXs, derivados sulfatados de la saxitoxina) suelen unirse en menor proporción por enlaces químicos a comparación con sus contrapartes no sulfatadas, dicha reducción en la afinidad es debido a alguna interacción repulsiva entre el grupo sulfato y los aminoácidos cargados negativamente. La adición de un sulfato resta una carga positiva de la carga neta de la toxina y puede alterar la distribución de carga en la molécula. Estos cambios pueden afectar la unión de la toxina debido a su sensibilidad a las diferencias de potencial; así mismo sugiere que el grupo sulfato tiene solo un efecto menor sobre la distribución de carga del grupo 1,2,3 guanidinio. Lo anterior podría explicar las interacciones de la GeINP con [00] GTX2, [00] GC6a, y [00] dcGTX2 dónde se encontró que interaccionan con fuerzas electrostáticas de atracción con los hidroxilos en lugar del grupo OSO_3 .

Siguiendo con los grupos funcionales, se sabe que todos los grupos carboxilo están involucrados con las uniones de la toxina y sus análogos, siendo utilizadas y caracterizadas en el pasado por varios autores. También los grupos hidroxilo y amino suelen ser claves en los enlaces que estas toxinas pueden formar dentro de un sistema tomando orientaciones particulares durante las interacciones (Choudhary *et al.*, 2002); en el presente análisis los grupos funcionales carbonilo de la pose [01]STX y [00]GTX2 han formado puentes de hidrógeno, así como el grupo funcional OSO_3 por dichas características. De igual manera los grupos decarbamilo de la [00]dcSTX y [00]dcGTX2 y el grupo funcional di-hidroxibenzoilo presentes en las poses de la [00]GC6a respectivamente, son los responsables de formar interacciones y enlaces.

Es por tanto que las cargas de los grupos funcionales pudieran ser responsables de la mayoría de las interacciones y enlaces de las toxinas con los aminoácidos Arg (arginina), Pro (prolina) y Glu (ácido Glutámico) en la mayoría de las poses, variando en algunos casos como [00]dcSTX que también mostró puentes de hidrógeno con la Gly (glicina); a diferencia de lo antes mencionado, donde la pose [00]GTX2 forma puentes de hidrógeno con la Pro7 sugiriendo que se produce por reacciones electrostáticas entre los grupos amino de la arginina con los OH y grupo funcional OSO_3 . La pose [00]GTX2 también mostró una fuerza de atracción hacia la Arg4 y Glu15 con grupos hidroxilo y un carboxilo expuestos, los cuales son grupos funcionales que suelen interactuar con los nitrógenos de los anillos característicos de las purinas cargados positivamente.

Debemos recordar que las cargas moleculares iguales, como dos cargas negativas o dos cargas positivas, se repelen entre sí, por lo que las interacciones con Ala10 en las poses formadas por los grupos OH del SO_3 con los aminoácidos de la GeINP, son interacciones débiles que no alcanzan a formar enlaces; también se muestra una interacción electrostática de repulsión hacia el aminoácido Pro7 de la GeINP sugiriendo que podría tener la misma carga que los grupos funcionales cercanos a él. Asimismo, se observa que la [00]GTX2 tiene una mayor cantidad de interacciones con la GeINP, sin embargo, el criterio para determinar la mayor afinidad entre un ligando y la GeINP es LE1, el cual toma en cuenta la energía de los enlaces formados entre el ligando y la diana. Gracias a este estudio podemos confirmar que los enlaces por puentes de hidrógeno se dan entre los grupos funcionales protonados positivos (NH_2) y los grupos funcionales hidroxilo (OH) cargados negativamente como se puede observar en las Figs. 7, 9, 11, y 15.

9. CONCLUSIONES

Las TP provenientes de dinoflagelados marinos, son un grupo de alcaloides neurotóxicos de gran potencial biomédico. Su alta toxicidad ha restringido su uso, siendo esta uno de sus principales desafíos para poder dirigir y mantener la liberación de las TP en dosis terapéuticas. Biopolímeros naturales como la gelatina, han mostrado ser un sólido candidato para transportar proteínas, péptidos, aminoácidos y hasta fármacos anticancerígenos. Las simulaciones presentadas en este trabajo muestran, por primera vez, que las GelNP y 5 análogos de las TP ([01]STX, [00]GTX2, [00]dcSTX, [00]GC6a y [00]dcGTX) son capaces de inducir uniones a través de interacciones físicas para formar complejos estables que pudieran utilizarse como potenciales candidatos terapéuticos. Sin embargo, aún a pesar de que nuestros resultados muestran una alta estabilidad de estos sistemas, es importante reconocer que todavía se requieren más investigaciones con diferentes mecanismos de interacciones biológicas incluyendo, por ejemplo, esferas completas de gelatina para tratar de predecir el efecto de la energía superficial en función del pH y temperatura.

10. LITERATURA CITADA

- Angel-Olarte, C., Hernández-Adame, L., Mendez-Blas, A. y Palestino, G. (2019). Eu³⁺/Yb³⁺ co-doped gadolinium oxysulfide upconverting nanorods: Morphological, physicochemical and optical evaluation. *Journal of Alloys and Compounds*, 787: 1032–1043. doi:10.1016/j.jallcom.2019.02.113
- Balthasar, S., Michaelis, K., Dinauer, N., Briesen, H. V., Kreuter, J. y Langer, K. (2005). Preparation and characterization of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes. *Biomaterials*, 26: 2723–2732. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.07.047
- Ballón-Paucara, W. G., y Grados-Torrez, R. E. (2019). Acomplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista Con-ciencia. Farm. y Bioq*, 7(2): 55–72. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1178630>
- Boissenot, T., Bordat, A., Fattal, E. y Tsapis, N. (2016). Ultrasound-triggered drug delivery for cancer treatment using drug delivery systems: From theoretical considerations to practical applications. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 241: 144–163. doi:10.1016/j.jconrel.2016.09.026
- Bricelj, V. M. y Shumway, S. E. (1998). Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Reviews in Fisheries Science*, 6(4): 315–383. doi:10.1080/10641269891314294
- Chen, J., Gao, L., Li, Z., Wang, S., Li, J., Cao, W., Sun, C., Zheng, L. y Wang, X. (2016). Simultaneous screening for lipophilic and hydrophilic toxins in marine harmful algae using a serially coupled reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography separation system with high-resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 914:117–126. doi:10.1016/j.aca.2016.01.062
- Cho, H. J., Chung, M. y Shim, M. S. (2015). Engineered photo-responsive materials for near-infrared-triggered drug delivery. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 31: 15–25. doi:10.1016/j.jiec.2015.07.016.
- Coester, C., Nayyar, P. y Samuel, J. (2006). In vitro uptake of gelatin nanoparticles by murine dendritic cells and their intracellular localisation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 62(3): 306–314. doi:10.1016/j.ejpb.2005.09.009
- Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B. y Maji, TK. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239: 136–145. doi:10.1016/j.cis.2016.05.009
- Durán-Riveroll, L. M., Cembella, A. D., Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, J. J. y Correa-

- Basurto, J. (2016). Docking simulation of the binding interactions of saxitoxin analogs produced by the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* to the voltage-gated sodium channel Nav1.4. *Toxins*, 8(5): 1–16. doi:10.3390/toxins8050129.
- Faber S. (2012). Saxitoxin and the induction of paralytic shellfish poisoning. *Journal of Young Investigators*, 23(1): 1–7.
- García-Silva, I., Palestino, G. y Gonzalez-Ortega, O. (2022). Chapter 17 - the potential of drug delivery nanosystems to treat COVID-19, San Luis Potosi, México, pp. 307–337.
- Hallegraeff, G. M. (2003). Harmful algal blooms: a global overview. En Hallegraeff G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D., editores. *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Paris, pp. 25–49.
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch T., Zurek, E., y Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics* 4 (1), 17. doi:10.1186/1758-2946-4-17
- Harting, R., Johnston, K., y Petersen, S. (2019). Correlating *in vitro* degradation and drug release kinetics of biopolymer-based drug delivery systems. *International Journal of Biobased Plastics*, 1: 8–21. Doi:10.1080/24759651.2018.1563358.
- Hathout R. M. y Metwally, A. A. (2019). Gelatin nanoparticles. *methods in molecular biology*, 2000: 71–78. doi:10.1007/978-1-4939-9516-5_6.
- Khan, I., Saeed, K. y Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, S1878535217300990. doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- Kim, F. A., Ren, G. y Jenekhe, S. (2011). One-dimensional nanostructures of π -conjugated molecular systems: assembly, properties, and applications from photovoltaics, sensors, and nanophotonics to nanoelectronics. *Chemistry of Materials*, 23: 682–732. doi:10.1021/cm102772x
- Knaack, J. S., Porter, K. A., Jacob, J. T., Sullivan, K., Forester, M., Wang, R. Y., Trainer, V. L., Morton, S., Eckert, G., McGahee, E., Thomas, J., McLaughlin, J. y Johnson, R. C. (2016). Case diagnosis and characterization of suspected paralytic shellfish poisoning in Alaska. *Harmful Algae*, 57: 45–50. doi:10.1016/j.hal.2016.03.006
- La Barbera-Sánchez, A. y Gamboa-Maruez, J. F. (2001). Distribution of *Gymnodinium catenatum* Graham and shellfish toxicity on the coast of Sucre state, Venezuela, from 1989 to 1998. *Journal of Shellfish Research*, 20(3): 1257–1261.
- Lagos N. (1998). Microalgal blooms: a global issue with negative impact in Chile. *Biological Research*, 31: 375–386.

- Lagos N. (2003). Paralytic shellfish poisoning phycotoxins: occurrence in South America. *Comments on Toxicology*, 9: 175–193. doi: 10.1080/08865140302429
- Lee, G. Y., Park, K., Nam, J. H., Kim, S. Y. y Byun, Y. (2006). Anti-tumor and anti-metastatic effects of gelatin-doxorubicin and PEGylated gelatin-doxorubicin nanoparticles in SCC7 bearing mice. *Journal of Drug Targeting*, 14(10): 707–716. doi:10.1080/10611860600935701
- Li, J. K., Wang, N. y Wu, X. S. (1997). A novel biodegradable system based on gelatin nanoparticles and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(8): 891-895. doi:10.1021/js970084i
- Liu, Q., Santamaria, C. M., Wei, T., Zhao, C., Ji, T., Yang, T., Shomorony A., Wang BY. y Kohane, D. S. (2017). Hollow Silica Nanoparticles penetrate the peripheral nerve and enhance the nerve blockade from tetrodotoxin. *Nano Letters*, 18(1) : 32–37. doi:10.1021/acs.nanolett.7b02461
- Ma, D., Liu, W., Chen, Y. y Qin, J. (2020). Preparation of tetrodotoxin extracellular nanoparticles and Its long-term local anesthesia. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 10(6): 823–830. doi: 10.1166/jbt.2020.2339
- Maeda-Martínez, A. N., Lombeida, P., Freitas, L., Lodeiros, C. y Sicard, M. T. (2001). Cutivo de pectínidos en fondo y en estanques. En: Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. A.N. Maeda (ed.), Limusa. México. Pp. 213–231.
- Mahapatro, A., Johnson, D.M., Patel, D. N., Feldman, M. D., Ayon, A. A. y Agrawal, C. M. (2008). Drug delivery from therapeutic self-assembled monolayers (T-SAMs) on 316L stainless steel. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(4): 281–289. doi:10.2174/156802608783790929
- Mons, M. N., van Egmond, H. P. y Speijers, G. J. A. (1998). Paralytic shellfish poisoning: A review. RIVM Report 388802 005.
- Morey-Gaines, G. (1982). *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae): morphology and affinities with armoured forms. *Phycologia*, 21(2): 154–163. doi:10.2216/i0031-8884-21-2-154.1
- Ninan, G., Jose, J. y Abubacker, Z. (2010). Preparation and characterization of gelatin extracted from the skins of rohu (*Labeo rohita*) and common carp (*Cyprinus carpio*), *Journal of Food Processing and Preservation*. 35: 143–162. doi:10.1111/j.1745-4549.2009.00467.x
- Oshima, Y. (1995). Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 78(2): 528–532. doi:10.1093/jaoac/78.2.528
- Patel, Z. S. Yamamoto, M., Ueda, H., Tabata, Y. y Mikos A. G. (2008). Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2. *Acta Biomaterialia*. 4: 1126–1138. doi:10.1016/j.actbio.2008.04.002

- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. y Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*. 25(13): 1605-1612. doi:10.1002/jcc.20084.
- Phatak, S. S., Stephan, C. C. y Cavasotto, C. N. (2009). High-Throughput and in silicon screenings in drug discovery. expert opinion on drug discovery. 4: 947-959. doi:10.1517/17460440903190961
- Rafique, M., Tahir, M.B., Rafique, M. S., Safdar, N. y Tahir, R. (2020). Chapter 2 -Nanostructure materials and their classification by dimensionality. *Micro and Nano Technologies*, 27-44. doi:10.1016/B978-0-12-821192-2.00002-4
- Rappe, A. K., Casewit, C. J., Colwell, K. S. Goddard III, W. A., y Skiff W. M. (1996). UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*. 114(25): 10024-10035. doi:10.1021/ja00051a040
- Razali, M. H. y Ismail, N. A. (2021). Chapter 1 - Basic concepts and processing of nanostructures materials. *Micro and Nano Technologies*, 1-32. doi:10.1016/B978-0-12-820569-3.00001-3
- Schulz-Gasch, T. y M. Stahl. (2004). Scoring functions for protein-ligand interactions: a critical perspective. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(3): 231-239. doi:10.1016/j.ddtec.2004.08.004
- Shoichet, B. K., McGovern, S. L., Wei, B. y Irwin, J. J. (2002) Lead discovery using molecular docking. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(4): 439-446. doi:10.1016/s1367-5931(02)00339-3
- Singh, R. y Lillard, J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, 86(3): 215-223. doi:10.1016/j.yexmp.2008.12.004.
- Stommel, E. W., y Watters, M. R. (2004). Marine neurotoxins: Ingestible toxins. *Current Treatment Options in Neurology*, 6: 105-114. doi:10.1007/s11940-004-0020-9
- Thomsen, R. y Christensen, M. H. (2006). MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49(11): 3315-3321. doi:10.1021/jm051197e
- Tian, X. H., Wei, F., Wang, T. X., Wang, P., Lin, X. N., Wang, J., Wang, D. y Ren, L. (2012). *In vitro* and *in vivo* studies on gelatin-siloxane nanoparticles conjugated with SynB peptide to increase drug delivery to the brain. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 1031-1041. doi:10.2147/IJN.S26541
- Tian, X. H., Wang, Z. G., Meng, H., Wang, Y. H., Feng, W., Wei, F., Huang, Z. C., Lin, X. N. y Ren, L. (2013). Tat peptide decorated gelatin-siloxane nanoparticles for delivery of CGRP transgene

in treatment of cerebral vasospasm. *International Journal of Nanomedicine*, 8: 865–876. doi:10.2147/IJN.S39951

Tietze, R., Zaloga, J., Unterweger, H., Lyer, S., Friedrich, R. P., Janko, C., Poittler, M., Du"rr, S. y Alexiou, C. (2015). Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(3): 463–470. doi:10.1016/j.bbrc.2015.08.022

Uesugi, Y., Kawata, H., Jo, J., Saito, Y. y Tabata, Y. (2010). An ultrasound-responsive nano delivery system of tissue-type plasminogen activator for thrombolytic therapy. *Journal of Controlled Release*, 147: 269–277. doi:10.1016/j.jconrel.2010.07.127

Vale, P. (2008). Complex profiles of hydrophobic shellfish poisoning compounds in *Gymnodinium catenatum* identified by liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1195: 85–93. doi:10.1016/j.chroma.2008.04.073

Vidu, R., Rahman, M., Mahmoudi, M., Enachescu, M., Poteca, T. D. y Opris, I. (2014). Nanostructures: a platform for brain repair and augmentation. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8: 91. doi:10.3389/fnsys.2014.00091.

Wang, H., Boerman, O. C., Sariibrahimoglu, K., Li, Y., Jansen, J. A. y Leeuwenburgh, S. C. G. (2012). Comparison of micro-vs. nano-structured colloidal gelatin gels for sustained delivery of osteogenic proteins: bone morphogenetic protein-2 and alkaline phosphatase. *Biomaterials*, 33: 8695–8703. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.08.024

Wiese, M., D'Agostino, P. M., Mihali, T. K., Moffitt, M. C. y Neilan, B. A. (2010). Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs*, 8: 2185–2211. doi:10.3390/md8072185

Wong, C. F. (2008). Flexible ligand–flexible protein docking in protein kinase systems. *Biochim Biophysica Acta*, 1784(1): 244–251. doi:10.1016/j.bbapap.2007.10.005

Zhang, Y., Yu, J., Bomba, H. N., Zhu, Y. y Gu, Z. (2016). Mechanical force-triggered drug delivery. *Chemical Reviews*, 116(19): 12536–12563. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00369

Zhao, C., Liu, A., Santamaria, C. M. Shomorony, A., Ji, T., Wei, T., Gordon, A., Elofsson, H., Mehta, M., Yang, R. y Kohane, D. S. (2019). Polymer-tetrodotoxin conjugates to induce prolonged duration local anesthesia with minimal toxicity. *Nature Communications*, 10: 2566. doi:10.1038/s41467-019-10296-9

Ja, P-Z. y a, D-R. (2002). Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o. Mensaje Bioquim. XXVI:129-145