



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTUDIOS A NIVEL MOLECULAR DE LAS
INTERACCIONES DE LOS PRINCIPALES CO-
SOLVENTES UTILIZADOS PARA ESTABILIZAR
PROTEÍNAS DE INTERÉS BIOLÓGICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

PAULINA ALEJANDRA TORRES ALCANTARA

Dr. Martín González Andrade

[Facultad de Medicina](#)

Dra. Carmina Montiel Pacheco

[Facultad de Química](#)

Dr. Alejandro Sosa Peinado

[Facultad de Medicina](#)

Ciudad de México. Septiembre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

1. Introducción	6
1.1 Proteínas.....	6
1.2 Estabilidad de proteínas.....	7
2. Cosolventes utilizados en la estabilización de proteínas.....	12
3. Simulaciones de Dinámicas Moleculares	17
3.1 Packmol.....	18
3.2 Generación de Mapas Electrostáticos	19
4. Hipótesis	21
5. Objetivo principal	21
5.1 Objetivos particulares	21
6. Materiales y métodos.	22
6.1 Materiales	22
6.2 Métodos.....	22
6.2.1 Obtención de enzimas: alfa glucosidasa y hPTP1B	22
6.2.2 Determinación de la concentración de α -glucosidasa y hPTP1B mediante el método de ácido bicinconínico. BCA	23
6.2.3 Ensayo de actividad.....	23
6.2.4 Acoplamiento molecular proteína-proteína (Docking).....	24
6.2.5 Preparación de los sistemas proteicos con cosolventes.....	24
6.2.6 Simulación de Dinámica Molecular (SDM).....	25
6.2.7 Análisis de la dinámica molecular	25
6.2.8 Construcción de mapas electrostáticos	25
7. Resultados y discusión.....	26
7.1 Sistema α -glucosidasa.....	26
7.2 Sistema hPTP1B.....	49
8. Conclusiones.....	73
9. Perspectivas.....	75
10. Referencias.....	76
11. Anexos	79

11.1 Anexo 1. Datos obtenidos de los ensayos enzimáticos de la α -glucosidasa con PNPG..... 79

11.2 Anexo 2. Datos obtenidos de los ensayos enzimáticos de la hPTP1B con PNPP 82

11.3 Anexo 3. Protocolos utilizados para realizar las simulaciones de dinámica molecular..... 84

11.5 Anexo 7. Estructuras alineadas de hPTP1B a los 0, 20 y 50 ns, hPTP1B-BSA-EDTA-Gli a los 0, 20 y 50 ns y de hPTP1B-Gli a los 0, 20 y 50 ns. 91

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca Nacional para Estudios de Posgrado (CVU) que me fue proporcionada durante mi maestría.

Al Dr. Martín González Andrade por su paciencia, su disposición, su actitud siempre positiva y amable. Por todas las horas invertidas y su generosidad, por siempre escucharme y brindar el espacio para el diálogo, por todas las oportunidades y su apoyo incondicional.

A mi comité tutor por todo su apoyo, el conocimiento transmitido y su tiempo invertido en el proyecto: Dra. Carmina Montiel Pacheco, Dr. Alejandro Sosa Peinado.

A la M. en C. Eugenia Flores Robles y a M. en C. Laura Iliana Álvarez Añorve por su disposición para enseñarme y compartir conmigo sus conocimientos.

A la Dra. María Isabel Velázquez López por su disposición para enseñarme y compartir conmigo sus conocimientos, así como por la disposición y paciencia de revisar mi tesis.

A la Dra. Luz X. Vásquez Bochm por ayudarme en el proceso de ingreso y a buscar tutor, por sus ideas y su apoyo.

A mi familia, Vero, Benja y Benja, por apoyar mis decisiones y acompañarme en el proceso, les agradezco todas las oportunidades que me han brindado y por siempre apoyar mis sueños.

A la familia Torres Morales por guiarme en el camino de la ciencia, por estar en cada paso del camino y por acompañarme siempre con un buen vino.

A Yahir López por acompañarme en todo el proceso, darme ánimos e impulsarme para superarme en cada paso, por escuchar mi proyecto y aprender conmigo.

A Mariana Barahona por escucharme y apoyar todas mis decisiones, por acompañarme desde los 3 años y siempre impulsarme a ser mejor persona.

A todas y todos mis amigos por darme ánimos y acompañarme en todos mis logros.

Resumen

Actualmente, la formulación de los biofármacos está impulsada en gran medida por el conocimiento y la experiencia previos, asistidos por una extensa caracterización analítica. Las formulaciones modernas tienden a mantener la composición lo más simple posible. Esto principalmente se debe al hecho de que realizar estudios de detección de un mayor número de combinaciones de excipientes puede no ser factible debido a la presión de tiempo inherente al desarrollo de biofármacos. El presente trabajo teórico práctico tiene como objetivo estudiar a nivel molecular las interacciones de los principales cosolventes (BSA, glicerol, His, Gly, entre otros) utilizados para estabilizar proteínas de interés biológico. Se utilizaron dos enzimas diferentes, la α -glucosidasa proveniente de *Ruminococcus obeum* y la proteína tirosin-fosfatasa humana 1B (hPTP1B), se monitoreo su actividad enzimática en ausencia y presencia de distintos cosolventes con el fin de observar el comportamiento de estos sistemas. El efecto de los cosolventes se estudió mediante la construcción de matrices que consistieron en la enzima correspondiente más dos o tres cosolventes juntos y posteriormente de algunos cosolventes de forma individual. Adicionalmente, de las matrices realizadas se seleccionaron las que presentaron mayor y menor actividad enzimática para realizar simulaciones de dinámica molecular (SDM). Una vez obtenidos los resultados se concluyó que, si bien la estabilidad de las proteínas está influenciada por los mismos elementos como las interacciones intra e intermoleculares y factores externos como temperatura y pH, la forma en la que estos elementos afectan a cada proteína es diferente por lo que la elección de cosolventes es particular para cada sistema proteico, así como los parámetros a estudiar para definir qué cosolventes son los que mejor cumplen con el objetivo.

1. Introducción

La biotecnología puede ser definida como la aplicación de conocimientos científicos y tecnológicos de los organismos vivos, así como a sus partes, productos y modelos, para alterar materiales vivos o inertes en la consolidación de conocimientos, bienes y servicios [1].

De acuerdo con la Ley General de Salud los productos biotecnológicos son aquellos alimentos, ingredientes, aditivos, materias primas, insumos para la salud e investigación, plaguicidas, sustancias tóxicas o peligrosas, y sus desechos, en cuyo proceso intervengan organismos vivos o parte de ellos, modificados por técnica tradicional o ingeniería genética.

Dentro de los insumos para la investigación se encuentran diversos reactivos biotecnológicos que se utilizan cotidianamente en proyectos de investigación y desarrollo, por ejemplo, los “kits” de biología molecular, las enzimas de restricción y las utilizadas para realizar diversos ensayos enzimáticos. La mayoría de los productos biotecnológicos o sus componentes que son utilizados en los laboratorios son de naturaleza proteica, por lo que es fundamental asegurar su estabilidad para garantizar su correcto funcionamiento

En cuanto a los insumos para la salud, estos engloban las pruebas diagnósticas y los biofármacos que se definen como toda sustancia que haya sido producida por biotecnología, que tenga actividad farmacológica, que se identifique por sus propiedades físicas, químicas y biológicas y que reúna las condiciones para ser empleada como principio activo de un medicamento biotecnológico [2, 3]. Por ejemplo, uno de los biofármacos utilizados en México es la insulina, debido a la alta prevalencia de Diabetes Mellitus. La insulina contiene 51 aminoácidos y su estructura está compuesta por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. La conservación de su estructura es de suma importancia para que pueda llevar a cabo de manera adecuada sus funciones. La insulina, así como algunos biofármacos, es una biomolécula proteica que tiene propiedades específicas, por lo que es importante definir qué es una proteína y cómo es que las proteínas conservan su estructura.

1.1 Proteínas

Las proteínas son biomoléculas conformadas por aminoácidos los cuales contienen un átomo de carbón unido a tres sustituyentes y una cadena lateral. Poseen diferentes funciones

y para llevarlas a cabo de manera adecuada requieren una estructura definida a la que se le llama estado nativo o plegado. El equilibrio entre el estado plegado y desplegado se puede alterar al modificar el estado termodinámico del sistema o al cambiar la composición del medio. El estado plegado es marginalmente estable y es afectado por distintas causas [4].

1.2 Estabilidad de proteínas

La estabilidad de proteínas se ve influenciada por aspectos termodinámicos y cinéticos. La estabilidad cinética se relaciona con el tiempo que se mantiene tanto la estructura como la función de la proteína bajo ciertas condiciones [5].

En cuanto a la estabilidad termodinámica, ésta hace referencia a las condiciones a las cuales un proceso cumple con el criterio termodinámico de espontaneidad. Uno de los parámetros que describe la estabilidad de las proteínas es la diferencia de la energía libre de Gibbs (ΔG) entre el estado desplegado y plegado. De acuerdo con la convención estándar, un valor negativo de ΔG indica que el estado nativo está energéticamente favorecido sobre el estado desplegado [5-7].

El estado plegado se ve influenciado por distintos tipos de interacciones intra e intermoleculares. Algunas de ellas son:

- Puentes de hidrógeno: son interacciones no covalentes, con dependencia angular, que surgen del intercambio parcial de un átomo de hidrógeno entre un grupo donante, como un grupo hidroxilo (-OH) o un grupo amino (-NH), y un átomo aceptor, como oxígeno o nitrógeno. También son los responsables de mantener la estructura secundaria de las proteínas y a su vez son las principales interacciones de las proteínas con el solvente, que principalmente es agua [6, 7].
- Interacciones de Van der Waals: se conocen también como fuerzas de dispersión de London, son el resultado de dipolos transitorios que los átomos no enlazados inducen entre sí, son débiles y dependientes de la distancia entre los átomos. Debido a esto último, el acomodo de los átomos con respecto al núcleo de la proteína y al solvente determinará si estas interacciones estabilizarán o desestabilizarán el estado nativo de la proteína [6].

- Interacciones electrostáticas: ocurren entre cargas de los grupos de proteínas. Tales cargas están presentes en los extremos amino y carboxilo, así como en muchas cadenas laterales ionizables de los aminoácidos. Las cargas en el interior de las proteínas pueden interactuar fuertemente pues se considera un medio de baja constante dieléctrica (hidrofóbico), pero se ha sugerido que tales interacciones desempeñan un papel menor en la estabilidad de las proteínas, ya que no son demasiado comunes. La repulsión electrostática puede ser más importante, no solo para desestabilizar el estado nativo, sino también en términos de su efecto sobre el grado de extensión del estado desplegado [6, 8].
- Efecto o colapso hidrofóbico: estas interacciones ocurren entre aminoácidos de naturaleza no polar. Al ser aminoácidos hidrofóbicos tienden a agruparse para disminuir las interacciones desfavorables con el agua y de esta manera se forma un núcleo hidrofóbico, estas interacciones son las que dictan el proceso de plegamiento y las que predominan en términos de estabilidad [8].

A diferencia de las interacciones que estabilizan a las proteínas, la entropía conformacional es la principal fuerza de oposición que las desestabiliza. Ésta se refiere al número de conformaciones que puede adoptar cada aminoácido que conforma una proteína. El aumento en ésta se relaciona con el incremento de grados de libertad disponibles para la cadena polipeptídica en el estado desplegado en relación con el estado nativo [6, 9, 10].

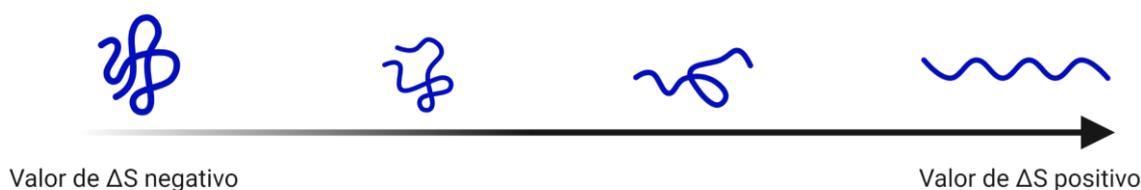


Figura 1. Cambio en el plegamiento de las proteínas de acuerdo con el aumento en la entropía conformacional.

Además de todas las interacciones ya descritas anteriormente es importante tomar en cuenta el papel del solvente, principalmente el agua, en la estabilidad de las proteínas. El agua juega un papel crucial en la estabilidad de las proteínas. Su pequeño tamaño molecular y compleja estructura de puentes de hidrógeno, la convierten en un excelente solvente para muchos grupos funcionales. Estas mismas características también dan lugar al efecto hidrofóbico [6, 9]. Desde el punto de vista entrópico, las moléculas de agua que se liberan al

seno acuoso cuando la proteína se pliega resulta favorable pues aumentan los grados de libertad en la entropía de solvatación.

Por otro lado, debido a la poca estabilidad conformacional del estado nativo de las proteínas, cambios relativamente pequeños de variables externas como por ejemplo temperatura, pH, fuerza iónica, entre otros, en el sistema proteína-solvente pueden desestabilizar la estructura de la proteína, es decir, inducir un cambio conformacional como su desplegamiento. En cuanto a los biofármacos estos cambios se pueden dar en alguno de los siguientes pasos: producción, caracterización, purificación, transporte y almacenamiento [6].

El efecto de la temperatura en la estabilidad de las proteínas, figura 2, se caracteriza por la energía libre de desplegamiento, " ΔG_{unf} ", ésta muestra típicamente un perfil parabólico en función de la temperatura. Por lo tanto, ΔG_{unf} se vuelve negativo a dos temperaturas, lo que explica el desplegamiento de proteínas tanto a temperaturas altas, entre 50-100 °C, como a bajas, a menos de 10 °C [11].

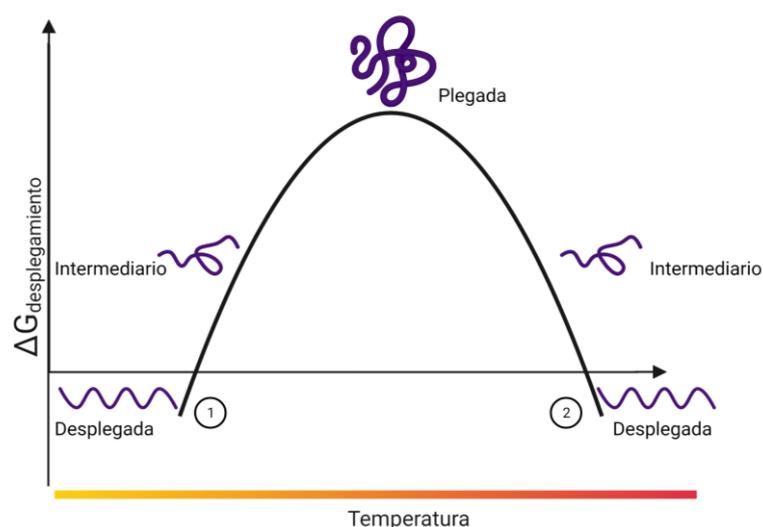


Figura 2. Estabilidad conformacional de la proteína en función de la temperatura. El número uno indica que a temperaturas bajas la proteína se encuentra desplegada, ya que el ΔG_{unf} disminuye; esto se debe a que las interacciones dentro de la proteína disminuyen y se propician las interacciones solvente-proteína por lo que la estructura nativa se pierde. El número dos indica el estado desplegado de la proteína en temperaturas altas pues la energía cinética aumenta y las interacciones dentro de la proteína y proteína-solvente disminuyen.

En cuanto al efecto del pH, se ha observado que son estables frente a la agregación en cierto rango de pH, el cual depende de cada proteína, fuera de este rango la proteína se puede agregar o incluso desnaturalizar. El pH de la solución determina el tipo (positivo o negativo) y la carga total, lo que afecta las interacciones electrostáticas. Existen dos formas en las que éstas pueden afectar su estabilidad. Primero, los efectos electrostáticos clásicos: repulsiones inespecíficas surgen cuando todas las cargas de los residuos coinciden en signo (+, -). El aumento de la repulsión de carga dentro de ésta desestabiliza su conformación porque la densidad de carga es mayor en el estado plegado que en el desplegado [11, 12].

En segundo lugar, las interacciones de carga específicas, como los puentes salinos (o el apareamiento de iones), también pueden afectar la estabilidad conformacional de las proteínas; en contraste con el efecto electrostático inespecífico, los puentes salinos lo estabilizan [11].

Por otra parte, en el punto isoeléctrico, la proteína puede agregarse debido a que su solubilidad es mínima.

Uno de los principales problemas en la producción de biofármacos es la agregación de las proteínas, pues se presenta de forma rutinaria durante los procesos de replegamiento, purificación, esterilización, traslado y almacenamiento, ya que mantener las condiciones óptimas de temperatura y pH no siempre es posible.

La agregación de proteínas (Figura 3) es la acumulación proteica en respuesta a cambios térmicos, químicos o físicos, o incluso en ausencia de cualquier estrés aplicado y en las condiciones óptimas de la proteína. Contiene estructuras proteicas no nativas y depende de la concentración proteica, es irreversible y los agregados frecuentemente contienen altos niveles de estructuras intermoleculares no nativas, principalmente hojas beta. Esta transición estructural ocurre independientemente de la estructura secundaria inicial de la proteína nativa o de la morfología final (amorfa o fibrilar) de los agregados [7, 11].

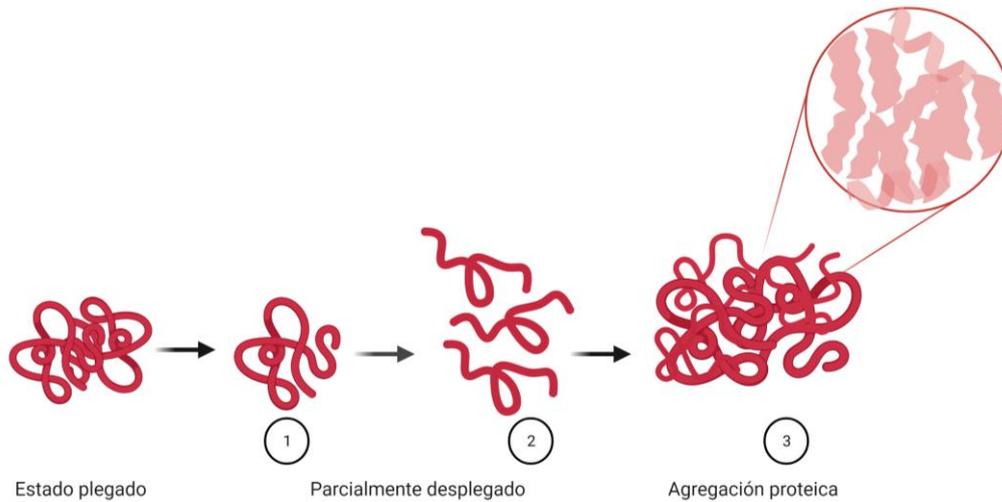


Figura 3. Proceso de agregación proteica, el número uno indica el primer paso de agregación que es la iniciación, el dos corresponde al paso de propagación y finalmente el número tres es la terminación de la agregación proteica en el que hay una acumulación de estructuras proteicas secundarias como láminas beta.

Tanto los cambios conformacionales, como la agregación de proteínas son los principales factores que afectan a la estabilidad y por ende a la estructura de las proteínas, ambas fundamentales para conservar el funcionamiento adecuado de estas.

Debido a la importancia de conservar la estructura nativa de las proteínas durante todo el proceso de producción y hasta el momento de la administración de los medicamentos biotecnológicos, han sido exploradas distintas alternativas para conservar su estructura y evitar la agregación. La adición de pequeñas moléculas orgánicas conocidas como codisolventes afecta el equilibrio de plegamiento de las proteínas. Estas moléculas se denominan cosolventes ya que ocupan una fracción del volumen de la solución. El equilibrio (plegado/desplegado) se puede ver modificado en cualquier dirección dependiendo de la identidad del cosolvente [4, 11].

Altas concentraciones (~1M) de ciertos cosolventes pueden estabilizar el estado plegado de las proteínas, por ejemplo, azúcares, polioles y ciertas sales; por otra parte, cosolventes como la urea y el cloruro de guanidinio las desnaturalizan. Además, los ligandos y cosolventes que alteran la estabilidad conformacional de las proteínas también influyen en la velocidad de formación de distintos agregados [11].

En cuanto a los electrolitos, sus efectos son más complejos sobre la estabilidad física de las proteínas ya que modifican la estabilidad conformacional, la solubilidad en equilibrio (*salting-in* y *salting out*) y la velocidad de formación de agregados [11].

Ya que las sales se unen a las proteínas; los iones que las conforman pueden interactuar con las cadenas laterales con carga no apareadas de las proteínas en su superficie, lo que conduce a la estabilización del estado nativo. Por otra parte, ya que el enlace peptídico tiene un momento dipolar resultante de una carga parcial positiva del grupo amino y una carga parcial negativa del grupo carbonilo, los iones pueden interactuar con éstos, de tal manera que desestabilizan el estado nativo. Esto ocurre si los iones se unen con más fuerza a los estados proteicos no nativos que a los nativos [11].

2. Cosolventes utilizados en la estabilización de proteínas

Los cosolventes que estabilizan a las proteínas alteran el equilibrio existente entre el estado plegado y desplegado de éstas y así se reduce la agregación. En concentraciones de moderadas (0.1 M) a altas (1 M), estos aditivos ejercen sus efectos al unirse débilmente a la superficie de las proteínas, o unirse a moléculas del medio las cuales tienen el potencial de desestabilizar la estructura de las proteínas [13-15].

Existen dos principales mecanismos por los cuales los cosolventes inducen la estabilización de proteínas: I) mejorando las fuerzas estabilizadoras de proteínas o II) desestabilizando el estado desnaturalizado. Es decir, cualquier cambio en las propiedades del solvente que mejore una interacción nativa o que perturbe las interacciones no nativas aumenta la estabilidad de las proteínas en solución [7, 16].

Aunque los cosolventes estabilizan a las proteínas principalmente cambiando las propiedades del solvente, algunos pueden interactuar favorablemente en zonas cargadas de la superficie y de esta manera minimizar interacciones electrostáticas entre las mismas. Esto quiere decir que existe una interacción preferencial de la proteína ya sea con el solvente o con el cosolvente (Figura 4) [7, 15, 16].

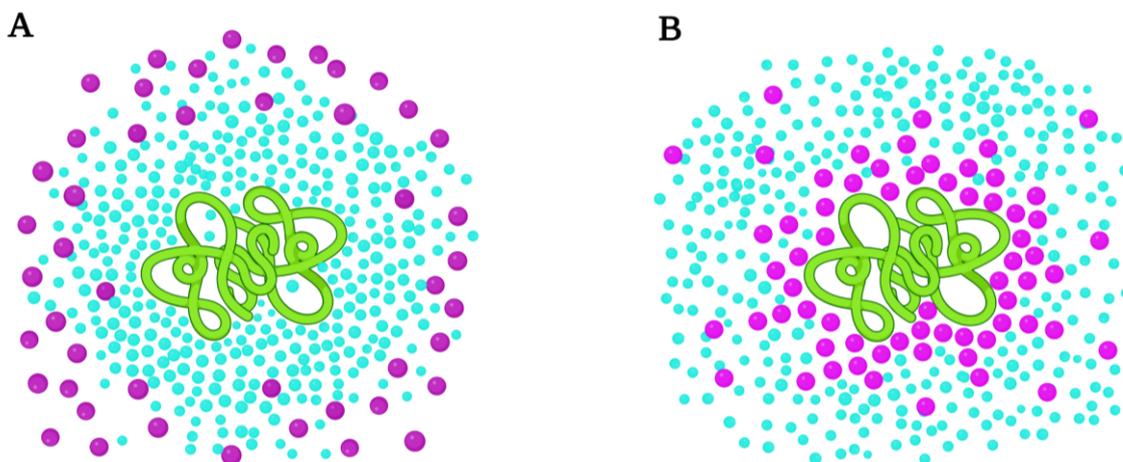


Figura 4. Mecanismos de interacción de las proteínas con los cosolventes. La proteína es representada en color verde, las esferas de color azul son moléculas de agua y las moradas representan distintos cosolventes. A) Ilustra el mecanismo de hidratación preferencial, mientras que B) hace alusión al mecanismo de interacción preferencial

La hidratación preferencial (Figura 4.A) implica que una proteína en presencia de un cosolvente interactúa principalmente con el agua y el cosolvente es excluido del dominio de la proteína. En este caso se encuentran más moléculas de agua y menos de cosolvente en la superficie de las proteínas. La hidratación preferencial se logra aumentando la energía libre superficial del agua o por exclusión estérica [7].

La interacción preferencial (Figura 4.B) es la consecuencia de diferencias en la afinidad de las proteínas ya sea con el agua o con el cosolvente presente. Si hay una preferencia por el cosolvente, la interacción medida será favorable y se le conoce como unión preferencial. Este mecanismo generalmente está asociado a un incremento en el potencial químico de la proteína, lo cual es termodinámicamente desfavorable, sin embargo, la estabilización es consecuencia de la desestabilización del estado desnaturalizado por la presencia del cosolvente, lo cual conduce a un cambio mayor en el ΔG_{unf} [7].

Actualmente, se utiliza una amplia variedad de cosolventes con propiedades estabilizantes. La Tabla 1 muestra algunas categorías de estabilizadores de proteínas utilizados en el campo farmacéutico y de investigación. Estos cosolventes que también se denominan osmolitos o solutos compatibles, se utilizan en la naturaleza para elevar la presión osmótica del entorno celular y son compatibles con la función macromolecular y la viabilidad celular [7, 13].

Tabla 1. Categorías de estabilizadores de proteínas utilizados y su mecanismo de acción [17].

Categoría	Proteínas que estabilizan	Mecanismo de estabilización propuesto
Aminoácidos	BSA, lisozima, α -quimotripsinógeno, anticuerpos, proteína de unión al ácido retinoico celular	Hidratación preferencial
Polímeros	BSA, hexocinasa de levadura, insulina humana recombinante	Hidratación preferencial
Poliolés	β -lactoglobulina, Invertasa	Hidratación preferencial
Sales	Apoflavoxidina, proteína de cadena ligera amiloidogénica	Interacción preferencial
Azúcares	Ribonucleasa-A, BSA	Hidratación preferencial
Surfactantes	hGH, Albutropina, hemoglobina recombinante	Interacción preferencial

De acuerdo con un análisis realizado por Wlodarczyk y colaboradores (Wlodarczyk, 2018), los principales cosolventes utilizados son: sacarosa, manitol, aminoácidos, como la histidina y la glicina. Estos últimos generalmente actúan por hidratación preferencial [13, 14].

Los aminoácidos son ampliamente usados en formulaciones para biofármacos pues se ha visto que reducen la agregación proteica, además también pueden ser utilizados como agentes quelantes y para reducir la adsorción [18].

La glicina se utiliza principalmente como un sistema amortiguador de pH; en adición, se ha observado que su mecanismo de estabilización es mediante interacción preferencial [14, 15, 17].

Por otro lado, la histidina, al ser un aminoácido capaz de adquirir un protón, debido a la presencia del imidazol, tiene un papel importante en la modificación de interacciones hidrofóbicas, la auto asociación y la reducción de la viscosidad de las proteínas. De acuerdo a la literatura, esta propiedad se debe a las interacciones preferenciales de la histidina con las proteínas a través de su cadena lateral de imidazol [14, 17].

Los azúcares y polioles se utilizan frecuentemente para estabilizar muchas proteínas e inhibir su agregación, su efecto depende de la concentración. Sin embargo, se ha demostrado que es resultado de una hidratación preferencial. Una concentración de alrededor del 5% de estos cosolventes es la mínima sugerida para lograr una estabilización significativa de las proteínas. Además, estos co-solventes también pueden proteger a las proteínas de la degradación química [7, 13, 14].

De entre estos cosolventes, los carbohidratos protegen a las proteínas de la desnaturalización, su mecanismo se debe a que su presencia es termodinámicamente desfavorable, ya que el potencial químico (energía libre de Gibbs de ambas moléculas) aumenta. Por lo tanto, la exclusión de estas moléculas de la superficie de la proteína disminuye la actividad termodinámica y resulta en la estabilización de la macromolécula. Además, para estos cosolventes su tamaño influye en el efecto estabilizante, a mayor tamaño más efecto de estabilización [16-19].

De manera similar a los carbohidratos, los polioles previenen la desnaturalización. Por ejemplo, el glicerol ejerce su función mediante hidratación preferencial, sin embargo a concentraciones altas estos cosolventes pueden desnaturalizar a las proteínas [18].

Se ha demostrado que varios tipos de polímeros estabilizan las proteínas, esto generalmente se debe a una o más de estas propiedades de los polímeros: actividad superficial, exclusión preferencial, impedimento estérico de las interacciones proteína-proteína y aumento de la viscosidad que limita el movimiento estructural de las proteínas. La albúmina sérica se ha utilizado a menudo para la inhibición de la adsorción superficial de proteínas y estabilización en general. El efecto de los polímeros sobre la estabilidad de las proteínas depende en gran medida de las propiedades específicas de las proteínas a estabilizar. Los polímeros pueden estabilizar a las proteínas a través de múltiples interacciones electrostáticas [7].

Una de las principales causas de desestabilización de las proteínas es la oxidación de algunos aminoácidos como la metionina, histidina, lisina, triptófano, entre otros; por lo tanto, elegir un antioxidante adecuado es fundamental para mantener su estabilidad, el antioxidante más utilizado es el ácido ascórbico, aunque también se utilizan agentes quelantes como el EDTA o el ácido cítrico que secuestran a los iones metálicos [17, 20].

La tabla 2, muestra algunos de los principales cosolventes que se utilizan para estabilizar a las proteínas y las proporciones que se utilizan comúnmente.

Excipiente	Porcentaje	Fuente
Dextran	5%	[21, 22]
BSA	0.5-1%	[7, 22]
Ácido ascórbico	0.35%	[23]
Arginina	2%	[24]
D-glucosa	5%	[21, 22, 25, 26]
PEG*	2-4%	[7, 22]
Ácido cítrico	3.8%	[7]
Histidina	3%	[14]
Manitol	5-6%	[22, 27, 28]
Ciclodextrina	1-10%	[22, 24, 29]
Prolina	5-6%	[30, 31]
EDTA	0.03%	[7, 32]
Glicina	2-3.75%	[22, 33]
Sorbitol	5-9%	[7, 22]

*PEG 400, 3000, 3350, 20000. Son algunos de los tamaños que se utilizan en las formulaciones, pero su uso no se limita exclusivamente a estos.

Actualmente, el diseño de la formulación de biofármacos está impulsado en gran medida por el conocimiento y la experiencia previos, asistidos por una extensa caracterización analítica. La mayoría de los estudios analizan el efecto de los cosolventes individuales en una variedad de propiedades biofísicas. Aun cuando, la combinación de diferentes excipientes podría tener un efecto sinérgico, las formulaciones modernas tienden a mantener la composición lo más simple posible. Esto se debe principalmente al hecho de que realizar estudios de detección de un mayor número de combinaciones de excipientes puede no ser factible debido a la presión de tiempo inherente al desarrollo de fármacos. Por lo que promover el estudio de distintos cosolventes mediante la Simulación de Dinámica Molecular (SDM) para ampliar el conocimiento sobre su mecanismo de acción puede ser de utilidad [34].

3. Simulaciones de Dinámica Molecular (SDM)

Las simulaciones de dinámica molecular de sistemas biológicos complejos representan modelos estructurales en computadora, para tratar de simular teóricamente lo que sucede experimentalmente en diferentes escalas de tiempo. Las simulaciones pueden proporcionar información detallada sobre los movimientos de átomos en función del tiempo. Por lo general, se pueden utilizar para abordar preguntas específicas sobre las propiedades de un sistema, o tratar de explicar características experimentales de sistemas reales. Los experimentos tienen un papel esencial en la validación de la metodología de las SDM: las comparaciones de las SDM y datos experimentales ayudan a probar la precisión de los resultados calculados y proporcionar criterios para mejorar las metodologías [35, 36].

Todos los métodos de SDM clásicos se basan en aproximaciones empíricas denominadas campos de fuerza para calcular las interacciones y evaluar la energía potencial y cinética del sistema en función de coordenadas atómicas. Para la mayoría de los propósitos, estas aproximaciones funcionan bien, pero no pueden reproducir efectos cuánticos como la formación o ruptura de enlaces [37].

Los campos de fuerza comunes subdividen las funciones potenciales en dos clases. Las interacciones de enlaces cubren el estiramiento de enlaces covalentes, la flexión del ángulo, los potenciales de torsión cuando giran alrededor de los enlaces y los potenciales de "torsión impropia" fuera del plano, los cuales normalmente se fijan a lo largo de una SDM. Las interacciones restantes, en las que no se forma propiamente un enlace, consisten en repulsión y dispersión de Lennard-Jones, así como electrostática de Coulomb [37].

Existen tres tipos de aplicaciones de los métodos de SDM en el área macromolecular, así como en otras áreas que involucran sistemas mesoscópicos. La primera utiliza la SDM simplemente como un medio para muestrear el espacio de configuración. La segunda utiliza la SDM para obtener una descripción del sistema en equilibrio, incluidas las propiedades estructurales y de movimiento (por ejemplo, amplitudes de fluctuación cuadrática media atómica) y los valores de los parámetros termodinámicos. La tercera área utiliza SDM para examinar la dinámica real en sí [37].

El desarrollo de programas informáticos adecuados para realizar SDM es un proceso que requiere la inversión de tiempo, habilidades de personal especializado en diversas áreas y

financiamiento público y privado. Estos programas computacionales o “softwares” nos proporcionan resultados dinámicos del sistema simulado y proveen información necesaria sobre los atributos críticos del propio sistema [35].

Uno de estos softwares es Amber, el cual incluye la colección de numerosos programas que trabajan juntos para configurar, realizar y analizar las SDM, desde la preparación de los archivos de entrada necesarios, hasta el análisis de los resultados. También se refiere a una serie de campos de fuerza de la mecánica molecular clásica, diseñados principalmente para las simulaciones de biomoléculas. Adicionalmente, la paquetería de Amber contiene un software diseñado para parametrizar moléculas que actualmente no están presentes en las bibliotecas de campos de fuerza [35, 38].

Otro programa informático de utilidad es Packmol ya que facilita los pasos iniciales de la SDM.

3.1 Packmol

El primer paso en una SDM consiste en obtener las coordenadas iniciales de todos los átomos del sistema. La construcción de sistemas moleculares ordenados, como micelas, bicapas lipídicas o interfaces, requiere de muchos ensayos, manipulación de archivos, pequeños códigos ad hoc, etc., por lo tanto, los primeros pasos de la simulación resultan complicados y críticos [39].

El problema de construcción inicial puede tratarse como un problema de empaquetamiento. Las moléculas se empaquetan dentro de regiones espaciales con las características deseadas, de tal manera que los átomos de diferentes moléculas mantienen distancias acordes por pares. Packmol es un programa que puede empaquetar moléculas (u otros objetos definidos como grupos de puntos) restringidas a regiones del espacio cuyas formas están definidas por restricciones geométricas. Para esto se debe proporcionar las coordenadas de cada tipo de molécula a utilizar (formato PDB de la molécula) [39, 40].

Mediante un archivo de entrada (script), Packmol llena un cubo de tamaño definido por lado. Cada par de átomos de diferentes moléculas estará separado por, al menos, 2.0 Å, y las moléculas están distribuidas dentro del cubo. Pudiendo agregar moléculas de diferentes tipos mediante secciones adicionales del script y, dentro de cada estructura, se pueden establecer restricciones adicionales [39, 40].

Por lo tanto, Packmol es un programa robusto para empaquetar proteínas con diferentes moléculas; particularmente para nuestro proyecto resultó muy útil, ya que se han construido y utilizado con éxito pequeños sistemas compuestos por interfases, mezclas de varios componentes y proteínas solvatadas en SDM. Una vez realizada la SDM, los resultados se analizaron con los siguientes parámetros:

- Cálculo de Energía total (E_{Tot}): es la suma de las energías potenciales de todos los tipos. Es decir, la suma de las energías de enlace, ángulo, torsional y las no enlazantes (fuerzas de Van der Waals y de atracción-repulsión) [41].
- Cálculo de RMSD (Desviación de la raíz cuadrática media): es una medida estándar de distancia estructural entre coordenadas. Mide la distancia promedio entre un grupo de átomos. Si se calcula RMSD entre dos conjuntos de coordenadas atómicas, como dos puntos de tiempo de la trayectoria, el valor es una medida de cuánto ha cambiado la conformación de la proteína [42].
- Cálculo de ASAS (Área superficial accesible al solvente): es el área de superficie de una biomolécula que es accesible a un solvente. La medida de ASAS generalmente se describe en unidades de Ångstroms cuadrados (una unidad de medida estándar en biología molecular). Generalmente se calcula utilizando el algoritmo de "bola rodante" desarrollado por Shrake & Rupley en 1973. Este algoritmo usa una esfera de solvente de un radio particular para recorrer la superficie de la molécula [43].
- Visualización de los complejos
- Generación de mapas electrostáticos

La generación de mapas electrostáticos más que un cálculo, consiste en generar un potencial electrostático con la finalidad de comprender los primeros eventos de reconocimiento molecular donde dominan las interacciones intermoleculares de largo alcance y los efectos de la solvatación en los procesos biomoleculares.

3.2 Generación de mapas electrostáticos

Uno de los modelos de solventes implícitos más populares para biomoléculas se basa en la ecuación de Poisson-Boltzmann (PB). Esta proporciona una solución global para el potencial electrostático [44].

La teoría de PB es aproximada y, como resultado, tiene varias limitaciones conocidas que pueden afectar su precisión, particularmente para sistemas fuertemente cargados o que contienen altas concentraciones de iones. Sin embargo, el sitio web de APBS (<https://server.poissonboltzmann.org/>) permite la preparación de estructuras biomoleculares, APBS-PDB2PQR es la herramienta utilizada para el cálculo del potencial electrostático de biomoléculas [44].

Uno de los principales usos de las herramientas APBS es generar potenciales electrostáticos para su uso en software de visualización biomolecular (PYMOL). Además, este software se ha utilizado en los análisis energéticos posteriores a las SDM para la comprensión de las interacciones proteína-nanopartícula, de las interacciones ácido nucleico-ion, el acoplamiento biomolecular y la unión de ligandos [44]. Por lo antes mencionado, este software será una herramienta útil para la generación de mapas de potencial electrostático de las SDM a realizar.

En este trabajo se utilizó la SDM para tratar de explicar el tipo de interacciones entre los cosolventes y las proteínas utilizadas.

4. Hipótesis

El efecto estabilizante de los cosolventes utilizados, ya sean solos o en distintas combinaciones dependerá de las propiedades fisicoquímicas de estos, así como de las interacciones que sucedan con la proteína. La elección adecuada de los cosolventes mejorará la estabilidad y actividad de las proteínas en solución.

5. Objetivo principal

Estudiar a nivel molecular las interacciones de los principales cosolventes utilizados para estabilizar proteínas de interés biológico de manera experimental y teórica.

5.1 Objetivos particulares

- Realizar una búsqueda bibliográfica de los cosolventes más utilizados en la estabilización de proteínas.
- Purificar las enzimas *h*PTP1B y α -Glucosidasa, para obtener dos sistemas a estudiar con las matrices propuestas.
- Realizar ensayos de estabilidad utilizando las diferentes matrices de cosolventes en los dos sistemas enzimáticos.
- Modelar tridimensionalmente los diferentes sistemas enzima-cosolvente.
- Realizar estudios de SDM de los sistemas Enzima-Cosolvente.
- Analizar las trayectorias de SDM de los sistemas.

6. Materiales y métodos

6.1 Materiales

Todos los reactivos se adquirieron de la compañía Sigma Aldrich S.A. de C.V., México. Algunos de ellos son: albúmina sérica bovina (BSA), dextran, ácido cítrico, EDTA, ácido ascórbico, sorbitol, manitol, D-glucosa, L-histidina, cisteína, L-arginina, glicerol.

6.2 Métodos

6.2.1 Obtención de enzimas: α -glucosidasa y hPTP1B

Para la expresión de las proteínas α -glucosidasa y hPTP1B se utilizaron las células BL21 InvitroGen®, (Waltham, MA, USA) las cuales se transformaron con la variante correspondiente contenida en el plásmido pET28b. Las células se transformaron mediante choque térmico. Para ello se utilizaron 60 μ L de células quimio-competentes BL21(DE3), 1 μ L de plásmido pET28b-gen (60 ng/mL), se tomó un microlitro del plásmido y se mezcló con las células. Se incubaron a 42 °C durante 40 segundos, se colocaron en hielo durante 5 minutos y finalmente, se transfirieron a 300 μ L de medio LB para incubarlas durante una hora a 37 °C a 200 rpm. Transcurrido el tiempo de recuperación, se tomaron 30 μ L de las células y se colocaron en una caja Petri con medio agar LB con kanamicina (1 μ g/mL), se incubaron durante aproximadamente 12 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo se inoculó una colonia de la caja Petri y se transfirió a 10 mL de medio LB con kanamicina (1 μ g/mL), se incubó durante 12 h a 37 °C con una agitación de 250 rpm. Después se transfirió 1 mL del cultivo celular a un 1L de medio LB con kanamicina (1 μ g/ml) en un matraz de 2L, se incubó el matraz con las condiciones antes mencionadas (37°C de temperatura y una velocidad de agitación de 250 rpm). Se monitoreó la densidad óptica del cultivo y cuando ésta alcanzó una densidad óptica a 550 nm de entre 0.5-0.6 de absorbencia se adicionó 1 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Finalmente, se incubó el cultivo por 6 h en las mismas condiciones antes descritas.

Una vez transcurrido el tiempo para la sobreexpresión, se centrifugó el cultivo a 4500 rpm durante 15 minutos, posteriormente se resuspendió utilizando el buffer correspondiente para cada enzima (PBS 50 mM, pH 7.0 para α -glucosidasa y Tris-HCl 50mM pH 6.8 para hPTP1B) en un volumen aproximado de 20 mL. La suspensión se sonicó con un ciclo de 20 segundos de trabajo y 20 segundos de descanso en hielo para un total de 10 minutos de sonicación. Por último, se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm y se recolectó el sobrenadante. El sobrenadante se filtró utilizando un filtro con un tamaño de poro de 0.45 μ m

y se purificó con una columna de afinidad HisTrap[®], utilizando un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM. La pureza se siguió mediante ensayos de actividad.

Finalmente, las proteínas obtenidas, previo al proceso de liofilización, se realizaron 10 lavados con un filtro Amicon[®] de 30 kDa y agua destilada, se alicuotaron tubos con 500 μ L de las proteínas en cuestión y se congelaron durante 80 minutos en un ultra congelador a -80 °C (Revco, ThermoFisher[®]) posteriormente se liofilizaron las proteínas durante 6 horas.

6.2.2 Determinación de la concentración de α -glucosidasa y hPTP1B mediante el método de ácido bicinconínico (BCA)

El método de BCA es una técnica espectrocolorimétrica que tiene como principio la formación de un complejo de cobre-proteína mediante la reacción de Biuret, el producto es de color morado y absorbe a 562 nm. Para la determinación de la concentración de la proteína se preparó una solución de trabajo 1:50 de sulfato de cobre con BCA. Para la curva estándar se utilizó una solución de albúmina sérica bovina 1 mg/mL (BSA), el intervalo de concentración de la curva patrón fue de 10 a 100 μ g/mL y se determinó la concentración de las proteínas utilizando la ley de Lambert y Beer.

6.2.3 Ensayo de actividad

6.2.3.1 Ensayo de actividad de la hPTP1B utilizando pNPP como sustrato

Se realizaron ensayos de actividad de la hPTP1B utilizando para-nitrofenil fosfato (pNPP) como sustrato para determinar la actividad catalítica de la enzima en las diferentes matrices utilizadas. Se llevaron a cabo experimentos iniciales para establecer las condiciones adecuadas para los siguientes ensayos de actividad enzimática. La concentración óptima de sustrato y enzima se determinó probando diferentes concentraciones de cada uno. Los ensayos de actividad de pNPP se realizaron en un volumen final de 100 μ L de Tris-HCL 50 mM, pH 6.8, que contenía hPTP1B (78 ng/mL) y pNPP 0.5 mM. Las soluciones enzimáticas con los respectivos cosolventes que contenían pNPP se incubaron a 40 °C durante 20 min. La medición de absorbancia del producto de hidrólisis, que es p-nitrofenol (pNP), se realizó a los 20 min a 405 nm utilizando un lector de microplacas de 96 pocillos (Accuris, Benchmark Scientific, Inc.). Los valores de absorbancia se expresaron como concentración molar de producto usando un coeficiente de absortividad molar del pNP (18000 M⁻¹ cm⁻¹). Los experimentos se realizaron por triplicado.

6.2.3.2 Ensayo de actividad de la α -glucosidasa utilizando como sustrato PNPG

De la misma manera, se realizaron ensayos de α -glucosidasa utilizando 4-Nitrofenil- β -D-glucopiranosido (PNPG) como sustrato para determinar la actividad catalítica de la enzima en las diferentes matrices utilizadas. Se llevaron a cabo experimentos iniciales para establecer las condiciones adecuadas para los siguientes ensayos de actividad enzimática. La concentración óptima de sustrato y enzima se determinó probando diferentes concentraciones de cada uno. Los ensayos de actividad de PNPG se realizaron en un volumen final de 100 μ L de PBS pH 7.4, en microplacas de 96 pozos de la marca Corning® que contenía α -glucosidasa (171 ng/mL) y PNPG (1.0 mM). Las soluciones enzimáticas con los respectivos cosolventes que contenían PNPG se incubaron a 40 °C durante 20 min. La medición de absorbancia del producto de hidrólisis, que es el pNP, se realizó a los 20 min a 405 nm utilizando un lector de microplacas de 96 pocillos (Accuris). Los valores de absorbancia se expresaron como concentración molar de producto usando un coeficiente de absorptividad molar del pNP (18000 M⁻¹ cm⁻¹). Los experimentos se realizaron por triplicado.

6.2.4 Acoplamiento molecular proteína-proteína (Docking)

Se realizaron acoplamientos moleculares con BSA y los sistemas correspondientes (α -glucosidasa y hPTP1B) tomando como referencia un complejo de BSA con un fragmento Fab de anticuerpo (PDB 5FUO), el acoplamiento de la BSA, en ambos casos, se realizó lejos del sitio catalítico. Para realizar el acoplamiento molecular se utilizaron las estructuras tridimensionales obtenidas a partir del PDB (*Protein Data Bank*); para la proteína α -glucosidasa dimérica (6c9z.pdb), PTP1B (1t49.pdb) y para la albúmina sérica bovina (3v03.pdb). Utilizando el visualizador molecular PyMOL se situaron en un mismo plano de forma manual, posteriormente se utilizó el programa RosettaDock para ejecutar el acoplamiento molecular, eligiendo los complejos de menor energía, Anexo 2.

6.2.5 Preparación de los sistemas proteicos con cosolventes

Una vez realizado el acoplamiento molecular de ambos sistemas (α -glucosidasa y hPTP1B) con BSA, se realizó el empaquetamiento correspondiente dependiendo de la condición a simular. Para realizar el empaquetamiento se utilizó el programa *Packmol*, el cual coloca diferentes moléculas alrededor de las proteínas con la finalidad de neutralizar y agregar agua en el medio. El procedimiento consistió en reemplazar las moléculas de agua y de sodio que el programa coloca automáticamente, con los cosolventes que se requieren analizar. Simulando los porcentajes utilizados de manera experimental, se tomó como 100 %

las moléculas de agua colocadas por el programa de forma automática y se calculó el número de moléculas necesarias de cada cosolvente que se evaluaron de manera experimental. Una vez que se remplazaron las moléculas, se ejecutó el programa y se obtuvo el sistema proteína-cosolventes. Posteriormente se utilizó la utilería *LEap*, de la paquetería del programa Amber 2021, para agregar todos los hidrógenos de los aminoácidos, se neutralizó y se solvató el sistema utilizando aguas TIP3P. Se generaron los archivos necesarios para ejecutar la SDM.

6.2.6 Simulación de Dinámica Molecular (SDM)

Se realizaron las SMD correspondientes para la α -glucosidasa y para la *h*PTP1B utilizando el programa AMBER, a una presión de 1 atm, a 298.15 y a 277 K. Las SDM consistieron en una minimización de la estructura inicial, seguido de 50 ps de calentamiento desde 0 a 277.15 o 298.15 K, 50 ps para despresurizar el sistema, 500 ps para equilibrar y finalmente 50 ns de SDM.

6.2.7 Análisis de la dinámica molecular

Una vez que terminaron las SDM, se analizaron los sistemas utilizando el programa *cpptraj*, parte de la paquetería de AMBER, para realizar el cálculo de la desviación de la raíz cuadrática media (RMSD), y el área superficial accesible al solvente (ASAS), este último se restringió a los aminoácidos de la proteína. Por otro lado, se obtuvo la energía total de los sistemas, a partir de los archivos de salida de las trayectorias de la dinámica molecular. Todas las gráficas se realizaron en el programa ORIGIN 2018 64Bit.

Para visualizar las trayectorias se utilizaron los visualizadores moleculares PyMOL y VMD.

6.2.8 Construcción de mapas electrostáticos

Para la construcción de los mapas electrostáticos se utilizó la herramienta PDB2PQR del servidor APBS, utilizando las coordenadas de PDB de los sistemas (α -glucosidasa o *h*PTP1B), se fijó el pH en 7.0, se seleccionó el campo de fuerza AMBER, se descargó el archivo obtenido y se utilizó el programa PyMOL para visualizar el mapa electrostático generado.

7. Resultados y discusión

Para el diseño de las condiciones ensayadas se seleccionaron 12 de los cosolventes más utilizados en la estabilización de proteínas con los porcentajes reportados en la literatura. Se agruparon de acuerdo con la función que desempeñan como estabilizadores, obteniendo tres grupos y de cada grupo se seleccionó uno. Algunas condiciones se realizaron con uno o dos cosolventes, en total, se obtuvieron 23 condiciones que fueron ensayadas una vez por semana durante 8 semanas.

7.1 Sistema α -glucosidasa

Para este sistema se utilizó un total de 12 cosolventes diferentes enlistados en la tabla 3 y se formaron 23 matrices con condiciones diferentes mostradas en la tabla 4.

Tabla 3. Cosolventes utilizados para α -glucosidasa

Función	Tipo de cosolvente	Excipientes	% peso
Anti-adsorción	Polimeros	BSA	1
		Dextran	5
Protección contra oxidación	Antioxidantes	Ácido ascórbico	0.35
	Quelantes	EDTA	0.03
		Ácido cítrico	3.8
Estabilizantes	Aminoácidos	L-Arginina	2
		L-Histidina	3.1
		Glicina	4
	Carbohidratos	D-glucosa	5
		D-Manitol	5
		Polioles	D-Sorbitol
Glicerol	40		

Los cosolventes se eligieron de acuerdo con la función que cumplen de manera tal que cada matriz tuviera un polímero que evite la adsorción, un agente antioxidante y un estabilizante, ya sea un aminoácido, carbohidrato o poliol. Ya que la temperatura juega un papel fundamental en la estabilidad de las proteínas, todas las matrices se mantuvieron a 4°C, excepto 2 matrices: α -glucosidasa y α -glucosidasa con glicerol, esto con el fin de observar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. Entiéndase por matriz la combinación de la enzima correspondiente con los cosolventes seleccionados.

Tabla 4.1 Matrices de α -glucosidasa					
1	2	3	4	5	6
Dextran	Dextran	Dextran	BSA	BSA	BSA
Ac. Ascórbico	EDTA	Ac cítrico	Ac. Ascórbico	EDTA	Ac cítrico
D-glucosa	D-glucosa	D-glucosa	D-glucosa	D-glucosa	D-glucosa

Tabla 4.2 Matrices de α -glucosidasa					
7	8	9	10	11	12
Dextran	Dextran	Dextran	BSA	BSA	BSA
EDTA	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA
Arginina	Histidina	Glicina	Arginina	Histidina	Glicina

Tabla 4.3 Matrices de α -glucosidasa					
13	14	15	16	17	18
BSA	BSA	BSA	Sorbitol	Manitol	Arginina
Sorbitol	Manitol	Arginina			

Tabla 4.4 Matrices de α -glucosidasa				
19	20	21	22	23
Temperatura Ambiente	Glicerol	4°C	Glicerol a 4°	D-glucosa a 4°

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron con intervalos de 8 días durante 56 días con el propósito de cubrir un intervalo de tiempo razonable para determinar el efecto de los cosolventes en la actividad enzimática.

La Figura 5, muestra las tendencias de actividad en función del tiempo de todas las matrices experimentadas. En el anexo 1, tabla 1 se encuentran los datos obtenidos.

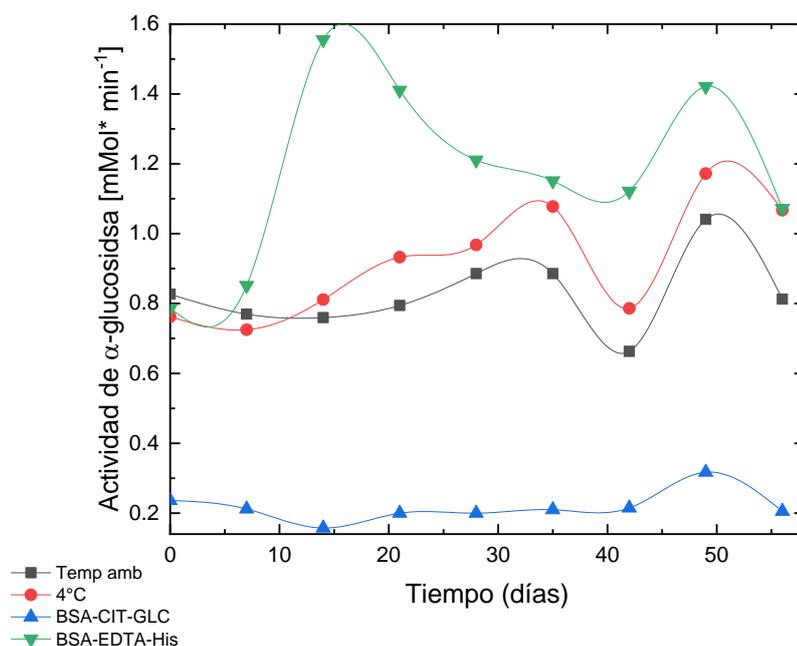


Figura 6. Combinaciones de cosolventes que presentaron mejor actividad (α -glu-BSA-EDTA-Histidina) y menor actividad (α -glu-BSA-CIT-GLC) en conjunto con las dos condiciones control (4°C y temperatura ambiente). Los datos utilizados para esta gráfica se encuentran en el anexo 1, tabla 2.

La Figura 6, muestra distintos datos importantes: 1) El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática, los cuadros negros corresponden al control a temperatura ambiente, mientras que los círculos rojos corresponde a la enzima que se almacenó a 4°C durante los 56 días, ambas líneas mantienen una tendencia similar, lo que nos indica que para este sistema la temperatura de almacenamiento no es un factor determinante en la conservación de la actividad enzimática, sin embargo, el almacenamiento a 4°C de esta enzima favorece el mantenimiento de la actividad enzimática. 2) Hay una gran diferencia en la actividad enzimática observada entre la matriz 11 (BSA-EDTA-His), y la matriz 6 (BSA-CIT-GLC) cuyos componentes son distintos y se desglosan a continuación.

Ambas matrices tienen como anti-adsorbante a la albúmina sérica bovina (BSA) que podría estar estabilizando a la proteína mediante interacción preferencial, impedimento estérico de la interacción proteína-proteína o un aumento en la viscosidad del medio. Ya que este cosolvente se encuentra en ambas matrices no se puede afirmar si favorece o desfavorece a la actividad enzimática. Por lo tanto, los otros cosolventes serían los posibles factores determinantes en la estabilidad de la proteína que se podría traducir en una actividad catalítica mayor o menor.

Para proteger a la proteína de una posible oxidación se utilizó EDTA, para la mejor matriz, y ácido cítrico, para la peor matriz, ambos actúan como agentes quelantes, sin embargo, la concentración necesaria de cada cosolvente para que ejerza su efecto estabilizante es distinta. Por un lado, la concentración requerida de EDTA es de 0.03%, mientras que la de ácido cítrico es de 3.8% lo cual podría resultar en un impedimento estérico o interacciones desfavorables con ciertas regiones de la proteína resultando en la disminución de la actividad.

Al igual que en la elección de agentes quelantes, el estabilizante para la matriz más favorable, BSA-EDTA-His, se requiere en una concentración menor (3.1%) en comparación con la matriz menos favorable, BSA-CIT-GLC, cuya concentración necesaria para ejercer su efecto es de 5%. Esto aunado a la diferencia estructural de los cosolventes seleccionados y a las distintas combinaciones de estos en cada matriz podrían estar influyendo en el tipo de interacciones que ocurren lo que se ve reflejado en el cambio de actividad enzimática.

Para tratar de entender a nivel molecular los posibles mecanismos que pueden estar influenciando la mayor o menor actividad enzimática se realizaron estudios de simulación de dinámicas moleculares (SDM) de ambas matrices.

La tabla 5, muestra el tiempo de super cómputo que se tomó realizar cada proceso de ambas matrices en supercomputo de la UNAM (Miztli).

Tabla 5. Tiempo de super cómputo utilizado

Proceso	Minimización	Calentamiento	Desprezurización	Equilibrio	Producción	Tiempo total [hrs]
4°C	0.01	0.11	0.09	0.87	33.81	34.89
¹ BSA-CIT-GLC	0.02	0.35	0.32	3.19	306.34	310.22
² BSA-ED-His	0.02	0.35	0.32	3.28	324.55	328.52

¹BSA: albúmina sérica bovina, CIT: citrato, GLC: D-glucosa

²ED: EDTA, His: L-histidina

Para las SDM el tiempo se definió tomando en cuenta los siguientes factores:

- 1.- La energía total del sistema en función del tiempo es estable en los 50ns.
- 2.- El tiempo de cómputo que se designó para el proyecto.

3.- Se realizaron SDM de 200ns y después de los 50 ns no se observó un cambio importante en el sistema.

La energía total del sistema (E_{Tot}), la desviación de la raíz media cuadrada (RMSD), y el área superficial accesible al solvente (ASAS) son los parámetros que se obtuvieron de las SDM, además de imágenes tridimensionales de los complejos al inicio y al final de la SDM. Adicionalmente, se generaron mapas electrostáticos de las enzimas con el objetivo de relacionar las cargas parciales del sistema.

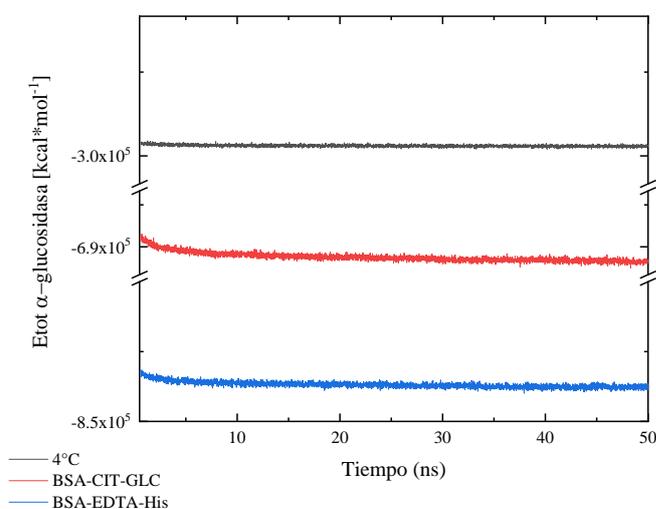


Figura 7. Efecto en la energía total de los sistemas que presentaron mayor (BSA-EDTA-His) y menor (BSA-CIT-GLC) actividad en conjunto con la α -glucosidasa a 4 °C.

La Figura 7, muestra la E_{Tot} del sistema en función del tiempo. En términos energéticos, menor E_{Tot} , mayor estabilidad, haciendo correlación entre la estabilidad y la actividad enzimática, se podría esperar mayor actividad, esto se cumple para la matriz 11 (BSA-EDTA-His), línea azul, la cual tiene una E_{Tot} menor en comparación con la matriz que solamente tiene α -glucosidasa y con la matriz que contiene BSA-CIT-GLC, 5 y 2 veces menor respectivamente

Por otro lado, en términos de E_{Tot} la α -glucosidasa con la matriz BSA-CIT-GLC (línea roja) es más estable que la enzima almacenada a 4°C, esto debido al aumento de interacciones de la proteína con los cosolventes lo cual, en la SDM, contribuye en el cálculo de energía total. Sin embargo, su actividad enzimática es menor.

Con respecto a la α -glucosidasa a 4°C (línea negra), es el sistema con mayor E_{Tot} , es decir, es el más inestable en términos de energéticos (Figura 7), aunque su actividad a lo largo del tiempo fue mayor (Figura 6) en comparación con la enzima en la matriz 6 (BSA-CIT-GLC).

Por lo tanto, la actividad enzimática probablemente no sólo es consecuencia de la estabilidad del sistema (E_{Tot}), si no que involucra otros componentes como interacciones electrostáticas, movimientos brownianos, temperatura entre otros.

Adicionalmente a la E_{Tot} , se calculó la RMSD a partir de las trayectorias de las SDM con respecto a las coordenadas del paso de equilibrio del sistema correspondiente (Figura 8). Este parámetro es un reflejo de la estabilidad estructural en función del tiempo, se calculó considerando únicamente los átomos de la cadena principal, es decir, carbono α , nitrógenos y el carbono del carboxilo. (Anexo 3)

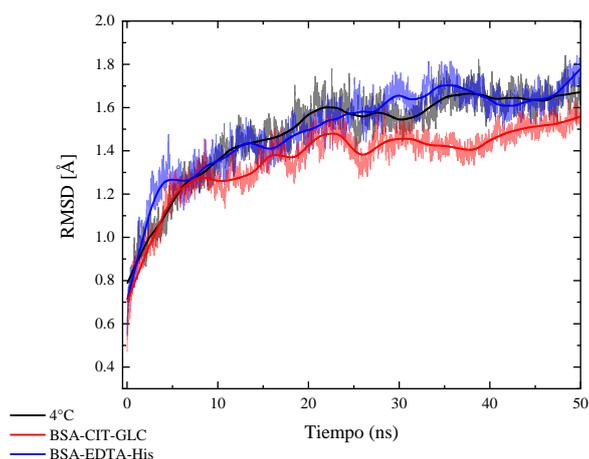


Figura 8. Cambio en la conformación de la α -glucosidasa a 4°C y en presencia de las matrices con menor (BSA-CIT-GLC) y mayor actividad (BSA-EDTA-His) durante los 50ns de SDM.

Comparando los valores de ambas matrices (6 y 11), la matriz 6 (BSA-CIT-GLC) presenta ligeramente un valor menor de RMSD lo que se puede traducir en una disminución del movimiento de todos los átomos durante los 50ns de la SDM, esto podrá deberse a las interacciones de la proteína con los cosolventes.

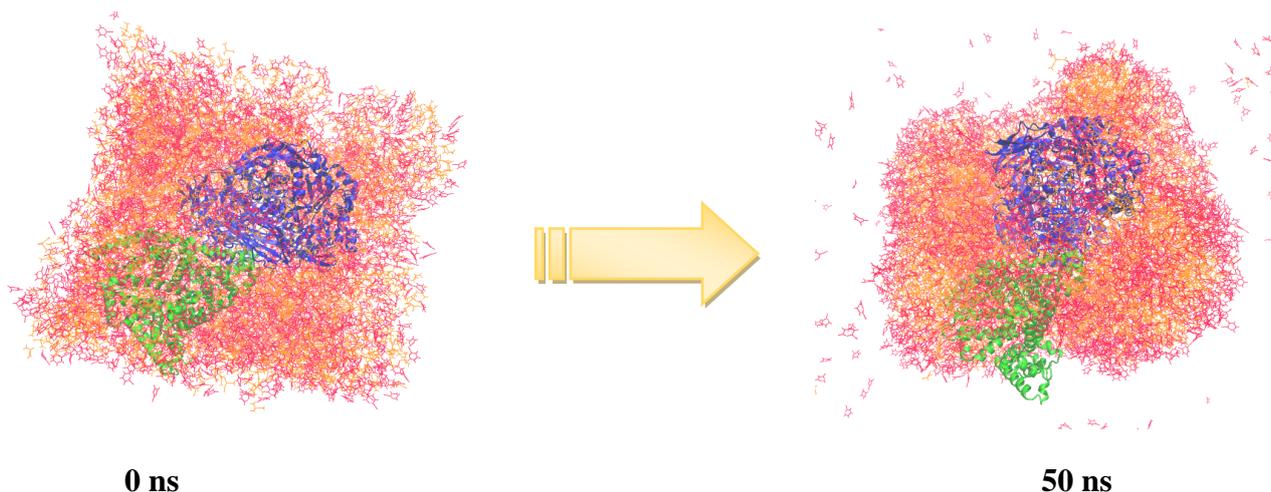


Figura 9. Estructuras tridimensionales de la SDM de 50 ns de α -glucosidasa-BSA-CIT-GLC a 4°C. La α -glucosidasa es representada en color azul, la BSA en color verde, el ácido cítrico en líneas amarillas y la D-glucosa en líneas rojas. Para ver el video de la SDM visítarla siguiente liga: <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-paulina/AGLU-BSA-CIT-DEX.mp4>

La Figura 9, muestra las estructuras tridimensionales del sistema α -glucosidasa-BSA-CIT-GLC a 0 y 50 ns de SDM, donde podemos apreciar las interacciones de los cosolventes con el complejo enzima-BSA a nivel molecular. Para este sistema se puede observar que las moléculas de D-glucosa rodean a las moléculas de ácido cítrico y estas a su vez están interaccionando con el complejo α -glucosidasa-BSA de una manera homogénea.

Estas interacciones podrían impedir el paso del sustrato al sitio activo por lo que la pérdida de actividad de la enzima con esta matriz no necesariamente está relacionada con una pérdida de estructura, es probable que la accesibilidad al sitio activo esté influyendo en la actividad enzimática, la Figura 10 muestra el sitio activo de la α -glucosidasa.

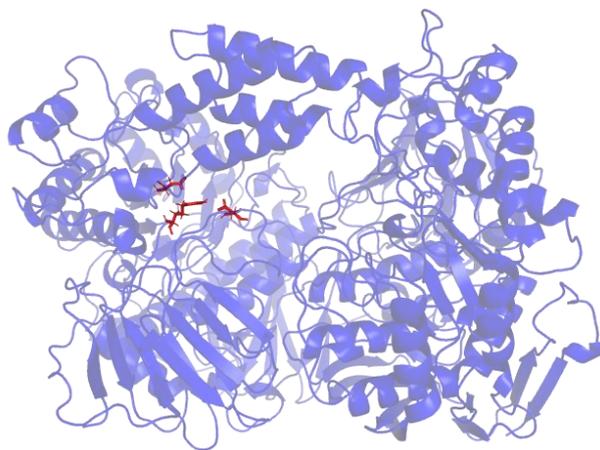


Figura 10. Sitio activo de α -glucosidasa. En cartoons azules con transparencia se muestra la enzima α -glucosidasa y en stickers rojos los aminoácidos correspondientes al sitio catalítico: Asp-307, Arg-404, Asp-420

Una manera de comprobar la accesibilidad al sitio activo es con el cálculo del área superficial accesible al solvente, ASAS, este cálculo se realizó para toda la proteína. La Figura 11 muestra la diferencia de ASAS entre la α -glucosidasa sin cosolventes y la matriz 6.

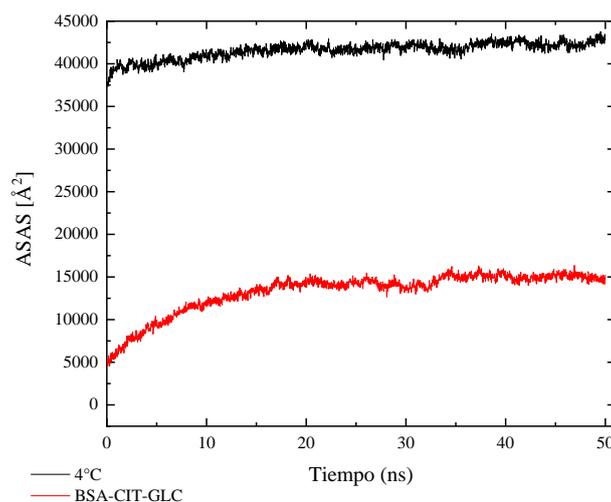


Figura 11. Comparación del área superficial accesible al solvente entre la α -glucosidasa a 4°C (color negro) y la matriz con menor actividad (BSA-CIT-GLC, color rojo) durante los 50 ns de SDM.

La Figura 11, ilustra la diferencia de áreas accesibles al solvente entre la enzima sin cosolventes (40000 \AA^2) y la matriz 6 (15000 \AA^2), de manera tal que la accesibilidad al interior de la proteína se ve limitada por las interacciones de los cosolventes con la superficie de la proteína. Un punto para resaltar es el tipo de interacciones que podrían estar ocurriendo, pues la naturaleza de estas puede favorecer o entorpecer la reacción enzimática por lo que es fundamental intentar esclarecer las interacciones que podrían estar participando.

Uno de los principales elementos de interacción entre las proteínas y los cosolventes son las interacciones electrostáticas, por lo que se calculó el mapa del potencial electrostático de la enzima α -glucosidasa (Figura 12). De este mapa se observa: 1) La mayoría de la superficie de la proteína es principalmente negativa, 2) El citrato y la D-glucosa están interaccionando estrechamente entre ellos, la D-glucosa está rodeando al citrato lo que puede ser consecuencia de interacciones electrostáticas débiles y fuerzas de Van der Waals. Además, la molécula de D-glucosa es la que interactúa principalmente con la proteína, esto puede deberse a que exista cierta repulsión electrostática entre el citrato y la proteína, como se observa en la Figura 12, el citrato interactúa con la proteína en regiones cercanas a potenciales electrostáticos neutros, lo cual es congruente con la teoría de repulsión entre la proteína y el citrato.

Por otra parte, es probable que las interacciones entre ambos cosolventes creen microambientes desfavorables para la α -glucosidasa y resulte en una flexibilidad limitada, o en un impedimento estérico para que el sustrato llegue al sitio catalítico; lo primero puede estar asociado con la estabilidad estructural y lo segundo podría afectar a la actividad enzimática. Lo anterior concuerda con lo obtenido en el cálculo del ASAS (Figura 11).

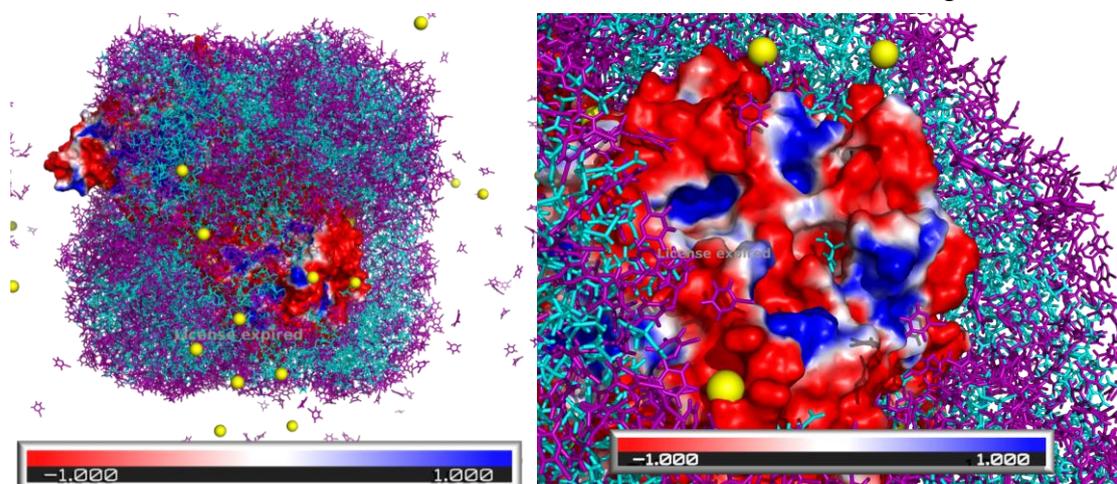


Figura 12. Mapa electrostático del complejo α -glucosidasa-BSA-CIT-GLC en 50 ns de la SDM, la escala de -1 a 1 es la medida de potencial electrostático y se mide en Coulombs. En el mapa electrostático se incluyó la albúmina por lo que su estructura no se distingue. En líneas azules se representa el ácido cítrico y la D-glucosa en líneas moradas y las esferas amarillas corresponden a iones potasio que coloca el programa Amber para neutralizar el sistema.

En contraste con la matriz 6, la matriz número 11 (α -glucosidasa-BSA-EDTA-His) presenta un cambio notable en el reacomodo de los cosolventes después de los 50 ns de SDM (Figura 13), lo que probablemente es consecuencia de las interacciones que se dan entre las

moléculas de L-histidina con la α -glucosidasa y con la albúmina. Se observan dos micelas de L-histidina-EDTA bien definidas en diferentes regiones del complejo proteico.

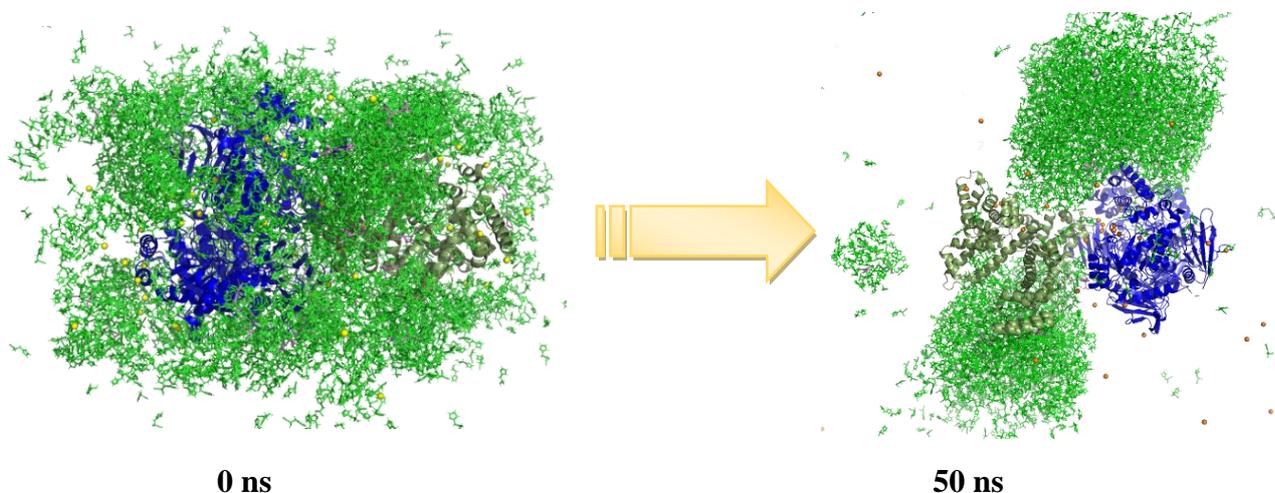


Figura 13. Estructuras tridimensionales de la SDM de 50 ns de α -glucosidasa-BSA-EDTA-His a 4°C. La α -glucosidasa es representada en color azul, la BSA en color verde, el EDTA en líneas lilas y la L-histidina en líneas verdes. Para ver el video de la SDM visítarla siguiente liga: <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-paulina/AGLU-BSA-EDTA-HIS.mp4>

Consecuencia del reacomodo de los cosolventes, para esta matriz (BSA-EDTA-HIS) se observa, en la Figura 14, un área accesible al solvente de 30 mil Å^2 , comparado con los 40 mil Å^2 que presenta la enzima sin cosolventes. Además, el ASAS de esta matriz es mayor que el ASAS de la matriz BSA-CIT-GLC (15000 Å^2). Esto puede relacionarse con una mayor facilidad del sustrato para interactuar con el sitio activo y poder llevar a cabo la catálisis enzimática ya que los cosolventes interactúan menos con la superficie de la proteína. Por lo tanto se puede especular que estas interacciones favorecen a la estabilidad de la enzima y a la actividad enzimática.

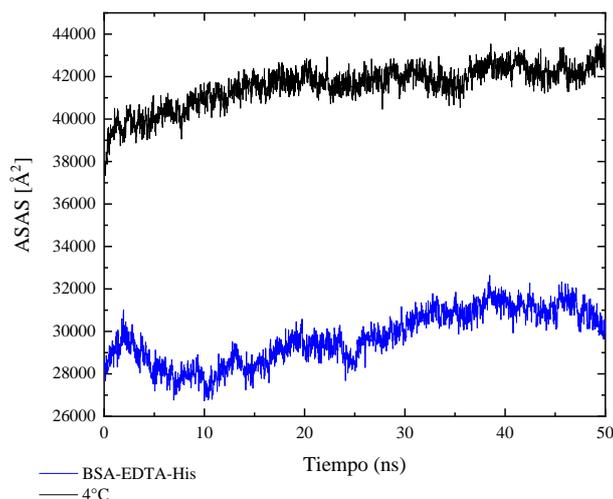


Figura 14. Comparación del área superficial accesible al solvente entre la α -glucosidasa a 4°C (color negro) y la matriz con mayor actividad (BSA-EDTA-His, color azul) durante los 50 ns de SDM.

Una de las principales interacciones entre las proteínas y los cosolventes son las interacciones electrostáticas, por lo que se calculó el mapa del potencial electrostático de la enzima α -glucosidasa (Figura 15).

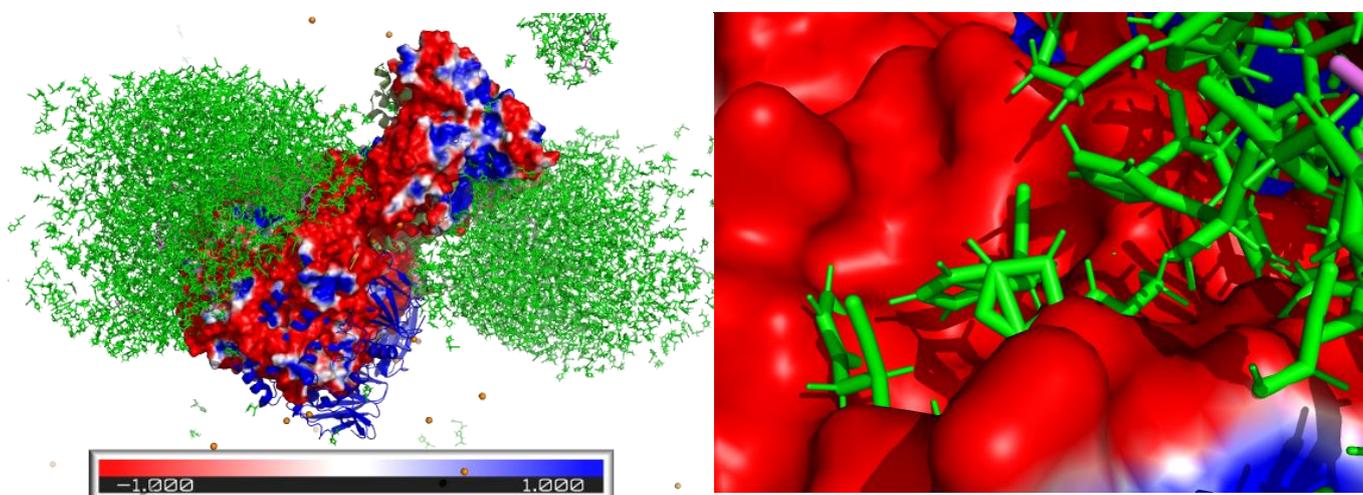


Figura 15 Mapa electrostático del complejo α -glucosidasa-BSA-EDTA-His. Las líneas de color verde representan la L-histidina y las líneas lilas son EDTA. En el mapa electrostático se incluyó la albúmina por lo que su estructura no se distingue. La escala de -1 a 1 es la medida de potencial electrostático y se mide en Coulombs.

En esta figura se observa que las interacciones proteína-cosolvente se forman tanto en regiones con potencial electrostático negativo y positivo, pues la L-histidina no posee una carga total, este cosolvente podría estabilizar a esta enzima mediante el mecanismo de unión preferencial, en particular por interacciones electrostáticas, por otra parte, las interacciones

repulsivas que pueden darse entre las moléculas de L-histidina probablemente se ven atenuadas por la presencia del agua entre ellas.

Tabla 6. Matrices para la α -glucosidasa

24	25	26	27	28	29	30	31
BSA	EDTA	His	BSA-EDTA	BSA-His	EDTA-His	BSA-EDTA-His	α -glucosidasa

Con la finalidad de ampliar el entendimiento de la acción de los tres cosolventes se realizó una segunda introspección experimental de cada cosolvente de la matriz 11 (BSA-EDTA-His), se realizaron nuevas matrices (Tabla 6).

Las matrices se almacenaron a 4 °C y se monitorearon durante 20 días, se realizaron 3 réplicas de cada matriz con la finalidad de comprobar la reproducibilidad del experimento, los resultados se observan en la Figura 16.

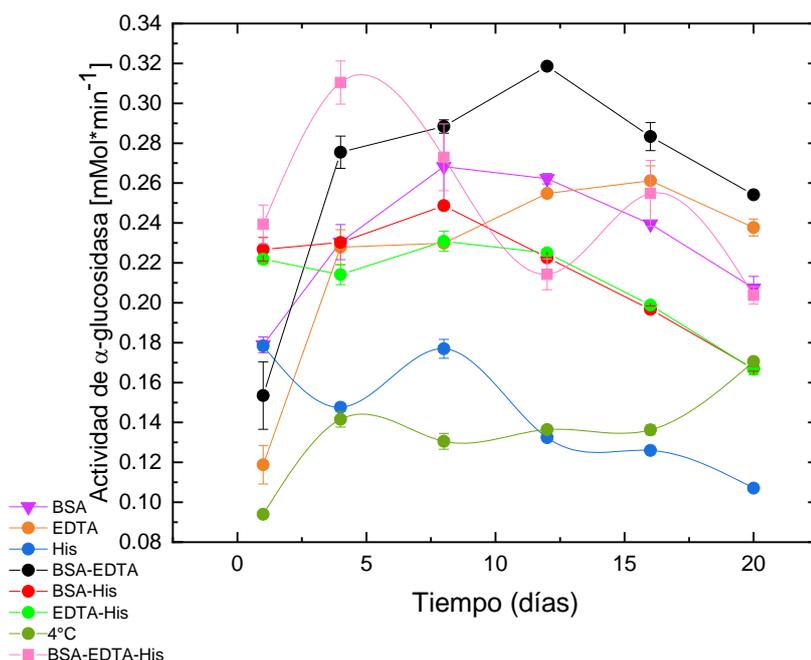


Figura 16. Influencia de los cosolventes utilizados en la matriz que presentó mayor actividad enzimática para la α -glucosidasa, solos y en sus distintas combinaciones.

Se observa la actividad enzimática en función del tiempo de las 7 matrices y la α -glucosidasa sin cosolventes (Figura 16), de estos resultados podemos resaltar lo siguiente: 1)

La combinación de los tres cosolventes no fue la que presentó mejor actividad a lo largo del tiempo; 2) De manera general la combinación BSA-EDTA presentó la mayor actividad en función del tiempo, 3) la α -glucosidasa en presencia únicamente de L-histidina tiene una menor actividad enzimática.

La Figura 17, muestra la comparación entre la actividad de la α -glucosidasa únicamente, con los cosolventes solos y con las distintas combinaciones de los tres cosolventes.

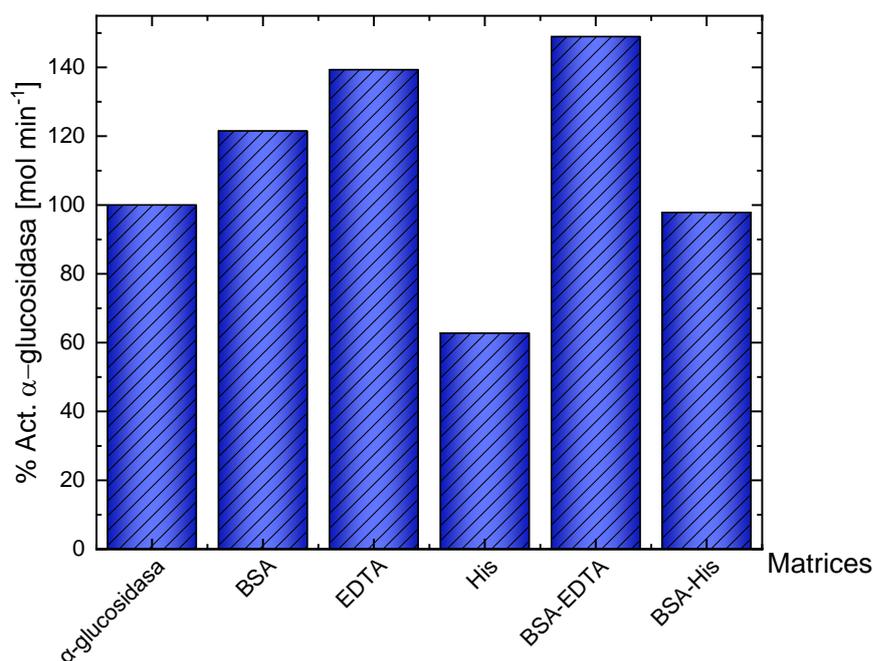


Figura 17. Porcentaje de actividad enzimática de la α -glucosidasa sola (100% de actividad) y en presencia de los distintos cosolventes y sus combinaciones.

La gráfica se realizó calculando el porcentaje de la actividad enzimática obtenida en el último día del ensayo de cada matriz, tomando como 100% la α -glucosidasa es decir

$$\% \text{ de Act} = (\text{ActMatrizX} * 100) / \text{Act}\alpha\text{-glucosidasa}$$

La presencia de L-histidina no es favorable para mantener la actividad de la enzima (Figura 16 y 17), ya que se presenta una pérdida de la actividad enzimática en presencia de este aminoácido solo y en combinación con BSA y EDTA, así como en la matriz compuesta

por los tres cosolventes pues presenta una menor actividad que la matriz compuesta únicamente de BSA-EDTA.

Para complementar y tratar de explicar los resultados experimentales se realizaron SDM de las 6 matrices, se obtuvieron y analizaron los parámetros de E_{Tot} , RMSD y ASAS.

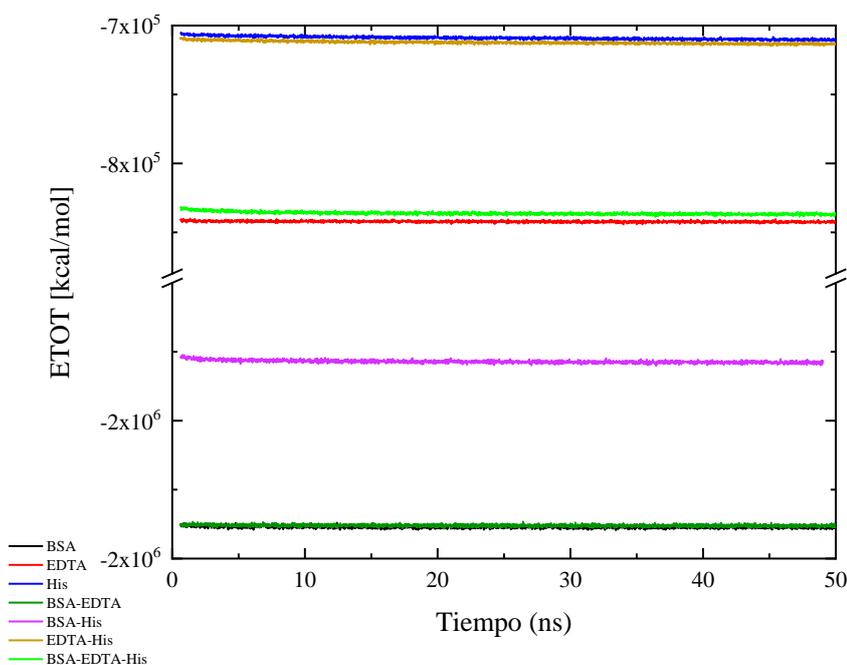


Figura 18. Efecto en la energía total de cada cosolvente con α -glucosidasa y las distintas combinaciones de cosolventes con α -glucosidasa.

La Figura 18, ilustra la E_{tot} de las matrices 11, 24 a 29, de igual manera que en la primera etapa, la menor E_{tot} coincide con la matriz que presenta mayor actividad (BSA-EDTA), mientras que la matriz con mayor E_{tot} , (His), es la que tiene menor actividad en función del tiempo. Lo cual podría estar directamente relacionado con la estabilidad de la enzima.

Además, la E_{tot} de la combinación de los tres cosolventes es mayor (-8×10^5 kcal \cdot mol $^{-1}$) que la E_{tot} de la combinación de BSA-EDTA (-2×10^6 kcal \cdot mol $^{-1}$); lo cual refuerza que la presencia de L-histidina no favorece a la estabilidad del sistema. Por último, las matrices con mayor E_{tot} , α -glucosidasa-His y α -glucosidasa-EDTA-His, son matrices que presentan menor actividad enzimática (Figura 16) en comparación con la combinación de los tres cosolventes.

La Figura 19, muestra la RMSD en función del tiempo a partir de las coordenadas del paso de equilibrio del sistema correspondiente.

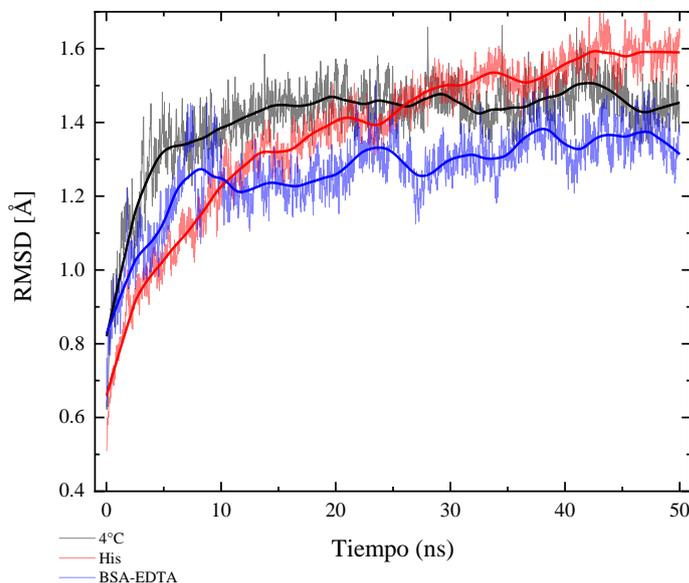


Figura 19. Cambio en la conformación de la α -glucosidasa a 4°C y en presencia de las matrices con menor (HIS) y mayor actividad (BSA-EDTA) durante los 50ns de SDM.

Contrario a lo obtenido en el primer cálculo de RMSD (Figura 8), de esta gráfica se observa que la matriz que presenta mayor actividad (BSA-EDTA, línea azul), tiene ligeramente un menor movimiento de todos los átomos a lo largo de la SDM.

Mientras que la matriz con His, (línea roja) tiene ligeramente mayor movimiento y E_{tot} pero menor actividad enzimática, lo cual podría indicar que las interacciones cosolvente-proteína son desfavorables, tanto para la estabilidad del sistema como para la actividad enzimática.

Además del análisis de RMSD, en la Figura 19 se ilustra el ASAS de la α -glucosidasa sin cosolventes y en combinación con His y BSA-EDTA.

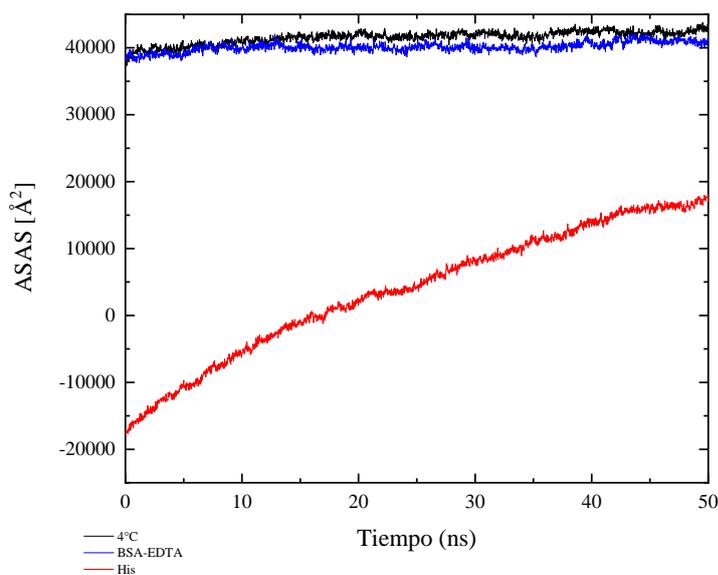


Figura 20. Comparación del área superficial accesible al solvente entre la α -glucosidasa a 4°C (color negro), la matriz con mayor (BSA-EDTA, color rojo) y con menor actividad (His, color azul) durante los 50 ns de SDM.

La Figura 20, muestra el ASAS en función del tiempo, entre las matrices de mayor y menor actividad y la α -glucosidasa sin cosolventes. De la misma manera que sucedió para la matriz BSA-CIT-GLC, el ASAS de la matriz con His es menor, esto sugiere que la accesibilidad al sitio activo podría verse limitada o desfavorecida como consecuencia de las interacciones de la L-histidina con la enzima.

Adicional al área accesible al solvente, también calculamos el radio de giro (R_g) de α -glucosidasa, el cual es un parámetro que indica la elongación o compactación proteica a lo largo del tiempo, la Figura 21 muestra el cambio en el radio de giro en función del tiempo de α -glucosidasa, α -glucosidasa-BSA-EDTA y α -glucosidasa-His.

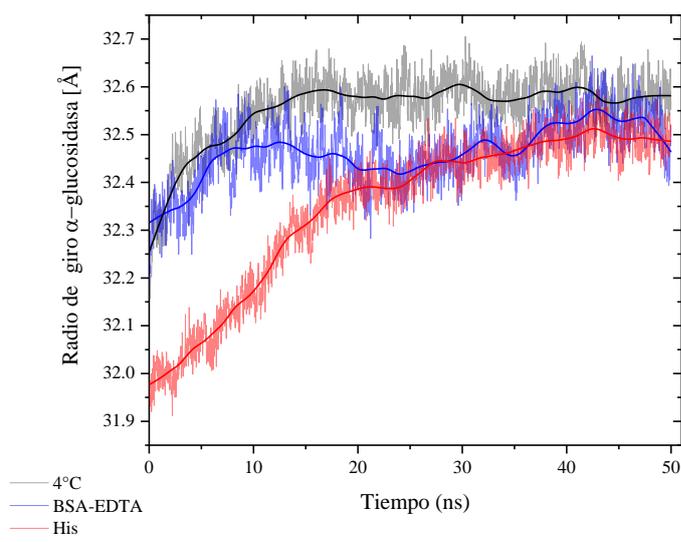


Figura 21. Comparación del radio de giro entre la α -glucosidasa a 4°C (color negro) y las matrices que presentaron mayor (BSA-EDTA, color rojo) y menor actividad (His, color azul).

Se muestran los radios de giro de los tres sistemas, de esta figura se observa 1) El radio de giro en función del tiempo entre la α -glucosidasa y α -glucosidasa-BSA-EDTA tiene una trayectoria similar, aunque es menor en presencia de los cosolventes. 2) El radio de giro de la matriz que presentó menor actividad (α -glucosidasa-His) es menor en comparación con los otros dos sistemas y tiene una trayectoria creciente, lo cual indica una elongación proteica a lo largo de la SDM y es congruente con el resultado obtenido en el cálculo de RMSD. Esto junto con los resultados hasta ahora obtenidos (mayor E_{tot} , y menor ASAS) podría indicar que la actividad disminuye debido a que la reacción de catálisis se ve impedida por la accesibilidad del sustrato al sitio activo. 3) Por otra parte el radio de giro de la matriz que contiene BSA-EDTA presenta una trayectoria menos fluctuante y más parecida con la trayectoria de la α -glucosidasa sola. En conjunto con los demás resultados (menor E_{tot} y mayor ASAS) podría explicar porque presenta una mejor actividad enzimática a lo largo del tiempo.

Ya que la actividad enzimática se ve influenciada no solamente por el movimiento proteico, sino también por todas las interacciones que podrían suceder, intentar elucidar la naturaleza de éstas es fundamental, pues el tipo de interacción podría dictar la disponibilidad de la proteína de poder interactuar con distintas moléculas, en este caso el sustrato.

La Figura 22, muestra el complejo de α -glucosidasa-BSA-EDTA al principio de la SDM (0 ns) y transcurridos los 50 ns de la SDM, para este proceso se le agregó al sistema el sistema amortiguador correspondiente, en este caso los fosfatos.

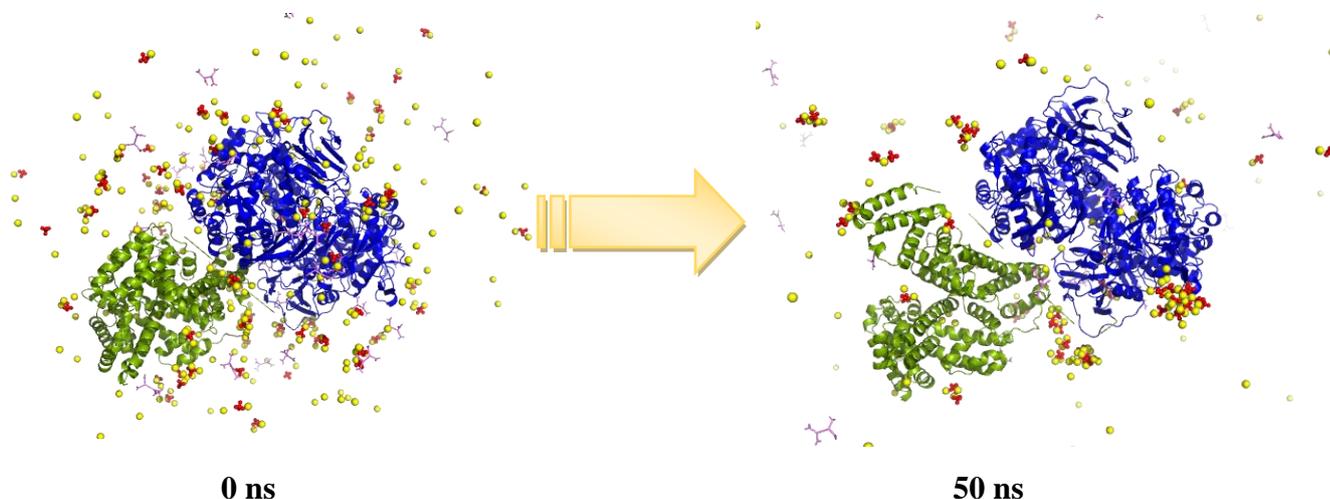


Figura 22. Estructuras tridimensionales de la SDM de 0 y 50 ns de α -glucosidasa-BSA-EDTA a 4°C. La α -glucosidasa es representada en color azul, la BSA en color verde, el EDTA en líneas moradas, de color rojo los iones fosfato y de color amarillo los iones potasio. Para ver el video de la SDM visitar la siguiente liga: <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-paulina/AGLU-BSA-EDTA.mp4>

Se ilustra el cambio del complejo después de los 50 ns de SDM, de acuerdo con la SDM se observa que hay pocas interacciones de los cosolventes con el complejo proteico, lo que corresponde con el resultado del ASAS; de tal manera que la forma en la que se podría favorecer la estabilidad de la enzima es disminuir las interacciones desfavorables de la proteína con el solvente.

En el mapa electrostático de la Figura 23 se observa que la superficie de la BSA posee regiones negativas, positivas y neutras, por lo que la interacción con la enzima podría estabilizarla y disminuir las interacciones desfavorables entre las mismas moléculas de proteína presentes en el solvente.

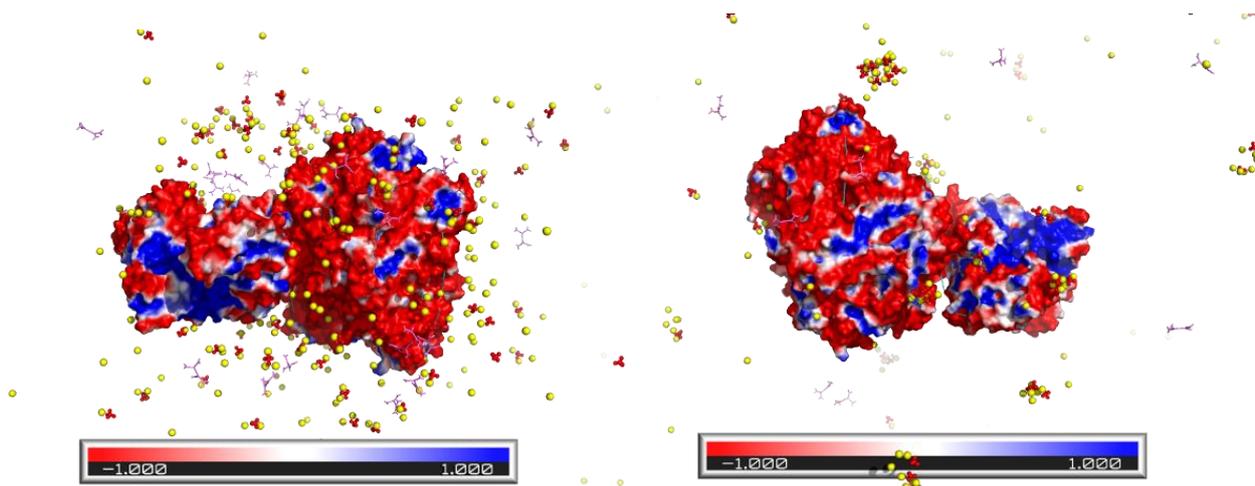


Figura 23 Mapa electrostático del complejo α -glucosidasa-BSA-EDTA. La BSA forma parte del mapa electrostático, el EDTA está representado en líneas moradas, de color rojo los iones fosfato y de color amarillo los iones potasio. La escala de -1 a 1 es la medida de potencial electrostático y se mide en Coulombs.

Por otro lado, en la figura 24 se observa el cambio de la matriz α -glucosidasa con L-histidina, a diferencia de la matriz que presenta mejor actividad (BSA-EDTA), este complejo tiene una mayor interacción cosolvente-proteína. Estas interacciones podrían estar interfiriendo con la accesibilidad del sustrato al sitio activo y a su vez con la reacción química.

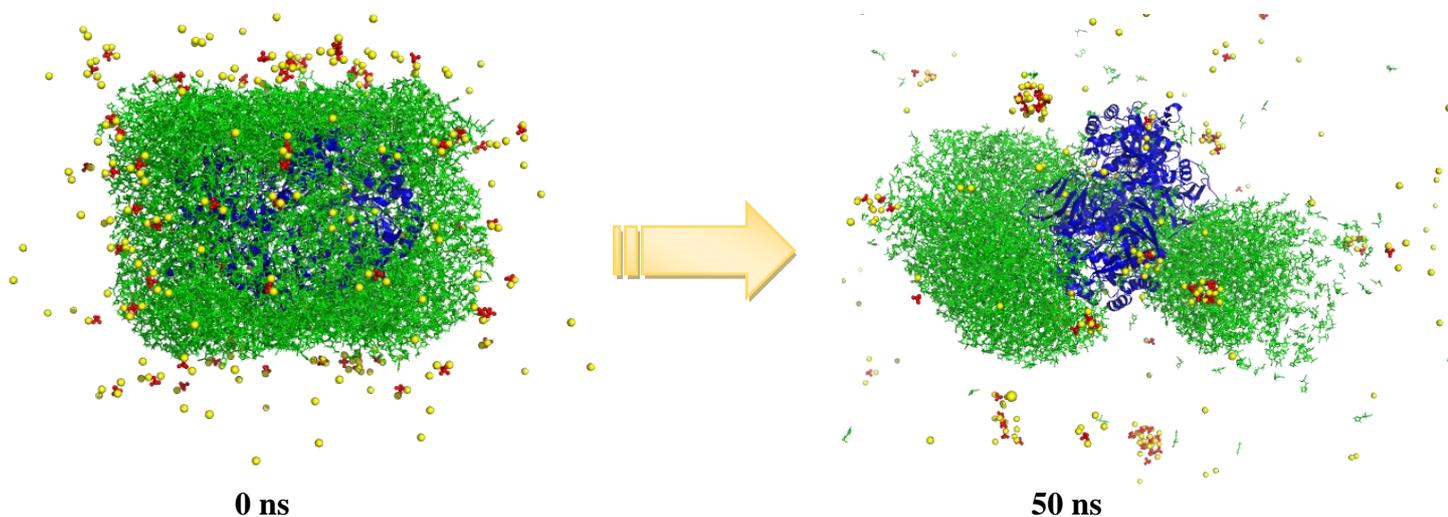


Figura 24. Estructuras tridimensionales de la SDM de 50 ns de α -glucosidasa-His a 4°C. La α -glucosidasa es representada en color azul, la L-histidina de color verde, de color rojo los iones fosfato y de color amarillo los iones potasio. Para ver el video de la SDM visitar la siguiente liga: <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-paulina/AGLU-HIS.mp4>

En la Figura 25, se observa el mapa electrostático del complejo α -glucosidasa-Histidina, esta molécula interacciona principalmente con las zonas cuyo potencial

electrostático es negativo, si bien las interacciones pueden estabilizar a la proteína, es probable que limiten el acceso del sustrato al sitio activo, resultando así en una disminución de la actividad enzimática.

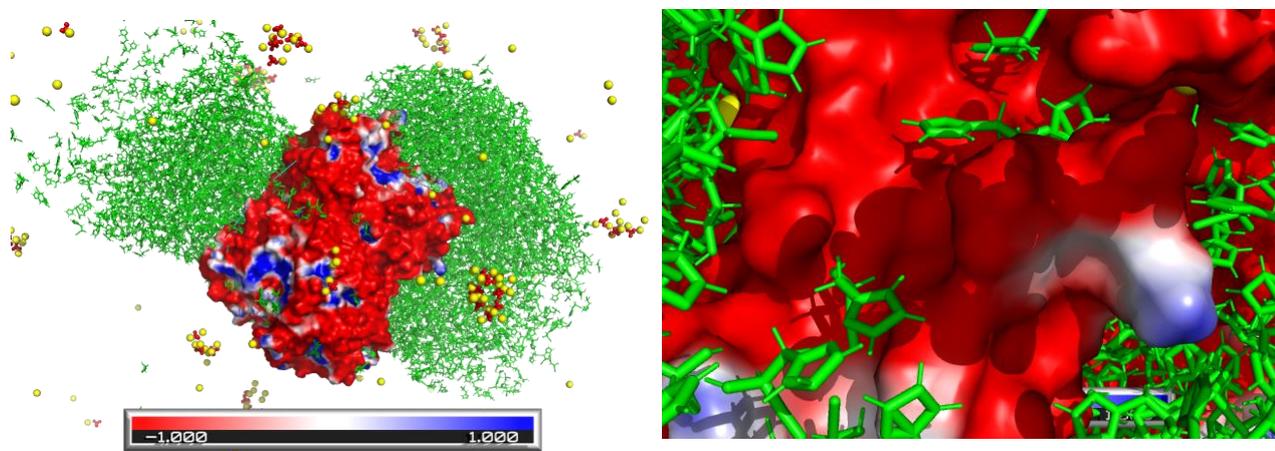


Figura 25. Mapa electrostático del complejo α -glucosidasa-His. L-histidina de color verde, de color rojo los iones fosfato y de color amarillo los iones potasio. La escala de -1 a 1 es la medida de potencial electrostático y se mide en Coulombs.

Con la finalidad de realizar un estudio más detallado para tratar de explicar el efecto de los cosolventes en la actividad enzimática se analizó el sitio activo de la enzima, para lo cual se alineó la estructura de la enzima sin cosolventes a los 0, 20 y 50 ns así como de las dos matrices (anexo 5). La Figura 26, muestra la comparación de tres aminoácidos del sitio catalítico entre los tres sistemas utilizados, α -glucosidasa, α -glucosidasa-His y α -glucosidasa-BSA-EDTA.

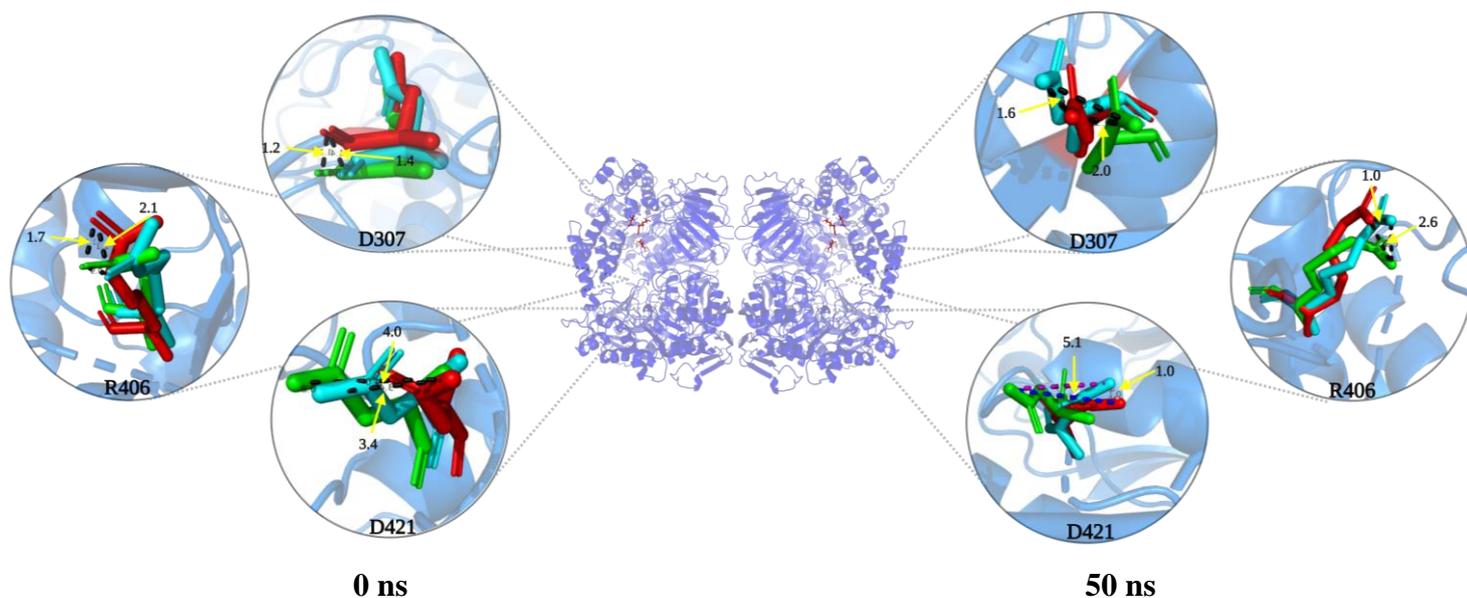


Figura 26. Aminoácidos correspondientes al sitio activo de α -glucosidasa (rojo) alineados con los sistemas α -glucosidasa-His (cyan) y α -glucosidasa-BSA-EDTA (verde), los aminoácidos de lado izquierdo corresponden al inicio de la SDM mientras que los aminoácidos de lado derecho son transcurridos los 50 ns de SDM. Las flechas amarillas y los números hacen alusión a la distancia que hay entre los átomos de cada aminoácido de α -glucosidasa y las dos matrices utilizadas.

La tabla 7 enlista las distancias entre cada aminoácido de la α -glucosidasa y la α -glucosidasa en presencia de los distintos cosolventes.

Tabla 7. Distancias [\AA] entre átomos de los aminoácidos comparando la α -glucosidasa con la matriz correspondiente				
	α -glucosidasa- BSA-EDTA (mayor actividad)		α -glucosidasa-His (menor actividad)	
	0 ns	50 ns	0 ns	50 ns
D307	1.2	2.0	1.4	1.6
R406	1.7	2.6	2.1	1.0
D421	4.0	5.1	3.4	1.0

La matriz que presentó mejor actividad (α -glucosidasa-BSA-EDTA), de acuerdo con la Figura 17 y la tabla 7, muestra que transcurrido el tiempo de SDM los tres aminoácidos analizados se separan más en la α -glucosidasa, lo cual podría indicar un mayor movimiento que resulta en mayor actividad enzimática, esto es congruente con los resultados obtenidos de ASAS y R_g . Es decir, a mayor movimiento mayor facilidad para que la reacción ocurra y a mayor ASAS mayor probabilidad de interacción proteína-sustrato lo cual favorece la

actividad enzimática. Además, parece ser que entre menos interacción de los cosolventes con la proteína y más interacción con el medio (Figura 22) se favorece la estabilidad que se ve reflejada en una menor E_{tot} (Figura 18). Por último, la disminución en el movimiento de los átomos de manera general (Figura 19), puede deberse a la presencia de BSA que podría actuar disminuyendo interacciones desfavorables para la proteína, por ejemplo, de repulsión entre las mismas moléculas de enzima. La presencia de BSA podría explicar la diferencia de los R_g entre la α -glucosidasa y la matriz (Figura 21).

Por otra parte, para la matriz que presentó menor actividad, α -glucosidasa-His, en dos de tres aminoácidos se observa una reducción de la distancia entre los átomos de los aminoácidos del sitio activo. Esto concuerda con los resultados obtenidos previamente; en el R_g hay una diferencia entre esta matriz, la α -glucosidasa sola y la matriz α -glucosidasa-BSA-EDTA (Figura 21), así como una diferencia en el ASAS (Figura 20). Lo cual podría indicar dos cosas, primero la disponibilidad para la interacción proteína-sustrato se ve limitada, segundo el movimiento del sitio activo se ve disminuido por lo que no favorece la reacción enzimática. De manera contradictoria se observa mayor movimiento por átomo (RMSD, Figura 20). Sin embargo, esto podría deberse a las interacciones de la L-histidina con ciertas regiones de la proteína que pueden propiciar microambientes desfavorables que se traducen en menor estabilidad (menor E_{tot} , Figura 18) y menor actividad enzimática (Figura 16 y 17).

En resumen, para este sistema y de acuerdo con los resultados obtenidos: 1) la temperatura de almacenamiento, al menos para las dos condiciones estudiadas, no parece ser un factor determinante en la conservación de la actividad enzimática. 2) El cambio en la actividad enzimática de la α -glucosidasa en presencia de diferentes cosolventes podría estar relacionado con varios factores tales como la E_{tot} del sistema y el movimiento local de los aminoácidos de la enzima, la expansión o compactación proteica, la disponibilidad de área para propiciar la interacción proteína-sustrato y el tipo de interacciones entre la enzima, los cosolventes y el medio.

Por último, es importante denotar que la relación estructura-actividad enzimática no es recíproca pues la pérdida de la estructura afecta a la actividad. Sin embargo, la pérdida de actividad no está necesariamente relacionada con la modificación de la estructura terciaria, en este caso podrían estar interfiriendo las interacciones de los cosolventes con el sustrato y la

proteína, de tal manera que ambas resultan en un impedimento para que el sustrato interactúe con el sitio activo y suceda la reacción catalítica.

7.2 Sistema *hPTP1B*

Los cosolventes utilizados para este sistema se muestran en la tabla 8, con los 11 cosolventes se formaron 21 matrices con las condiciones enlistadas en la tabla 9.

Tabla 8. Cosolventes utilizados para *hPTP1B*

Función	Tipo de cosolvente	Excipientes	% peso	
Anti-adsorción	Polimeros	BSA	1 ^a	
		Dextran	5 ^a	
Protección contra oxidación	Antioxidantes	Ácido ascórbico	0.35 ^b	
	Quelantes	EDTA	0.03 ^b	
		Ácido cítrico	3.8 ^b	
Estabilizantes	Aminoácidos	L-Arginina	2 ^a	
		L-Histidina	3.1 ^a	
		Glicina	4 ^a	
	Carbohidratos	D-glucosa	5 ^a	
		Polioles	D-Manitol	5 ^a
			D-Sorbitol	5 ^a

a: corresponde a las concentraciones expresadas en % m/m

b: corresponde a las concentraciones expresadas en % m/v

De igual manera que para el sistema anterior, el objetivo fue formar matrices que tuvieran un cosolvente que cubriera al menos una de las funciones enlistadas en la columna izquierda de la tabla 8. Para la estabilidad de esta enzima la temperatura de almacenamiento es fundamental por lo que todas las matrices se conservaron a 4°C.

Tabla 9.1 Matrices de *hPTP1B*

1	2	3	4	5	6
sorbitol	manitol	arginina	D-glucosa	BSA sorbitol	BSA manitol

Tabla 9.2 Matrices de *hPTP1B*

7	8	9	10	11	12
BSA arginina	BSA D-glucosa	Dextran Ac. Ascórbico	Dextran EDTA	Dextran Ac cítrico	BSA Ac. Ascórbico
		D-glucosa	D-glucosa	D-glucosa	D-glucosa

Tabla 9.3 Matrices de *hPTP1B*

13	14	15	16	17	18
BSA EDTA	BSA Ac cítrico	Dextran EDTA	Dextran EDTA	Dextran EDTA	BSA EDTA

Tabla 9.4 Matrices de <i>h</i> PTP1B		
19	20	21
BSA EDTA Histidina	BSA EDTA Glicina	Temp. Amb

D-glucosa	D-glucosa	Arginina	Histidina	Glicina	Arginina
-----------	-----------	----------	-----------	---------	----------

Debido al efecto importante que tiene la temperatura de almacenamiento sobre la actividad de esta enzima se realizó un ensayo a temperatura ambiente y se monitoreo su actividad cada hora durante 10 horas, los datos obtenidos se encuentran en el anexo 1.

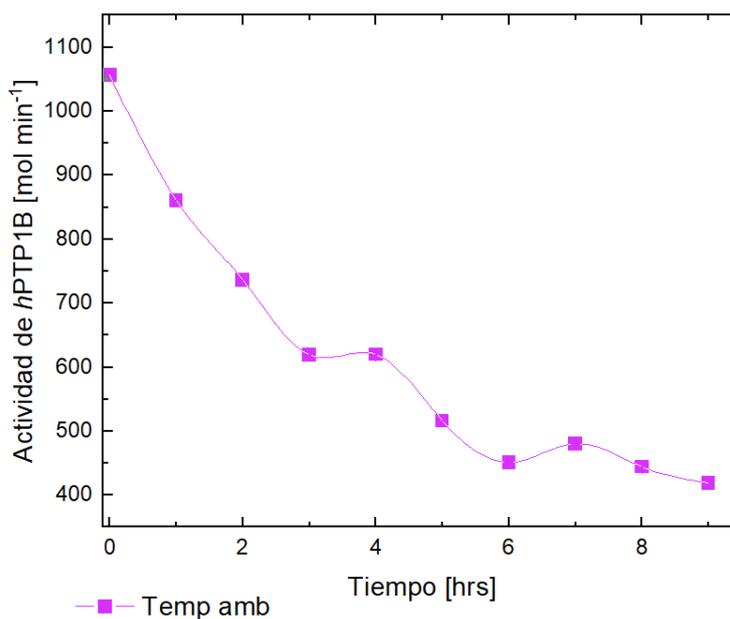


Figura 27. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la *h*PTP1B. Los datos utilizados para esta gráfica se encuentran en el anexo 2, tabla 4.

La Figura 27 muestra, la actividad enzimática en función del tiempo. La tendencia observada es disminución en la actividad enzimática a través del tiempo. Por lo tanto, se puede inferir para la *h*PTP1B que la temperatura a la cual se almacena es crítica para su

conservación y su actividad enzimática, a temperatura ambiente su actividad disminuye rápidamente en función del tiempo.

Se realizaron ensayos enzimáticos de las 21 matrices cada 8 días durante 49 días con el objetivo de observar el efecto de los cosolventes y el tiempo en la actividad enzimática. Los datos obtenidos se encuentran en el anexo 1.

La Figura 28, presentan los resultados de los ensayos enzimáticos de todas las condiciones ensayadas.

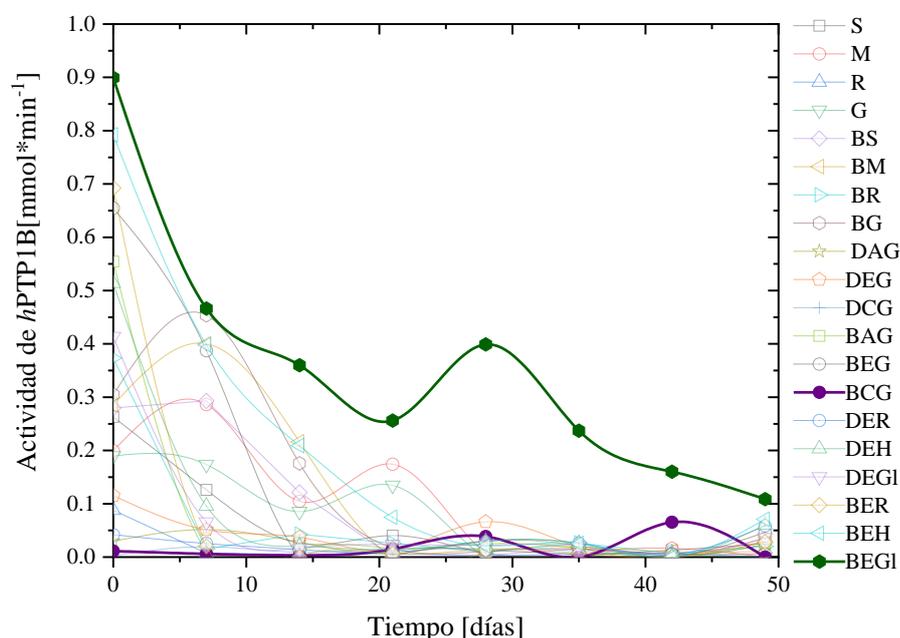


Figura 28. Influencia de los cosolventes seleccionados solos y en distintas combinaciones sobre la actividad de la hPTP1B. El código de letras es D: dextran, A: ácido ascórbico, G: D-glucosa, E: EDTA, C: ácido cítrico, B: BSA, R: arginina, H: histidina, Gl: glicina, S: sorbitol, M: manitol. Los datos utilizados para esta gráfica se encuentran en el anexo 2, tabla 5.1-5.3. Los datos de actividad inicial y final, así como los % de actividad para las matrices 14 y 20 son los siguientes: 11 y 0 mol/L*min (3% y 0%). 899 y 109 mol/L*min (231% y 28%), respectivamente.

La Figura 28 muestra que para la mayoría de las condiciones analizadas la actividad disminuye en un lapso corto, incluso algunas condiciones no presentaron una actividad significativa en ningún ensayo enzimático.

De la misma manera que para el sistema anterior (α -glucosidasa), se seleccionó la matriz que presentó la mejor actividad y la de menor actividad para un análisis más detallado.

La Figura 29, muestra que la matriz que permitió mantener la actividad enzimática por más tiempo fue la número 20, la cual contiene como cosolventes a la albúmina sérica bovina, EDTA y glicina. Mientras que la matriz que mostró una menor actividad enzimática fue la 14 cuyos componentes son albúmina, citrato y D-glucosa, coincide con la peor matriz para el primer sistema de prueba (α -glucosidasa).

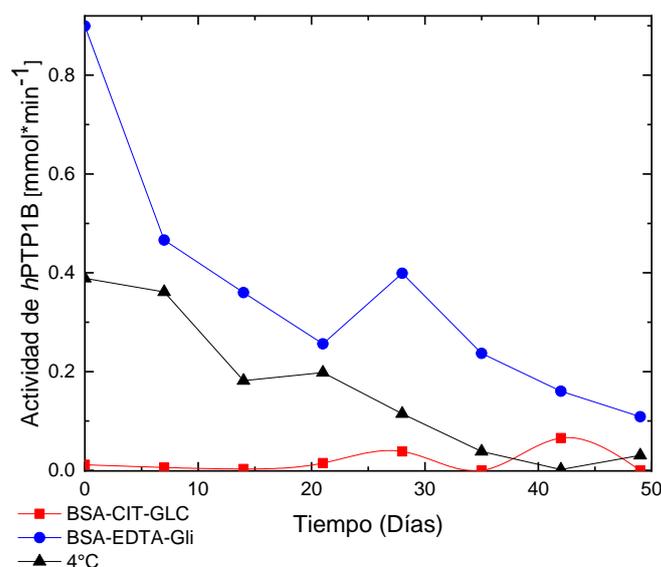


Figura 29. Combinaciones de cosolventes que presentaron mejor actividad (hPTP1B-BSA-EDTA-Glicina) y menor actividad (hPTP1B-CIT-GLC) en conjunto con la condición control (4°C). Los datos utilizados para esta gráfica se encuentran en el anexo 1, tabla 2.

A partir de la Figura 29, podemos obtener distintos datos importantes, el primero es que la temperatura no es el único factor crucial en la actividad enzimática de la *hPTP1B*, los componentes del medio también desempeñan un papel importante para la actividad de esta enzima, una condición favorable, como la matriz BSA-EDTA-Gli, se refleja en una mayor actividad en comparación con la enzima almacenada a 4°C. De la misma manera una condición desfavorable (matriz BSA-CIT-GLC), perjudica notoriamente la actividad enzimática de esta, lo cual sugiere una mayor sensibilidad de esta proteína a los cambios en el solvente en comparación con el primer sistema de prueba.

Al igual que en el sistema 1, ambas matrices tienen como agente anti-adsorbante a la albúmina que podría estar estabilizando a la proteína mediante exclusión preferencial, impedimento estérico de la interacción proteína-proteína o un aumento en la viscosidad del

medio que resulta en la limitación del movimiento estructural de la proteína, ya que este cosolvente se encuentra en ambas matrices, no se puede afirmar si favorece o desfavorece a la actividad enzimática.

Por lo tanto, los otros cosolventes serían los posibles factores responsables en la actividad enzimática de la *h*PTP1B. Con el objetivo de proteger a la proteína de una posible oxidación también se utilizó EDTA, para la mejor matriz, y ácido cítrico, para la peor matriz, ambos actúan como agentes quelantes, la diferencia es que el ácido cítrico para que ejerza su efecto se encuentra en mayor concentración que el EDTA por lo que podría crear microambientes desfavorables para la enzima interactuando con la D-glucosa y que resulte en la disminución de la actividad catalítica.

Por último, la elección de estabilizantes, como se mencionó los carbohidratos (en este caso la D-glucosa), a diferencia de los aminoácidos, presentan un efecto dependiente del pH por lo que en caso de que el pH sea afectado por la cantidad de ácido cítrico adicionado, podría desfavorecer la actividad enzimática de la proteína. Mientras que la Glicina, de acuerdo con la literatura, es de los aminoácidos más utilizados para estabilizar a proteínas en solución ya que es un agente zwitterionico en un rango de pH de 4.5 a 7.5 y se utiliza como amortiguador. Además, podría disminuir interacciones desfavorables entre la misma proteína o de la proteína con el medio, de manera que la actividad catalítica de la *h*PTP1B se ve favorecida.

Al igual que en el sistema de la α -glucosidasa se realizaron estudios de SDM de ambas matrices para tratar de entender a nivel molecular los posibles mecanismos e interacciones que pueden influir en la mayor o menor actividad enzimática. La tabla 10, muestra el tiempo de super cómputo utilizado para realizar cada proceso de ambas matrices.

Tabla 10. Tiempo de super cómputo utilizado

Proceso	Minimización	Calentamiento	Desprezurización	Equilibrio	Producción	Tiempo total [hrs]
4°C	0	0.03	0.06	0.31	28.56	28.96
25°C	0	0.04	0.03	0.33	31.83	32.23
BSA-CIT-GLC	0.01	0.14	0.07	1.23	122	123.45
BSA-ED-Gli	0.02	0.38	0.35	0.16	145	145.91

Del análisis de las SDM se obtuvieron la E_{tot} del sistema, la RMS e imágenes tridimensionales de los complejos al inicio y final de la SDM. Además, se generaron mapas electrostáticos de la enzima con el objetivo de relacionar las cargas parciales del sistema con las posibles interacciones con los cosolventes.

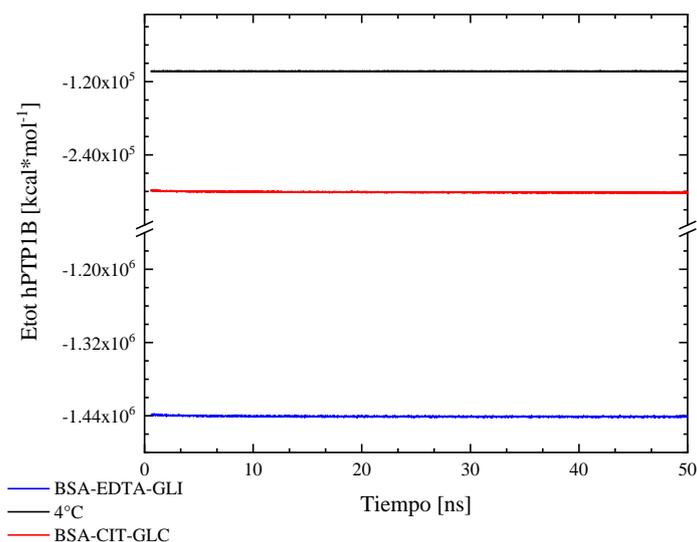


Figura 30. Efecto en la energía total de los sistemas que presentaron mayor (BSA-EDTA-Gli) y menor (BSA-CIT-GLC) actividad en conjunto con la hPTP1B a 4 °C.

En términos energéticos, menor E_{tot} , mayor estabilidad y se puede reflejar en una mayor actividad enzimática esto se cumple para la matriz 20 (BSA-EDTA-Gli) que tiene una E_{tot} significativamente menor en comparación con la hPTP1B y con la matriz 14, con una diferencia de 1.23×10^6 y 1.03×10^6 kcal/mol, respectivamente. Sin embargo, la matriz 14 (BSA-CIT-GLC) es más estable que la hPTP1B, pero su actividad enzimática es menor (Figura 29).

El sistema con mayor energía es la matriz que únicamente contiene hPTP1B almacenada a 4°C a pesar de que de acuerdo con esta gráfica es la matriz más inestable, su actividad se mantuvo por más tiempo (Figura 29) en comparación con la matriz 14 (BSA-CIT-GLC).

Además de la E_{Tot} , se calculó la RMSD a partir de las trayectorias de dinámica molecular, tomando como referencia las coordenadas del paso de equilibrio del sistema correspondiente (Figura 31).

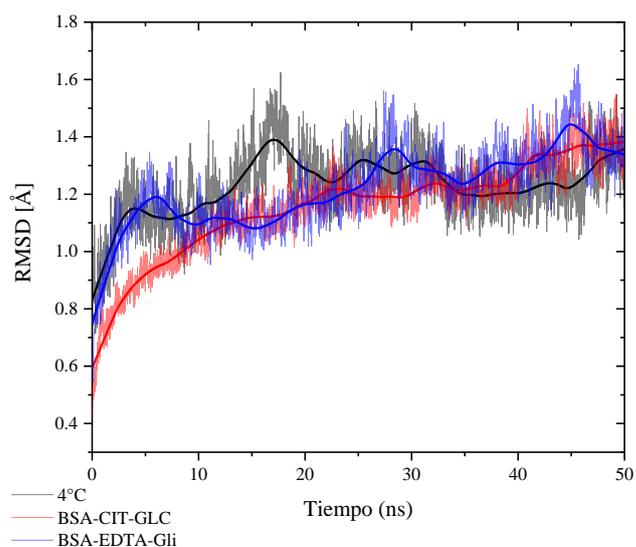


Figura 31. Cambio en la conformación de la *hPTP1B* a 4°C y en presencia de las matrices con menor (BSA-CIT-GLC, color rojo) y mayor actividad (BSA-EDTA-Gli, color azul) durante los 50ns de SDM.

La Figura 31, muestra que las tres condiciones tienen valores similares de RMSD, por lo que el movimiento de los átomos en función del tiempo no varía de manera significativa. De tal manera que para la *hPTP1B* el movimiento de los átomos no parece tener un impacto crítico en la actividad de la enzima.

Por otra parte, se realizó una comparación del sistema al inicio y al final del proceso de SDM realizado a 4°C, la Figura 32 muestra el cambio del sistema después de los 50 ns.

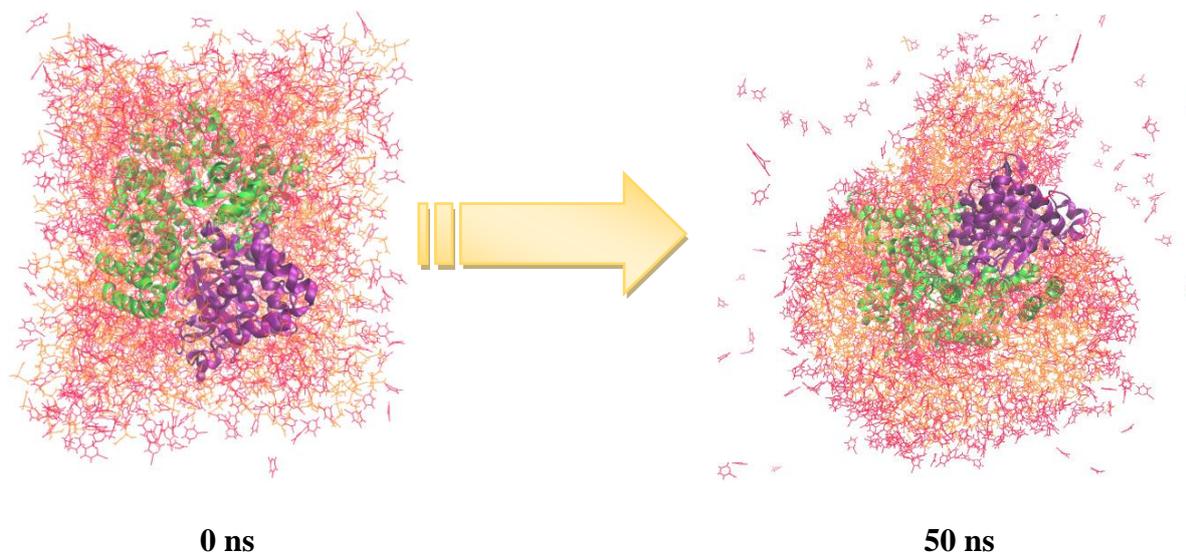


Figura 32. Estructuras tridimensionales de la SDM de 50 ns de *hPTP1B-BSA-CIT-GLC* a 4°C. La *hPTP1B* es representada en color morado, la BSA en color verde, el ácido cítrico en líneas amarillas y la D-glucosa en líneas rojas. Para ver el video de la SDM visitarla siguiente liga: <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-paulina/PTP-BSA-CIT-DOSA.mp4>

Es interesante relacionar ambos sistemas (α -glucosidasa y *hPTP1B*) en este caso, pues, aunque son proteínas con estructuras y propiedades diferentes los cosolventes se comportan de manera similar en ambos casos, pocos cambios en el acomodo de los cosolventes en la matriz después de la SDM, las moléculas de citrato y D-glucosa se encuentran rodeando la superficie de la proteína, menor E_{tot} que la proteína sola. Sin embargo, menor actividad que la *hPTP1B* sola.

Estas interacciones podrían estar impedir el paso del sustrato al sitio activo por lo que la pérdida de actividad de esta matriz no necesariamente está relacionada con una pérdida de estructura, es probable que la accesibilidad al sitio activo esté influyendo en la actividad enzimática, en la figura 33 se observa el sitio activo de la *hPTP1B*.



Figura 33. Sitio activo de *hPTP1B*, en cartoons anaranjados con transparencia se muestra la estructura tridimensional de la enzima *hPTP1B* y en stickers cafes los aminoácidos correspondientes al sitio catalítico: Trp179, Cys215, y Arg221

Una manera de comprobar la accesibilidad al sitio activo es mediante el cálculo del ASAS, en la figura 34 se observa la diferencia de ASAS entre la *hPTP1B* sola y con la matriz 14.

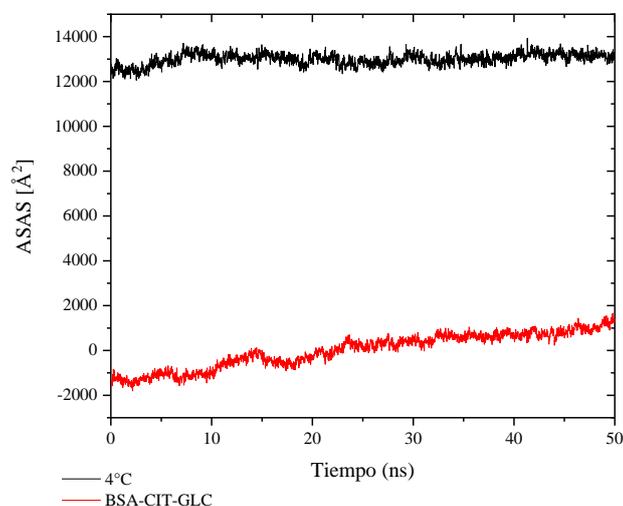


Figura 34. Comparación del área superficial accesible al solvente entre la *hPTP1B* a 4°C (color negro) y la matriz con menor actividad (BSA-CIT-GLC, color rojo) durante los 50 ns de SDM.

Como ya se mencionó, la figura 32 ilustra el reacomodo de los cosolventes después de la SDM y se observa que los cosolventes están rodeando a la *hPTP1B*, por lo que el ASAS (Figura 34), es congruente con lo observado en la SDM; el ASAS de la matriz 14 (BSA-CIT-

GLC) es menor que el ASAS de la enzima sin presencia de cosolventes, esto podría dificultar el acceso del sustrato al sitio activo, lo cual se ve reflejado en la pérdida de actividad enzimática a lo largo del tiempo.

Un factor más a tomar en cuenta es la naturaleza de las interacciones que pudiesen estar ocurriendo, por lo que se generó el mapa de potencial electrostático de la *h*PTP1B en complejo con BSA.

A pesar de las similitudes entre ambos sistemas del mapa electrostático calculado de esta matriz (Figura 35), podemos encontrar diferencias importantes: 1) la superficie de la proteína muestra regiones de potencial electrostático positivo, negativo y neutro por lo que las posibles interacciones que ocurran serán diferentes a las observadas en la α -glucosidasa; 2) tanto el citrato como la D-glucosa están interaccionando con la superficie de la proteína. Sin embargo, la mayoría de las moléculas de ambos cosolventes interactúan de manera preferencial con la albúmina, lo que podría disminuir el efecto estabilizante de esta. También podemos observar las regiones en donde ambas moléculas tienen mayor interacción con la *h*PTP1B, para el citrato son las zonas neutras o con potencial electrostático positivo, mientras que la D-glucosa (D-glucosa) se encuentra en zonas de potencial electrostático negativo o neutro. Estas interacciones podrían ser de dos tipos electrostáticas (para el citrato) y fuerzas de Van der Waals (para la D-glucosa).

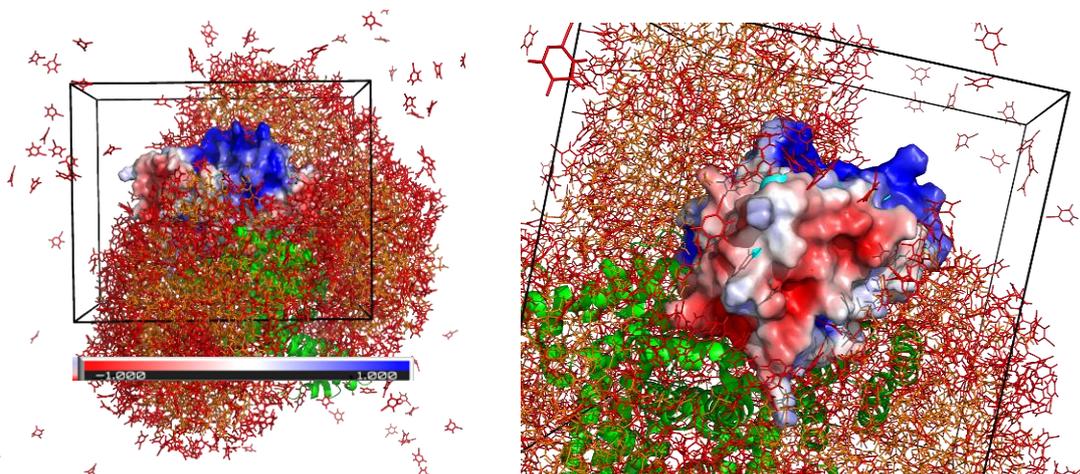


Figura 35. Mapa electrostático del complejo PTP1B-BSA-CIT-GLC a los 50 ns. La BSA es representada en color verde, el ácido cítrico en líneas amarillas y la D-glucosa en líneas rojas. La escala de -1 a 1 es la medida de potencial electrostático y se mide en Coulombs.

A diferencia de la matriz 14 (BSA-CIT-GLC), la matriz que contiene BSA-EDTA-Gli muestra un acomodo diferente al inicio de la SDM y después de los 50 ns, como se puede observar en la figura 36. La glicina al ser una molécula zwitteriónica podría estar disminuyendo las interacciones proteína-proteína e interacciones electrostáticas que pueden ser desfavorables para la actividad de la enzima.

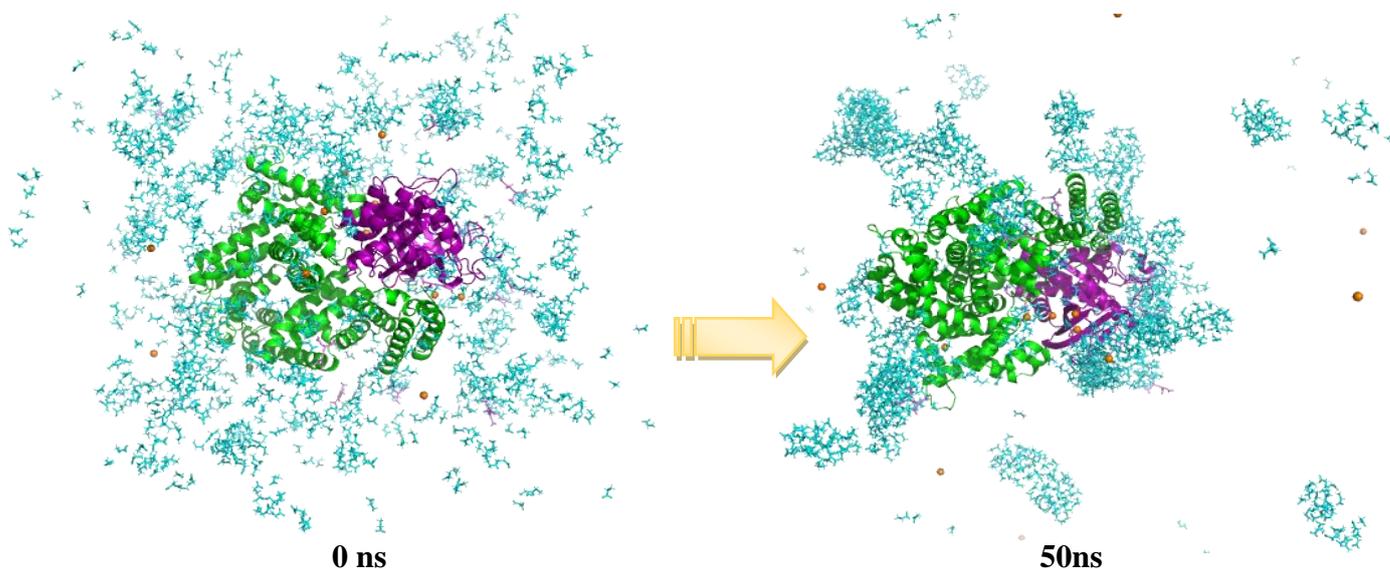


Figura 36. Estructuras tridimensionales de la SDM de 50 ns de *hPTP1B*-BSA-EDTA-Gli a 4°C. La *hPTP1B* es representada en color morado, la BSA en color verde, el EDTA en líneas lilas, la glicina en líneas azules y las esferas naranjas son los iones sodio. Para ver el video de la SDM visítarla siguiente liga: <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-paulina/PTP-BSA-EDTA-GLI.mp4>

Es importante considerar que además de estabilizar a la proteína, estas interacciones también podrían limitar el acceso del sustrato al sitio catalítico, en el cálculo del ASAS (Figura 37), se nota una tendencia del ASAS a disminuir conforme transcurre el tiempo. Sin embargo, el valor estimado de ASAS al final de la SDM es mayor (9000 Å²) en comparación con el valor de ASAS de la matriz cuya actividad enzimática es menor (2000 Å²), figura 34.

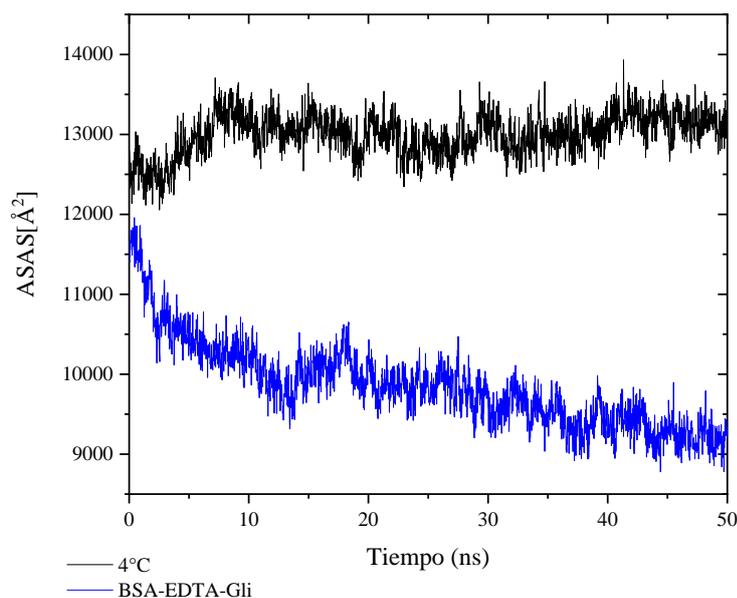


Figura 37. Comparación del área superficial accesible al solvente entre la hPTP1B a 4°C (color negro) y la matriz con menor actividad (BSA-CIT-GLC, color azul) durante los 50 ns de SDM.

Adicionalmente, es interesante analizar la tendencia del ASAS (Figura 37) pues disminuye conforme transcurre la SDM, esto podría estar relacionada con la naturaleza de las interacciones que posiblemente ocurran entre la proteína y los cosolventes, principalmente con la glicina. Ya que unos de los principales elementos de interacción entre las proteínas y los cosolventes son las interacciones electrostáticas, se calculó el mapa del potencial electrostático de la enzima hPTP1B (Figura 38).

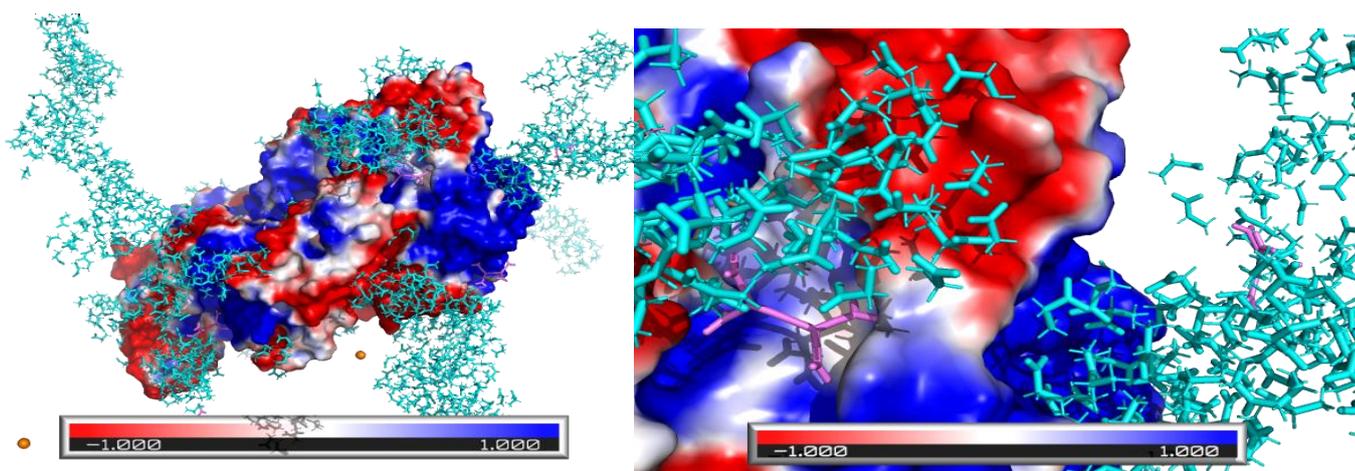


Figura 38. Mapa electrostático del complejo hPTP1B-BSA-EDTA-Gli. El EDTA es representada en líneas lilas, la glicina en líneas azules y las esferas naranjas son los iones sodio. La escala de -1 a 1 es la medida de potencial electrostático y se mide en Coulombs.

La glicina tiene naturaleza zwitterionica lo cual podría explicar las interacciones de esta con diferentes regiones de la proteína que tienen tanto potencial electrostático positivo, negativo y neutro. La figura 38, muestra que las principales interacciones se encuentran en las regiones con potencial electrostático negativo, pues es donde se observa la mayor agrupación del aminoácido. Sin embargo, también se observa una interacción en zonas de potencial electrostático positivo lo cual puede deberse a la naturaleza de la glicina. En tanto al EDTA (líneas color lila), interacciona principalmente con la albúmina y regiones con potencial positivo y neutro de la proteína, así como con aglomerados de la glicina.

Ya que esta proteína es sensible a los cambios de temperatura se realizó un experimento con la matriz que presentó mejor actividad y la *h*PTP1B enlistadas en la tabla 11.

Tabla 11. Matrices de <i>h</i>PTP1B	
22	23
<i>h</i> PTP1B	<i>h</i> PTP1B-BSA-EDTA-Gli

Las matrices se almacenaron a temperatura ambiente y se estudiaron durante 5 días, se realizaron 3 replicas de cada matriz con la finalidad de comprobar la reproducibilidad del experimento, los resultados se observan en la figura 39.

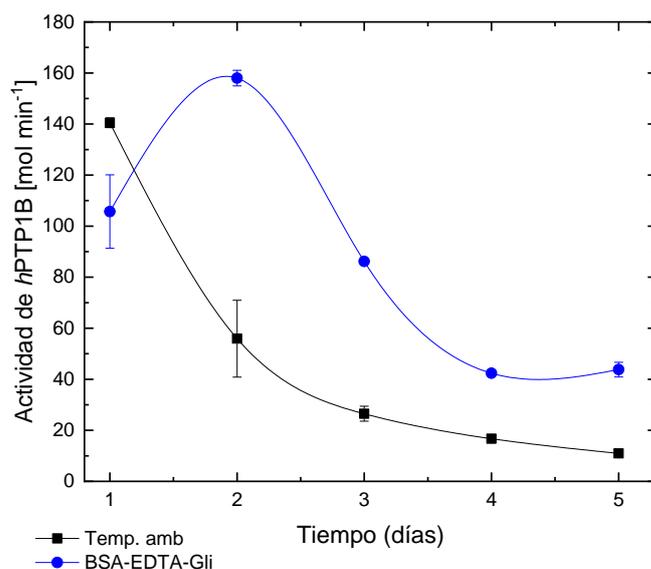


Figura 39. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la actividad enzimática de la *hPTP1B* (color negro) y de la mejor combinación de cosolventes con la enzima (BSA-EDTA-Gli, color azul).

Los resultados de este experimento refuerzan que la presencia de los cosolventes adecuados permiten mantener la actividad enzimática aún en condiciones físicas que no son favorables para la enzima, en este caso particular la temperatura es un factor importante que influye en la actividad enzimática de la *hPTP1B* y al adicionar los 3 cosolventes se conserva mejor la actividad enzimática en función del tiempo, aunque a tiempos largos la enzima se inactiva en ambas condiciones.

Con el propósito de ampliar el entendimiento del efecto de cada cosolvente que conforma la matriz BSA-EDTA-Gli, se realizaron nuevos ensayos enzimáticos con las matrices enlistadas en la tabla 12.

Tabla 12. Matrices de *hPTP1B*

23	24	25	26	27	28	29	30
BSA	EDTA	Gli	BSA-EDTA	BSA-Gli	EDTA-Gli	BSA-EDTA-Gli	<i>hPTP1B</i>

Las matrices se almacenaron a 4° C y se estudiaron durante 20 días, se realizaron 3 replicas de cada matriz con la finalidad de comprobar la reproducibilidad del ensayo, los resultados se presentan en la figura 40.

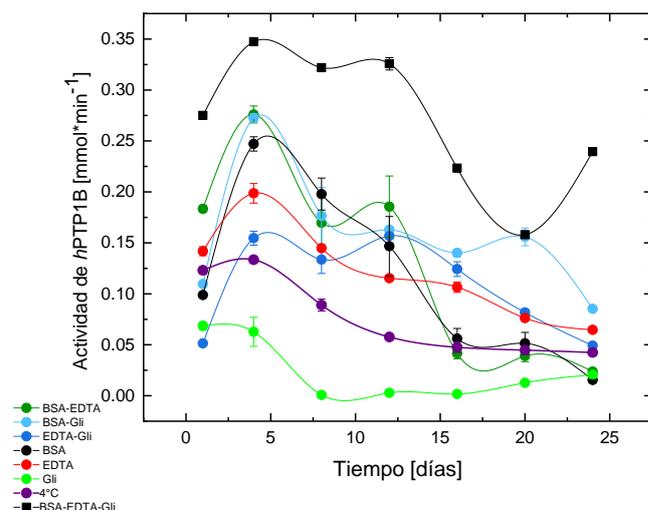


Figura 40. Influencia de los cosolventes utilizados en la matriz que presentó mayor actividad enzimática para la *hPTP1B*, solos y en sus distintas combinaciones.

La figura 40, ilustra la actividad enzimática en función del tiempo de las 7 matrices y la *hPTP1B*, de estos resultados se puede resaltar lo siguiente: 1) La combinación de los tres cosolventes fue la que presentó mejor actividad a lo largo del tiempo, 2) la *hPTP1B* en presencia únicamente de glicina tiene la menor actividad enzimática. 3) La glicina en combinación con los otros cosolventes contribuye a la actividad enzimática ya que la combinación solo de BSA y EDTA presenta menor actividad que BSA-EDTA-Gli.

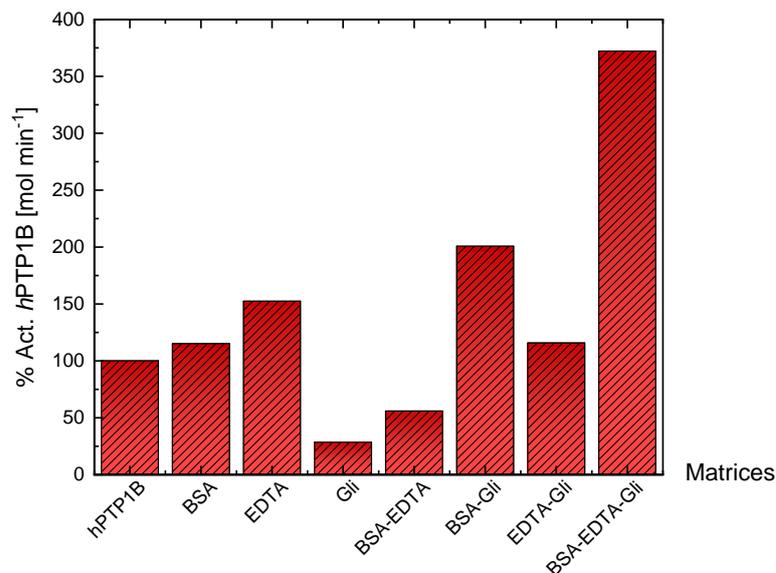


Figura 41. Porcentaje de actividad enzimática de la *hPTP1B* sola (100% de actividad) y en presencia de los distintos cosolventes y sus combinaciones.

La figura 41, muestra la comparación de la actividad enzimática de la *h*PTP1B en combinación con los diferentes cosolventes, la gráfica se realizó calculando el porcentaje de la actividad enzimática obtenida en el último día del ensayo de cada matriz, tomando como 100% la *h*PTP1B, es decir

$$\% \text{ de Act} = (\text{ActMatrizX} * 100) / \text{Act}h\text{PTP1B}$$

La glicina sola es la menos favorable para mantener la actividad de la enzima (Figura 40 y 41), esto se observa en la pérdida de la actividad en presencia de este aminoácido. Sin embargo, la combinación de los tres cosolventes es la que presentó mejor actividad, seguida de la matriz BSA-Gli, lo cual sugiere que la presencia de BSA puede modificar el microambiente del sistema favoreciendo la estabilidad de la enzima; esto se refuerza si se observa que las 3 matrices que contienen BSA favorecen en la conservación de la actividad enzimática.

Para complementar y tratar de explicar los resultados experimentales se realizaron SDM de las 6 matrices, obteniendo y analizando los parámetros E_{Tot} , RMSD, ASAS y el R_g .

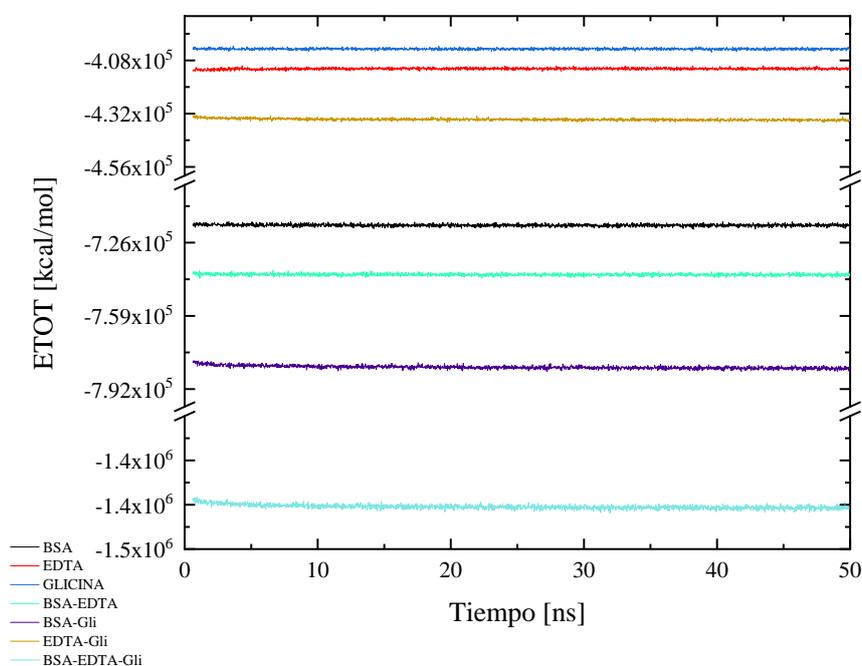


Figura 42. Efecto en la energía total de cada cosolvente con *h*PTP1B y las distintas combinaciones de cosolventes posibles.

La Figura 42 muestra la E_{tot} de las matrices 24 a 30; la menor E_{tot} (-1.44×10^6) coincide con la matriz que presenta mayor actividad (BSA-EDTA-Gli), mientras que la matriz con mayor E_{tot} (-4.08×10^5), es la que tiene menor actividad (glicina) en función del tiempo. Lo cual podría estar directamente relacionado con la estabilidad de la propia enzima.

En este caso, las matrices con mayor E_{tot} son las dos que contienen solamente EDTA y glicina por lo que la presencia única de estos dos cosolventes no es favorable para la estabilidad de esta enzima. Sin embargo, la combinación de estos dos con BSA favorece notablemente a su estabilidad.

Por último, en términos energéticos las matrices que contienen BSA son las que poseen una menor E_{Tot} , lo que sugiere que la presencia de este cosolvente mejora la estabilidad de la enzima lo que respalda los resultados experimentales (Figura 42).

La figura 43, muestra la RMSD en función del tiempo a partir de las coordenadas del paso de equilibrio del sistema correspondiente.

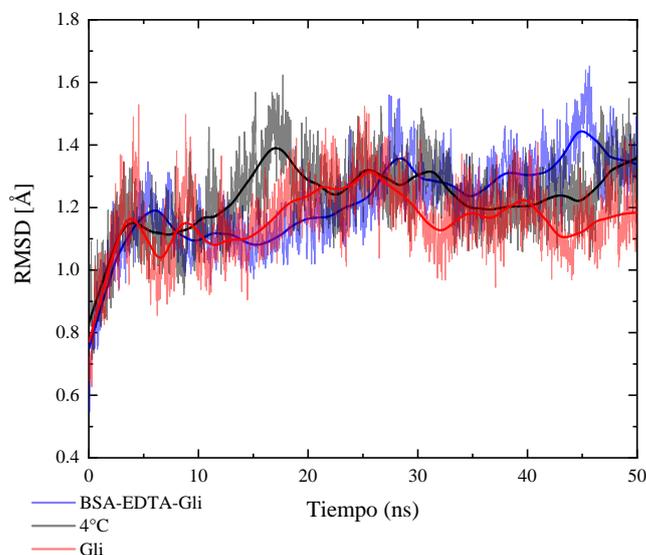


Figura 43. Cambio en la conformación de *hPTP1B* a 4°C y en presencia de las matrices con menor (Gli, color rojo) y mayor actividad (BSA-EDTA-Gli, color azul) durante los 50ns de SDM.

La figura 43. muestra que las tres condiciones tienen valores similares de RMSD, por lo que el movimiento de los átomos en función del tiempo no varía de manera significativa.

De tal manera que para la *h*PTP1B el movimiento de los átomos no parece tener un impacto crítico en la actividad de la enzima, esto es congruente con los resultados de RMSD obtenidos en las primeras matrices analizadas (Figura 31).

Además del análisis de RMSD, en la figura 44 se ilustra el ASAS de la *h*PTP1B sola y en combinación con Gli y BSA-EDTA-Gli.

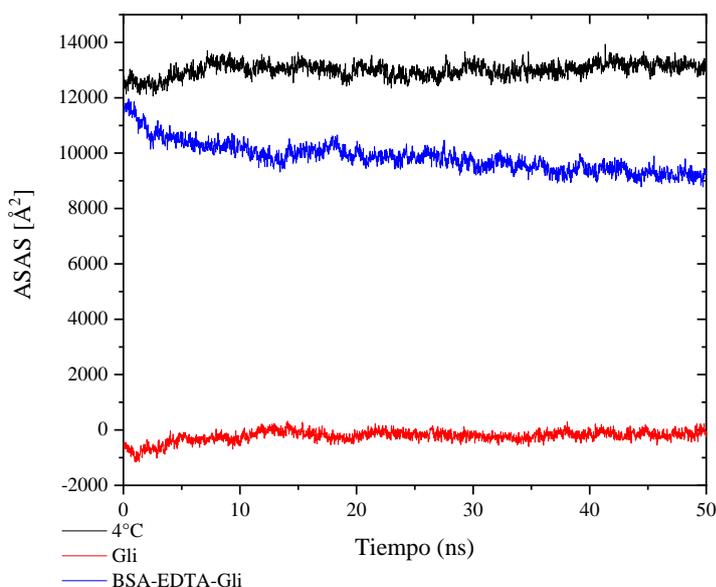


Figura 44. Comparación del área superficial accesible al solvente entre la *h*PTP1B a 4°C (color negro), la matriz con mayor actividad (BSA-EDTA-Gli, color azul) y con menor actividad (Gli, color rojo) durante los 50 ns de SDM.

La figura 44, muestra el ASAS en función del tiempo, entre las matrices de mayor y menor actividad y la *h*PTP1B sola. De la misma manera que sucedió para la matriz BSA-CIT-GLC, el ASAS de la matriz con Gli es menor, esto sugiere que la accesibilidad al sitio activo podría verse limitada o comprometida como consecuencia de las interacciones de la glicina con la enzima. Además, es probable que la disminución en el ASAS de la matriz BSA-EDTA-Gli se deba a las interacciones que ocurren entre la proteína y la glicina.

Además del área accesible al solvente, se calculó el radio de giro de *h*PTP1B, el cual es un parámetro que indica la expansión o compactación proteica a lo largo del tiempo, la figura 45 ilustra el cambio en el R_g en función del tiempo de *h*PTP1B, *h*PTP1B-BSA-EDTA-Gli y *h*PTP1B-Gli.

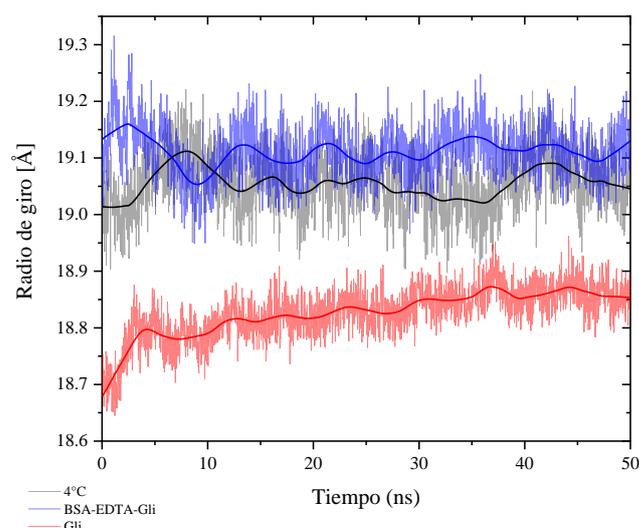


Figura 45. Comparación del radio de giro entre la *hPTP1B* a 4°C (color negro) y las matrices que presentaron mayor (BSA-EDTA-Gli, color azul) y menor actividad (Gli, color rojo).

La figura 45, muestra los R_g de los tres sistemas, de esta figura se observa: 1) El R_g en función del tiempo entre la *hPTP1B* y *hPTP1B*-BSA-EDTA-Gli tiene una trayectoria similar, sin embargo, el R_g es mayor en presencia de los tres cosolventes. 2) El R_g de la matriz que presentó menor actividad (*hPTP1B*-Gli) es menor en comparación con los otros dos sistemas y tiene una trayectoria creciente, lo cual indica una elongación proteica. Sin embargo, transcurrido el tiempo de SDM no alcanza el valor de la enzima sin cosolventes. Esto en conjunto con los resultados hasta ahora obtenidos (mayor E_{tot} , y menor ASAS) podría indicar que la actividad disminuye debido a que la reacción de catálisis se ve impedida por la limitación del movimiento, así como por la accesibilidad del sustrato al sitio activo. 3) Por otra parte el R_g de la matriz que contiene BSA-EDTA-Gli presenta una trayectoria menos variable y similar con la trayectoria de la *hPTP1B* sola. En conjunto con los demás resultados (menor E_{tot} y mayor ASAS) podría explicar porque presenta una mejor actividad enzimática a lo largo del tiempo.

Ya que la actividad enzimática se ve influenciada no solamente por el movimiento proteico, sino también por todas las interacciones que podrían estar sucediendo intentar elucidar la naturaleza de éstas es fundamental, pues el tipo de interacciones dicta la disponibilidad de la proteína para interactuar con distintas moléculas, en este caso el sustrato.

La figura 46, muestra el complejo de *h*PTP1B-Gli al inicio de la SDM 0 ns y transcurridos 50 ns, para este proceso se agregó al sistema el amortiguador correspondiente, en este caso, Tris-HCl.

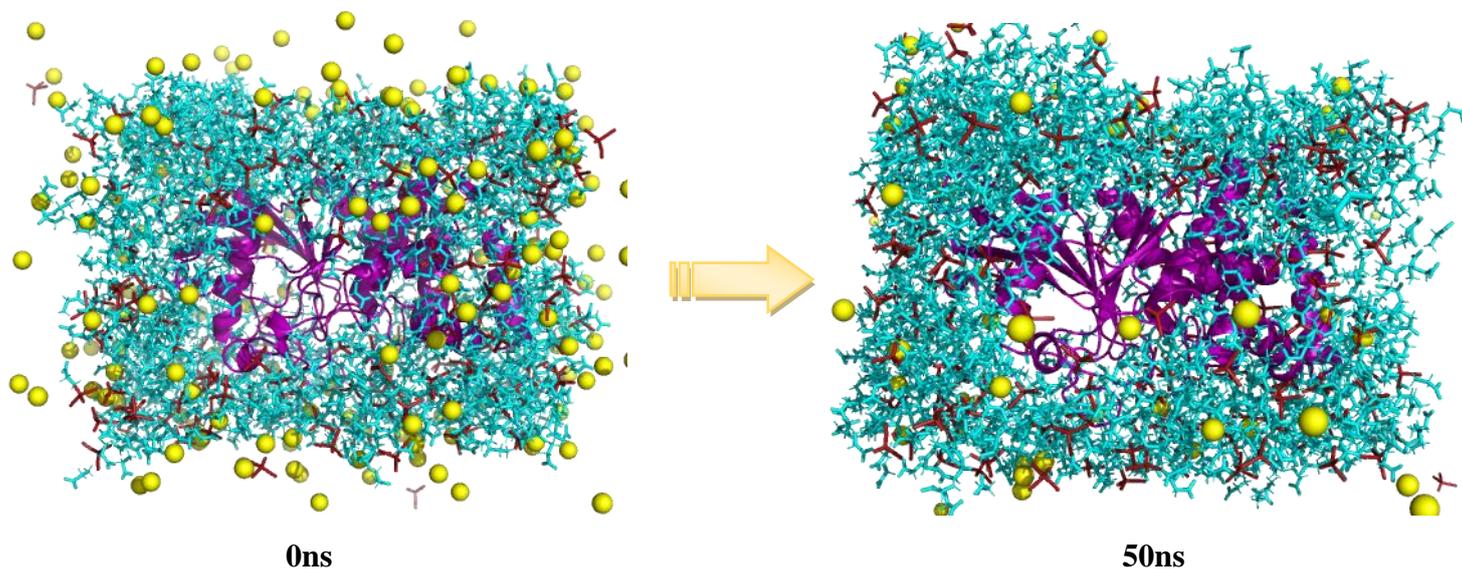


Figura 46. Estructuras tridimensionales de la SDM de 50 ns de *h*PTP1B-Gli a 4 °C. La *h*PTP1B es representada en color morado, la glicina en líneas azules, las esferas amarillas representan los iones K⁺ y las líneas rojas corresponden al amortiguador Tris-HCl. . Para ver el video de la SDM visítarla siguiente liga: <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-paulina/PTP-GLI.mp4>

Esta figura permite comprender el resultado obtenido en el cálculo del ASAS (0 Å²), figura 44, pues no se distingue algún reacomodo de la glicina alrededor de la proteína, por lo tanto es probable que la accesibilidad al sitio activo sea limitada o nula, y se ve reflejado en la disminución de la actividad enzimática, figura 40.

Otra cosa interesante es el comportamiento de las glicinas; en presencia de BSA y EDTA se observan agrupaciones de moléculas de glicina (Figura 36), mientras que al estar la enzima sola, la glicina rodea a la proteína e interactúa con toda su superficie incluyendo el sitio catalítico.

Con la finalidad de indagar más sobre el tipo de interacciones que puedan estar ocurriendo se generó el mapa electrostático de la proteína, el cual se muestra en la figura 47.

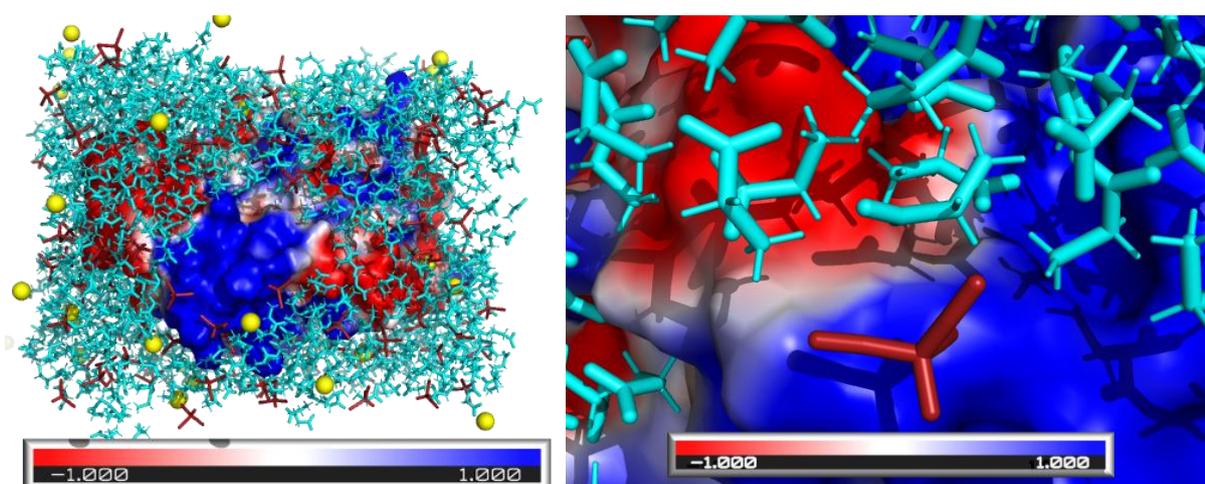


Figura 47. Mapa electrostático del complejo *hPTP1B*-Gli. La glicina es representada en líneas azules, las esferas amarillas representan los iones K^+ y las líneas rojas corresponden al amortiguador Tris-HCl.

De esta figura es importante hacer ciertas observaciones: 1) La heterogeneidad del potencial electrostático de la *hPTP1B* y la naturaleza zwitteriónica de la glicina propician interacciones en superficies con potencial electrostático negativo y positivo. 2) Las moléculas del amortiguador Tris-HCl interactúan con las regiones positivas de la proteína. 3) La ausencia de la BSA modifica el potencial electrostático del sistema por lo que también se modifican las interacciones proteína-cosolvente (Figura 38). 4) La naturaleza de estas interacciones puede impedir que el sustrato interactue con el sitio activo lo cual podría derivar en una pérdida de actividad enzimática (Figura 41).

Con el objetivo de realizar un análisis detallado para tratar de explicar el efecto de los cosolventes en la actividad enzimática se analizó el sitio activo de la enzima, se alineó la estructura de la enzima sola a los 0, 20 y 50 ns así como de las dos matrices (anexo 5). La Figura 48, muestra la comparación de los tres aminoácidos catalíticos entre los tres sistemas utilizados, *hPTP1B*, *hPTP1B*-Gli y *hPTP1B*-BSA-EDTA-Gli.

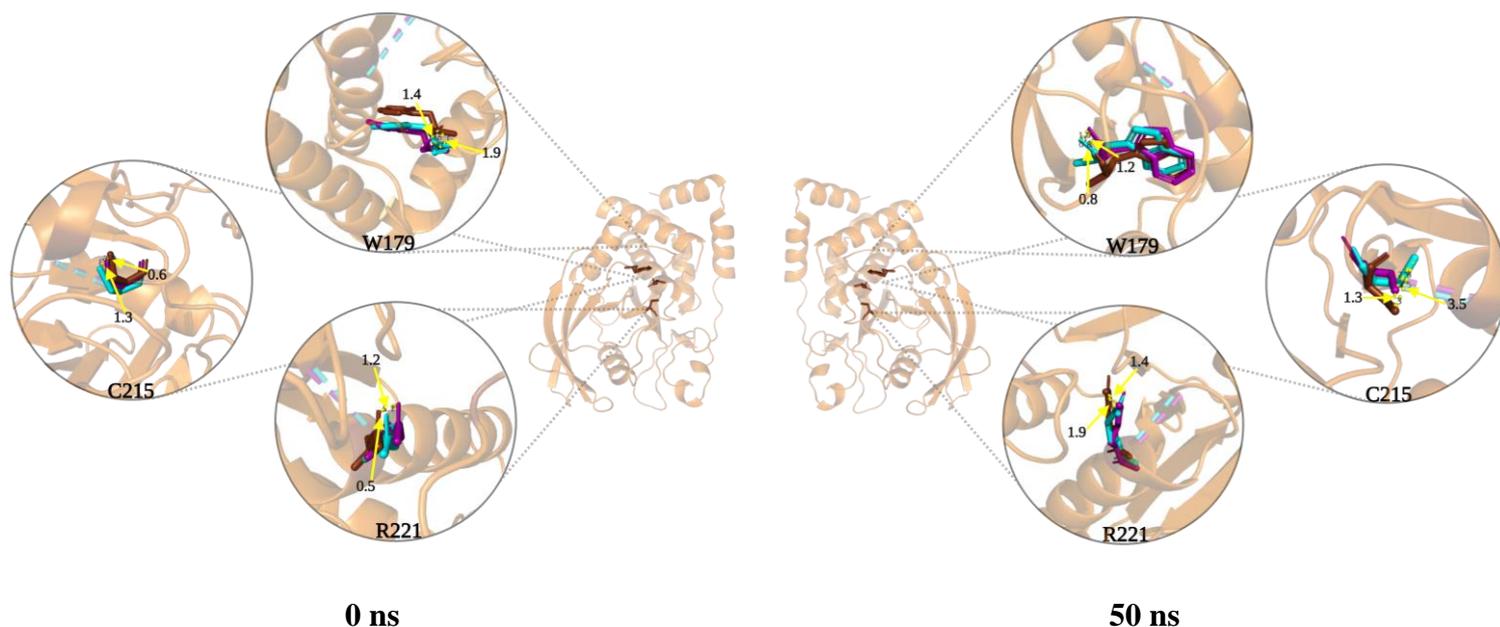


Figura 48. Aminoácidos correspondientes al sitio catalítico de *hPTP1B* (café) alineados con los sistemas *hPTP1B*-Gli (cyan) y *hPTP1B*-BSA-EDTA-Gli (morado), los aminoácidos de lado izquierdo corresponden al inicio de la SDM mientras que los aminoácidos de lado derecho son transcurridos los 50 ns de SDM. Las flechas amarillas y los números hacen referencia a la distancia que hay entre los átomos de cada aminoácido de *hPTP1B* y las dos matrices utilizadas.

La tabla 13 enlista las distancias en Å, entre cada aminoácido de la *hPTP1B* y la *hPTP1B* en presencia de los distintos cosolventes.

Tabla 13. Distancias [Å] entre átomos de los aminoácidos comparando la <i>hPTP1B</i> con la matriz correspondiente				
	<i>hPTP1B</i> - BSA-EDTA-Gli (mayor actividad)		<i>hPTP1B</i> -Gli (menor actividad)	
	0ns	50ns	0ns	50ns
Trp179	1.4	1.2	1.9	0.8
Cys215	0.6	1.3	1.3	3.5
Arg221	1.2	1.4	0.5	1.9

La tabla 13 muestra que el movimiento de los aminoácidos de la enzima en la matriz que presentó mayor actividad (*hPTP1B*-BSA-EDTA-Gli) es variable, el Trp179 tiene menor movimiento mientras que los otros dos aminoácidos tienen mayor movimiento en comparación con la *hPTP1B*. En comparación con el primer sistema de prueba, las diferencias entre los aminoácidos son menores, lo cual es congruente con el resultado obtenido en el parámetro de RMSD (Figura 43) y esto refuerza que para esta enzima en

particular el movimiento en los átomos posiblemente no tenga un impacto en la actividad catalítica. Aunque el R_g (Figura 45) de la enzima con la matriz es ligeramente mayor que el de la enzima sola, esto podría ser producto de las posibles interacciones que se generan debido a la presencia de los cosolventes. Por lo tanto, podría ser que el aumento de la actividad de la *h*PTP1B en esta matriz, en comparación con la enzima sola, sea mayor debido a que el sitio activo está accesible para interactuar con el sustrato. Esto último se ve reflejado en el valor de ASAS (Figura 44), así como en la disminución de contactos no favorables entre moléculas de la enzima debido a las posibles interacciones de los cosolventes, tanto con la proteína como con el medio (Figura 36). Esto tiene como resultado una mayor estabilidad la cual se ve reflejada en un menor valor de E_{tot} (Figura 42).

En tanto a la matriz que presentó menor actividad, *h*PTP1B-Gli, se observa que los tres aminoácidos tuvieron cierto movimiento, el Trp179 presentó menor movimiento en comparación con la enzima sola, mientras que los otros dos aminoácidos presentan mayor movimiento. Lo cual podría estar limitando la reacción catalítica debido al cambio de conformación en el sitio activo. Aunado a este resultado, el R_g obtenido (Figura 45) hace referencia a que, en comparación con la enzima sola, esta matriz está compactada por lo que podría verse impedido el paso del sustrato al sitio activo; lo cual es congruente con el valor de ASAS obtenido (Figura 44). Como se puede observar en la figura 46 la proteína está rodeada del cosolvente, glicina, por lo que es probable que la interacción sustrato-proteína no sea favorable y por lo tanto la actividad enzimática se ve disminuida (Figura 40). Además, el valor de E_{tot} obtenido (Figura 42) es mayor para esta matriz lo cual se traduce en menor estabilidad.

En resumen para este sistema de acuerdo con los resultados: 1) la enzima es sensible a la temperatura de almacenamiento, es un factor importante para conservar la actividad enzimática. 2) El movimiento local de los aminoácidos no parece tener un impacto importante en la actividad enzimática. 3) La disponibilidad de área para propiciar la interacción proteína-sustrato podría estar relacionado con el cambio en la actividad enzimática. 4) El tipo de interacciones que podrían estar sucediendo entre los cosolventes, la proteína y el medio afectan tanto la estabilidad del sistema como la actividad de la enzima.

De igual manera que se denota para el primer sistema de prueba (α -glucosidasa), es importante tomar en cuenta que la relación estructura-actividad no es recíproca. Por lo que las

interacciones que se favorezcan si bien pudiesen promover la estabilidad de la enzima pueden interferir con la catálisis enzimática, por lo tanto la selección de los cosolventes dependerá del objetivo.

8. Conclusiones

Si bien la estabilidad de las proteínas está influenciada por las interacciones intra e intermoleculares y factores externos, la forma en la que éstos afectan a cada proteína es diferente por lo que la elección de cosolventes depende de distintos factores y es particular para cada proteína, al igual que los parámetros a estudiar para definirlos. Por lo tanto podemos destacar puntualmente las siguientes conclusiones.

- 1) Las interacciones entre las proteínas y los cosolventes dependerán de las características de cada proteína como su estructura, su potencial electrostático y su punto isoeléctrico.
- 2) Para las proteínas utilizadas en este trabajo, ambas tienen propiedades fisicoquímicas (p.I, estructura, peso molecular) diferentes por lo que los factores que afectan su actividad enzimática son particulares y por lo tanto la elección de cosolventes también lo es.
- 3) Para la α -glucosidasa la mejor matriz es la que contiene BSA-EDTA, mientras que para la *h*PTP1B es la combinación de BSA-EDTA-GLI.
- 4) Por otra parte, las propiedades de los cosolventes y las combinaciones de estos son fundamentales en el tipo de interacción que pueda estar ocurriendo así como en el efecto que tendrán en la actividad enzimática de la α -glucosidasa y la *h*PTP1B.
- 5) La combinación de tres cosolventes con distinta función (anti adsorción, anti oxidante y estabilizante) resultó ser la mejor para la α -glucosidasa, no así para la *h*PTP1B, por lo tanto, no necesariamente es la mejor opción utilizar esta mezcla. La combinación dependerá de las características y propiedades de la proteína en cuestión.
- 6) Gracias a las SDM podemos sugerir que la energía total del sistema es menor en presencia de cosolventes, aunque no necesariamente está relacionado con mejorar la actividad enzimática.
- 7) Los parámetros de RMSD, ASAS y radio de giro brindan información que podría contribuir en el entendimiento de los cambios en la actividad enzimática de las proteínas utilizadas.

- 8) El uso del programa Packmol para empaquetar a las proteínas con los distintos cosolventes y estudiar su reacomodo representa una nueva herramienta valiosa y funcional.

9. Perspectivas

Para el presente trabajo aún queda por estudiar algunos aspectos importantes por lo que algunas de las perspectivas a realizar son las siguientes:

Realizar estudios fisicoquímicos utilizando alguna técnica espectroscópica (dicroísmo circular o fluorescencia intrínseca) para relacionar la estabilidad estructural con la actividad catalítica, en presencia de la mejor combinación de cosolventes.

Evaluar a la enzima α -glucosidasa con los cosolventes seleccionados a largo plazo (6 meses mínimo), con el objetivo de monitorear la capacidad de éstos para mantener la actividad enzimática en un mayor periodo.

Prolongar los tiempos de SDM de los mejores sistemas para corroborar la evolución de estos y sus parámetros.

10. Referencias

1. *Key biotechnology indicators*. 2021 16-11-20221; Available from: <https://www.oecd.org/innovation/inno/keybiotechnologyindicators.htm>.
2. *Ley general de Salud*. 2021 16-11-2021; Available from: http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf_mov/Ley_General_de_Salud.pdf.
3. Salud, S.d. *NORMA Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-001-SSA1-2012, Medicamentos biotecnológicos y sus biofármacos. Buenas prácticas de fabricación. Características técnicas y científicas que deben cumplir éstos para demostrar su seguridad, eficacia y calidad. Etiquetado. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad y farmacovigilancia*. 2012.
4. Canchi, D.R. and A.E. Garcia, *Cosolvent effects on protein stability*. *Annu Rev Phys Chem*, 2013. **64**: p. 273-93.
5. Fernández-Velasco, A.C., M., *Estabilidad termodinámica de proteínas*. *Revista unam*, 2018. **29**: p. 3-17.
6. Murphy, K.P., *Noncovalent forces important to the conformational stability of protein structures*. *Methods Mol Biol*, 1995. **40**: p. 1-34.
7. Wang, W., *Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals*. *Int J Pharm*, 1999. **185**(2): p. 129-88.
8. Espinosa, R., *Propiedades termodinámicas del efecto hidrofóbico en la estabilidad proteica*. *Ciencia e Ingeniería*, 2015. **7**: p. 1-9.
9. Pace, C.G., G, *Protein Stability*. *Encyclopedia of life sciences*, 2001.
10. Robertson, A.D. and K.P. Murphy, *Protein Structure and the Energetics of Protein Stability*. *Chem Rev*, 1997. **97**(5): p. 1251-1268.
11. Chi, E.Y., et al., *Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation*. *Pharm Res*, 2003. **20**(9): p. 1325-36.
12. Yadav, J.P., V, *Stabilization of α -Amylase, the Key Enzyme in Carbohydrates Properties Alterations, at Low pH*. *International Journal of Food Properties*, 2011. **14**: p. 1182-1196.
13. Ohtake, S., Y. Kita, and T. Arakawa, *Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011. **63**(13): p. 1053-73.
14. Wlodarczyk, S.R., et al., *Influence and effect of osmolytes in biopharmaceutical formulations*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018. **131**: p. 92-98.
15. Arakawa, T., Prestrelski, S., Kenny, W., Carpenter J. , *Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001. **46**: p. 307-326.
16. Poddar, N.A., ZA, Brojen, R.K. Moosavi-Movahedi, A.A. Ahmad, F., *Effect of monomeric and oligomeric sugar osmolytes on Δ GD, the Gibbs energy of stabilization of the protein at different pH values: Is the sum effect of monosaccharide individually additive in a mixture?* *Biophysical Chemistry*, 2008. **138**: p. 120-129.
17. Jorgensen, L., et al., *Recent trends in stabilising peptides and proteins in pharmaceutical formulation - considerations in the choice of excipients*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009. **6**(11): p. 1219-30.
18. Parkins, D., Lashmar, U., *The formulation of biopharmaceutical products*. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2000. **3**: p. 129-137.
19. Singh, L., Poddar, N., Dar, T., Kumar, R., Ahmad, F., *Protein and DNA destabilization by osmolytes: The other side of the coin*. *Life Sciences*, 2011. **88**: p. 117-125.
20. Yanagisawa, K.M., Y. Terada, T. Shimizu, K., *EXPRORER: Rational Cosolvent Set Construction Method for Cosolvent Molecular Dynamics Using Large-Scale Computation*. *Journal of chemical information and modeling* 2021. **61**: p. 2744-2753.

21. Larsen, B.S., et al., *Using dextran of different molecular weights to achieve faster freeze-drying and improved storage stability of lactate dehydrogenase*. Pharm Dev Technol, 2019. **24**(3): p. 323-328.
22. Wang, W., *Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals*. Int J Pharm, 2000. **203**(1-2): p. 1-60.
23. Li, S., et al., *Chemical pathways of peptide degradation. V. Ascorbic acid promotes rather than inhibits the oxidation of methionine to methionine sulfoxide in small model peptides*. Pharm Res, 1993. **10**(11): p. 1572-9.
24. Bjelosevic, M., et al., *Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation*. Int J Pharm, 2020. **576**: p. 119029.
25. Arsiccio, A., et al., *Designing the Optimal Formulation for Biopharmaceuticals: A New Approach Combining Molecular Dynamics and Experiments*. J Pharm Sci, 2019. **108**(1): p. 431-438.
26. Luo, S. and B. Zhang, *Dextrose-mediated aggregation of therapeutic monoclonal antibodies in human plasma: Implication of isoelectric precipitation of complement proteins*. MAbs, 2015. **7**(6): p. 1094-103.
27. Anko, M., et al., *The formation and effect of mannitol hemihydrate on the stability of monoclonal antibody in the lyophilized state*. Int J Pharm, 2019. **564**: p. 106-116.
28. Cleland, J.L., et al., *A specific molar ratio of stabilizer to protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody*. J Pharm Sci, 2001. **90**(3): p. 310-21.
29. Ressing, M.E., et al., *The influence of sucrose, dextran, and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as lyoprotectants for a freeze-dried mouse IgG2a monoclonal antibody (MN12)*. Pharm Res, 1992. **9**(2): p. 266-70.
30. Fisher, M.T., *Proline to the rescue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(36): p. 13265-6.
31. Ignatova, Z. and L.M. Gierasch, *Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(36): p. 13357-61.
32. Li, S., et al., *Aggregation and precipitation of human relaxin induced by metal-catalyzed oxidation*. Biochemistry, 1995. **34**(17): p. 5762-72.
33. Pikal-Cleland, K.A., et al., *Effect of glycine on pH changes and protein stability during freeze-thawing in phosphate buffer systems*. J Pharm Sci, 2002. **91**(9): p. 1969-79.
34. Harini Narayanan, F.D., Itzel Condado Morales, Bhargav Patel, Kristine Enemærke Heding, Jais Rose Bjelke, Thomas Egebjerg, Alessandro Butté, Michael Sokolov, Nikolai Lorenzen, and Paolo Arosio, *Design of Biopharmaceutical Formulations Accelerated by Machine Learning*. Molecular Pharmaceutics, 2021. **18**: p. 3843-3853.
35. Gonzalez-Andrade, M. *Aplicaciones de simulaciones de dinámica molecular en proteínas*. 2021. **45**, 121-133.
36. Karplus, M. and J.A. McCammon, *Molecular dynamics simulations of biomolecules*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(9): p. 646-52.
37. Kukol, A., *Molecular Modeling of Proteins*. 2 ed. Methods in Molecular Biology. 2015: Humana New York, NY. 474.
38. Salomon-Ferrer, R., D.A. Case, and R.C. Walker, *An overview of the Amber biomolecular simulation package*. 2013. **3**(2): p. 198-210.
39. Martinez, L., et al., *PACKMOL: a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations*. J Comput Chem, 2009. **30**(13): p. 2157-64.
40. Schott-Verdugo, S., Gohlke, H., *PACKMOL-Memgen: A Simple-To-Use, Generalized Workflow for Membrane-Protein-Lipid-Bilayer System Building*. Journal of chemical information and modeling, 2019. **59**: p. 2522-2528.

41. Bueren-Calabuig, J. *Dinámica Molecular*. Available from: https://zenodo.org/record/1066360/files/Capitulo-17_Dinamica_Molecular.pdf?download=1.
42. Karen Sargsyan, C.G., and Carmay Lim, *How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulation*. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2017: p. 1518-1524.
43. *Área superficial accesible*. Available from: https://hmn.wiki/es/Accessible_surface_area.
44. Jurrus, E., et al., *Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite*. *Protein Sci*, 2018. **27**(1): p. 112-128.

11. Anexos

11.1 Anexo 1. Datos obtenidos de los ensayos enzimáticos de la α -glucosidasa con PNPB

Tabla 1.1 Actividad enzimática de α -glucosidasa de las matrices 1-6						
Días/Matriz	Actividad [mol/L*min]					
	1	2	3	4	5	6
0	203	170	19	198	193	236
7	301	401	265	265	313	212
14	323	385	179	250	271	157
21	349	356	193	307	211	200
28	339	362	184	329	361	200
35	341	331	189	289	351	210
42	403	359	186	274	341	215
49	469	449	201	347	425	317
56	300	320	152	245	322	205

Tabla 1.2 Actividad enzimática de α -glucosidasa de las matrices 7-12						
Días/Matriz	Actividad [mol/L*min]					
	7	8	9	10	11	12
0	520	446	665	599	786	768
7	494	656	609	688	852	494
14	566	1220	792	1037	1556	824
21	522	937	832	796	1411	1169
28	487	758	679	718	1211	992
35	461	835	657	735	1151	954
42	500	890	672	658	1121	1021
49	718	1064	857	733	1421	1202
56	525	919	729	35	1072	1058

Tabla 1.3 Actividad enzimática de α -glucosidasa de las matrices 13-23						
Días/Matriz	Actividad [mol/L*min]					
	13	14	15	16	17	18
0	856	772	692	598	679	613
7	818	698	691	713	788	610
14	1103	1084	843	1093	814	682
21	959	853	659	831	880	654
28	1031	913	716	977	945	651
35	806	746	532	713	752	679
42	1192	1237	875	1169	1154	884
49	1160	1142	855	1027	989	786
56	1217	835	391	980	920	455

Tabla 1.4 Actividad enzimática de α -glucosidasa de las matrices 13-23

Días/Matriz	Actividad [mol/L*min]				
	19	20	21	22	23
0	827	125	762	83	203
7	770	160	725	143	215
14	760	124	811	186	251
21	794	181	933	219	304
28	886	196	968	202	275
35	886	152	1078	214	266
42	663	125	786	191	269
49	1041	182	1172	272	454
56	812	175	1067	275	369

Tabla 2. Actividad enzimática de α -glucosidasa de las matrices 6,11,19 y 21

Días/Matiz	Actividad [mol/L*min]			
	6	11	19	21
0	236	786	827	762
7	212	852	770	725
14	157	1556	760	811
21	200	1411	794	933
28	200	1211	886	968
35	210	1151	886	1078
42	215	1121	663	786
49	317	1421	1041	1172
56	205	1072	812	1067

Tabla 3.1 Actividad enzimática de α -glucosidasa de las matrices 24 a 31

Días/Matriz	Actividad [mol/L*min]							
	24	σ	25	σ	26	σ	27	σ
1	179	4	119	10	178	1	153	17
4	230	9	228	9	148	2	275	8
8	268	22	230	1	177	5	288	3
12	262	3	255	2	132	0	319	0
16	239	0	261	7	126	0	283	7
20	207	6	238	4	107	0	254	0

Tabla 3.2 Actividad enzimática de α -glucosidasa de las matrices 24 a 31

Días/Matriz	Actividad [mol/L*min]							
	28	σ	29	σ	30	σ	31	σ
1	227	6	222	2	239	10	94	0
4	230	0	214	5	310	11	142	4
8	249	0	231	5	273	17	131	4
12	223	0	225	1	214	8	136	1
16	197	2	199	1	255	17	136	2
20	167	1	167	3	204	4	171	0

11.2 Anexo 2. Datos obtenidos de los ensayos enzimáticos de la hPTP1B con PNPP

Tabla 4. Datos de la actividad enzimática de PTP1B a temperatura ambiente

Actividad [mol/L*min]	
Tiempo (h)	Temp. Amb
0	1057
1	860
2	736
3	619
4	620
5	826
6	355
7	480
8	444
9	419

Tabla 5.1 Datos de la actividad enzimática de PTP1B de las matrices 1-7

Días/Matriz	Actividad [mol/L*min]						
	1	2	3	4	5	6	7
0	263	199	88	190	280	286	373
7	126	286	7	173	293	400	15
14	26	104	5	85	121	216	43
21	40	174	7	134	0	0	26
28	7	7	2	0	3	7	9
35	3	2	5	0	16	19	26
42	13	16	7	4	2	10	7
49	25	0	0	0	28	10	20

Tabla 5.2 Datos de la actividad enzimática de PTP1B de las matrices 8-14

Días/Matriz	Actividad [mol/L*min]						
	8	9	10	11	12	13	14
0	305	29	115	2	554	655	11
7	454	52	51	19	10	387	6
14	176	28	37	8	11	0	3
21	17	7	14	16	16	0	15
28	11	30	66	16	25	13	38
35	15	21	19	11	16	5	0
42	6	1	0	0	0	0	65
49	6	23	35	23	28	46	0

Tabla 5.3 Datos de la actividad enzimática de PTP1B de las matrices 15-21

Días/Matriz	Actividad [mol/L*min]						
	15	16	17	18	19	20	21
0	42	514	413	692	792	899	389

7	25	95	65	20	398	466	361
14	14	20	17	0	209	360	182
21	9	13	23	6	74	256	198
28	29	30	22	14	21	399	115
35	26	25	20	7	25	237	38
42	5	0	0	0	0	160	2
49	58	60	36	28	71	109	31

Tabla 6. Actividad enzimática de PTP1B de las matrices 14, 20 y 21

Actividad [mol/L*min]			
Días/Matiz	14	20	21
0	11	899	389
7	6	466	361
14	3	360	182
21	15	256	198
28	38	399	115
35	0	237	38
42	65	160	2
49	0	109	31

Tabla 7.1 Actividad enzimática de PTP1B de las matrices

Actividad [mol/L*min]								
Días/Matriz	22	σ	23	σ	24	σ	25	σ
1	99	1	142	4	69	4	183	3
4	247	7	199	10	63	14	276	8
8	198	16	145	1	1	0	170	27
12	147	29	115	0	3	0	186	30
16	56	10	107	5	2	0	42	5
20	51	11	76	1	13	0	39	6
24	16	0	65	2	21	1	24	1

Tabla 7.2 Actividad enzimática de α -glucosidasa de las matrices 24 a 31

Actividad [mol/L*min]								
Días/Matriz	26	σ	27	σ	28	σ	29	σ
1	110	1	51	2	275	2	123	3
4	272	4	155	7	347	1	134	3
8	177	28	134	14	322	2	89	6
12	163	1	157	0	326	6	58	0
16	140	4	124	7	223	2	48	5
20	156	9	82	3	158	2	45	1
24	85	2	49	2	239	3	42	3

11.3 Anexo 3. Protocolos utilizados para realizar las simulaciones de dinámica molecular.

Para realizar el docking molecular se utilizó el siguiente script

1.- Obtener el pdb de la proteína y limpiar el PDB, dejar solamente las cadenas proteicas.

```
/home/martin/programas/rosetta_src_2021.16.61629_bundle/main/tools/protein_tools/scripts/clean_pdb.py  
3gbm.pdb AB
```

2.- Renumerar el archive generado en el paso anterior

```
/home/martin/programas/rosetta_src_2021.16.61629_bundle/main/tools/protein_tools/scripts/pdb_renumber.py -  
-nrestart 3gbm_AB.pdb 3gbm_HA.pdb
```

3.- Reempacar la cadena pequeña con 10 estructuras

```
rosetta_scripts.default.linuxgccrelease @repack.options -s 3gbn_Ab_fixed.pdb -parser:protocol repack.xml -  
nstruct 10 -out:file:scorefile repack_Ab.fasc > repack_Ab.log &
```

4.- Identificar los mejores modelos de ambas estructuras

```
sort -nk 2 repack_HA.fasc
```

5.- Renombrar los mejores puntajes de ambas proteínas

```
cp 3gbn_Ab_0002.pdb 3gbn_Ab_repacked.pdb
cp 3gbm_HA_0001.pdb 3gbm_HA_repacked.pdb
```

6.- Orientar las estructuras y guardar

```
pymol 3gbm_native.pdb 3gbm_HA_repacked.pdb 3gbn_Ab_repacked.pdb
comando en terminal pymol "save 3gbm_HA_3gbn_Ab.pdb, 3gbm_HA_repacked + 3gbn_Ab_repacked"
```

7.- Ejecutar el docking

```
rosetta_scripts.linuxgccrelease @docking.options -database
/home/martin/programas/rosetta_src_2021.16.61629_bundle/main/database -parser:protocol docking_full.xml -
out:suffix _full -nstruct 10 > docking_full.log &
```

Para realizar el empaquetamiento el protocolo es el siguiente

1.- Tener todas las moléculas que se utilizarán en la carpeta correspondiente

2.- Solvatar la molécula

```
solvate.tcl nombre.pdb -shell 10
```

3.- Editar el archivo de packmol con las moléculas correspondientes, si es un aminoácido se debe cambiar el nombre del aminoácido en el archivo

4.- Realizar el empaquetamiento proteína-cosolventes

```
packmol< packmol_input.inp
```

5.- Activar el ambiente conda

```
Conda activate AmberTools21
```

6.- Parametrizar las moléculas nuevas

```
antechamber -i xxxx.pdb -fi pdb -o xxxx.mol2 -f0 mol2 -rn XXX -C bcc -nc
```

7.- Generar el archivo frcmod

```
parmchk2 -i xxx.mol2 -f mol2 xxx.frcmod
```

8.- Preparar el complejo proteína-cosolventes para solvatar y neutralizar

```
pdb4amber -i proteinaempaquetada.pdb -o proteinaempaquetada-amber.pdb
```

9.- Cargar el programa tleap

```
tleap -s -fleaprc.protein.ff19SB
```

10.- Cargar las moléculas de agua

```
source leaprc.water.tip3p
```

11.- Cargar el campo de fuerza

```
source leaprc.gaff2
```

12.- Cargar los archivos correspondientes a los cosolventes

```
XXX=loadmol2 XXX.mol2
```

```
loadamberparams XXX.frcmod
```

13.- Cargar la proteína empaquetada

bandera=loadpdb proteinaempaquetada-amber.pdb

14.- Revisar que el complejo proteína-cosolvente

check bandera

15.- Revisar la carga del complejo

charge bandera

16.- Neutralizar el complejo

addions proteina K+ 0

17.- Solvatar el complejo

solvatebox proteina TIP3PBOX 10

18.- Generar y guardar los archivos de topología y de coordenadas

saveamberparm proteina xxx.top xxx.xyz

19.- Generar y guardar el archivo pdb

savepdb proteina xxxx-wat.pdb

20.- Editar los documentos .in y .bsub

gedit *.in & gedit *.bsub &

21.- Mover los archivos a la supercomputadora

scp -r nombre de la carpeta paulina@132.248.131.98:/home/paulina/dinamica

Para realizar la simulación de dinámica molecular

1.- Habilitar el módulo ambertools

module load amber/amber.14

2.- Comenzar con el archivo de minimización

more xxx-min.bsub

3.- Continuar con el archivo de calentamiento

more xxx-heat.bsub

4.- Seguir con el archivo de despresurización

more xxx-density.bsub

5.- Continuar con el archivo de equilibrio

more xxx-equil.bsub

6.- Para terminar el archivo de producción

more xxx-prod.bsub

Para visualizar la SMD

1.- Abrir VMD

vmd

2.-Cargar el archivo de topología

3.- Cargar el archivo de calentamiento.mdcrd

4.- Cargar el archivo de despresurización.mdcrd

- 5.- Cargar el archivo de equilibrio.mdcrd
- 6.- Cargar el archivo de producción.mdcrd

Para calcular RMSD, ASAS y Radio de giro

- 1.- Activar el ambiente conda
conda activate AmberTools21
- 2.- Abrir el programa cpptarj
cpptraj
- 3.- Cargar el archivo de topología
parm ../yyyy.top
- 4.- Cargar el archivo de producción
trajin ../yyy-prod.mdcrd
- 5.- Establecer como referencia el archivo de equilibrio.rst
reference ../yyyy_equil.rst
- 6.- Calcular RMSD
rms reference out yyyy.rms :1-222@C,CA,N
- 7.- Calcular el ASAS
surf :1-222 out 2as8-IND-ASA.dat
- 8.- Calcular el radio de giro
radgyr :1-222&!(@H=) out RoG-2as8-IND.dat mass nomax
- 9.- Ejecutar el análisis
run

Para calcular la energía total

- 1.- Utilizar el script perl para el archivo prod.out
perl /process_mdout.perl../yyy-prod.out

11.4 Anexo 6. Estructuras alineadas de α -glucosidasa a los 0, 20 y 50 ns, α -glucosidasa-BSA-EDTA a los 0, 20 y 50 ns y de α -glucosidasa-His a los 0, 20 y 50 ns.

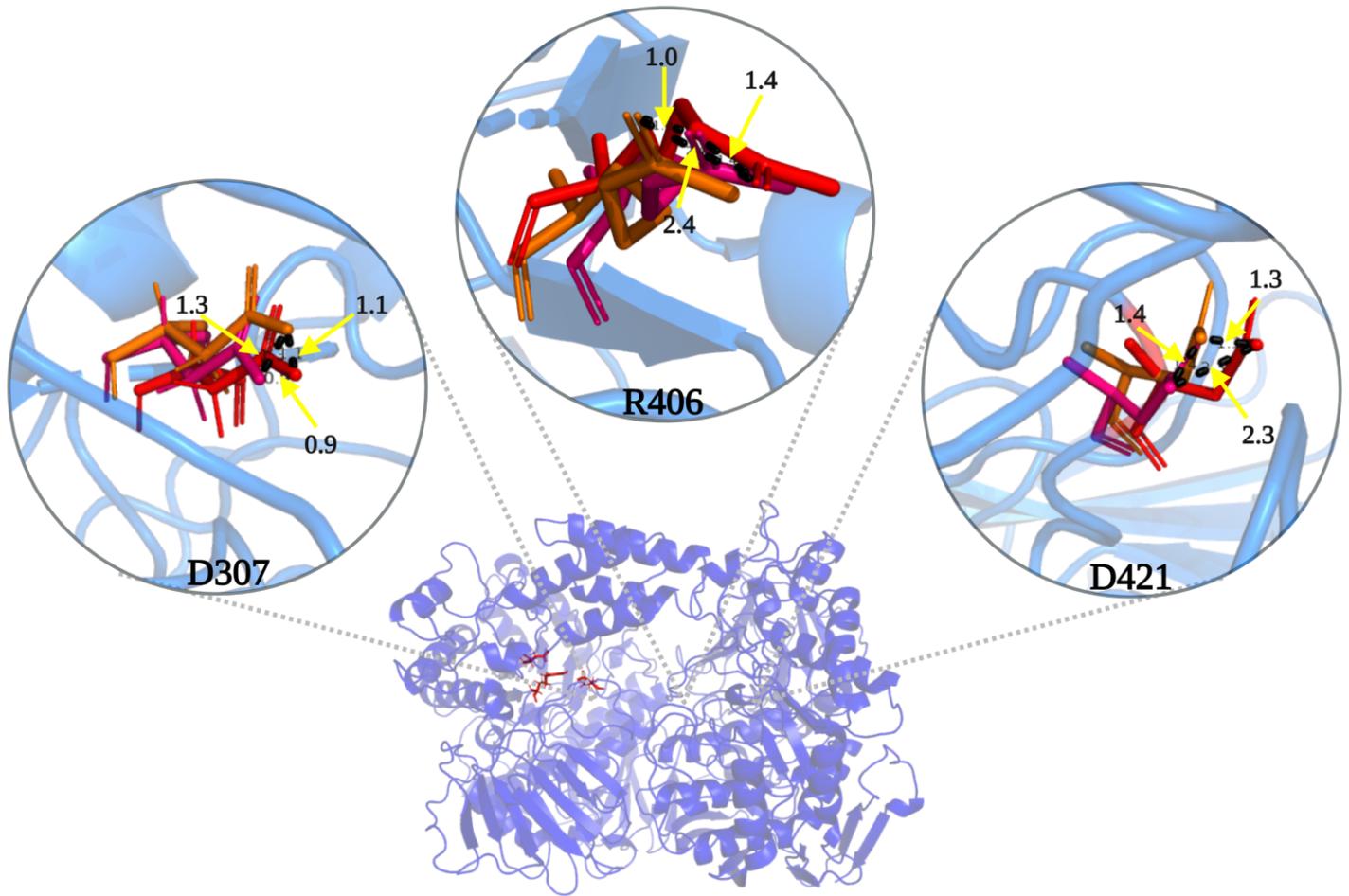


Figura 3. Aminoácidos correspondientes al sitio activo de α -glucosidasa (rojo) alineados con las estructuras de α -glucosidasa a los 0ns (sticks rojas), 20ns (sticks anaranjadas) y 50ns (sticks rosas). Las flechas amarillas y los números hacen alusión a la distancia que hay entre los átomos de cada aminoácido de α -glucosidasa. La letra “D” es por ácido aspártico y corresponde a los aminoácidos 307 y 421, mientras que la “R” es arginina y corresponde al número 406.

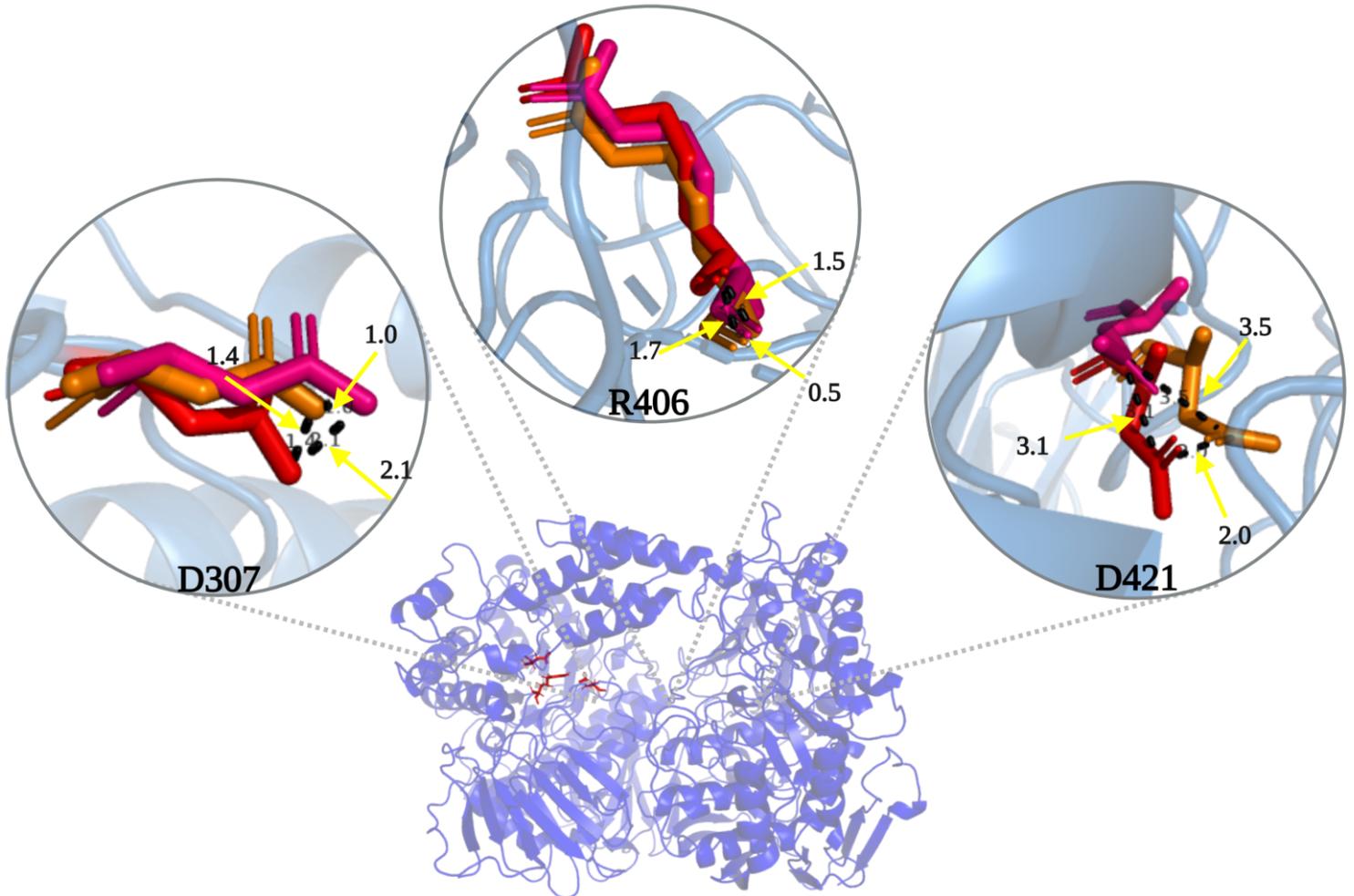


Figura 4. Aminoácidos correspondientes al sitio activo de α -glucosidasa (rojo) alineados con las estructuras de α -glucosidasa-His a los 0ns (sticks rojas), 20ns (sticks anaranjadas) y 50ns (sticks rosas). Las flechas amarillas y los números hacen alusión a la distancia que hay entre los átomos de cada aminoácido de α -glucosidasa. La letra “D” es por ácido aspártico y corresponde a los aminoácidos 307 y 421, mientras que la “R” es arginina y corresponde al número 406.

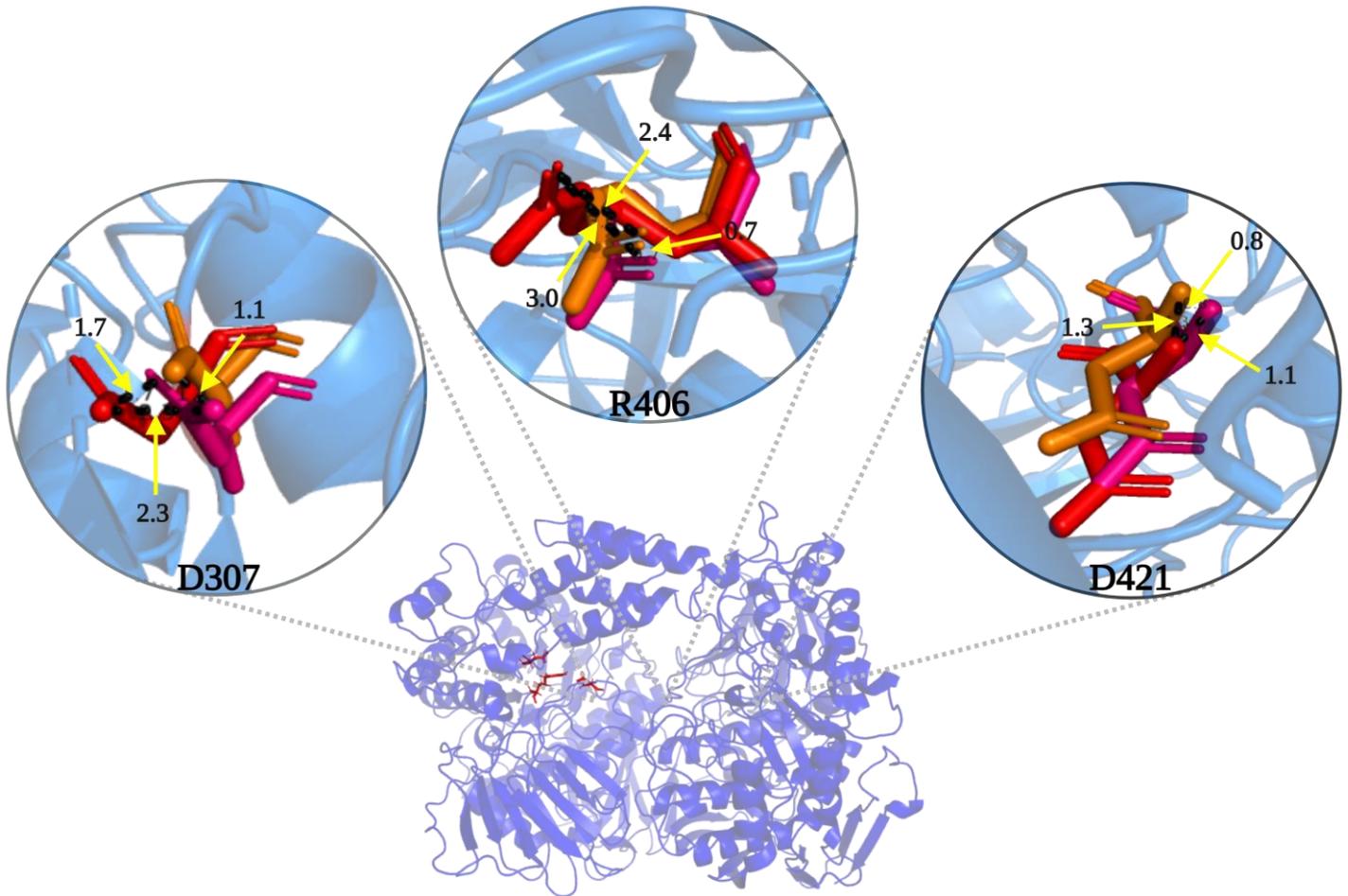


Figura 5. Aminoácidos correspondientes al sitio activo de α -glucosidasa (rojo) alineados con las estructuras de α -glucosidasa-BSA-EDTA a los 0ns (sticks rojas), 20ns (sticks anaranjadas) y 50ns (sticks rosas). Las flechas amarillas y los números hacen alusión a la distancia que hay entre los átomos de cada aminoácido de α -glucosidasa. La letra “D” es por ácido aspártico y corresponde a los aminoácidos 307 y 421, mientras que la “R” es arginina y corresponde al número 406.

11.5 Anexo 7. Estructuras alineadas de hPTP1B a los 0, 20 y 50 ns, hPTP1B-BSA-EDTA-Gli a los 0, 20 y 50 ns y de hPTP1B-Gli a los 0, 20 y 50 ns.

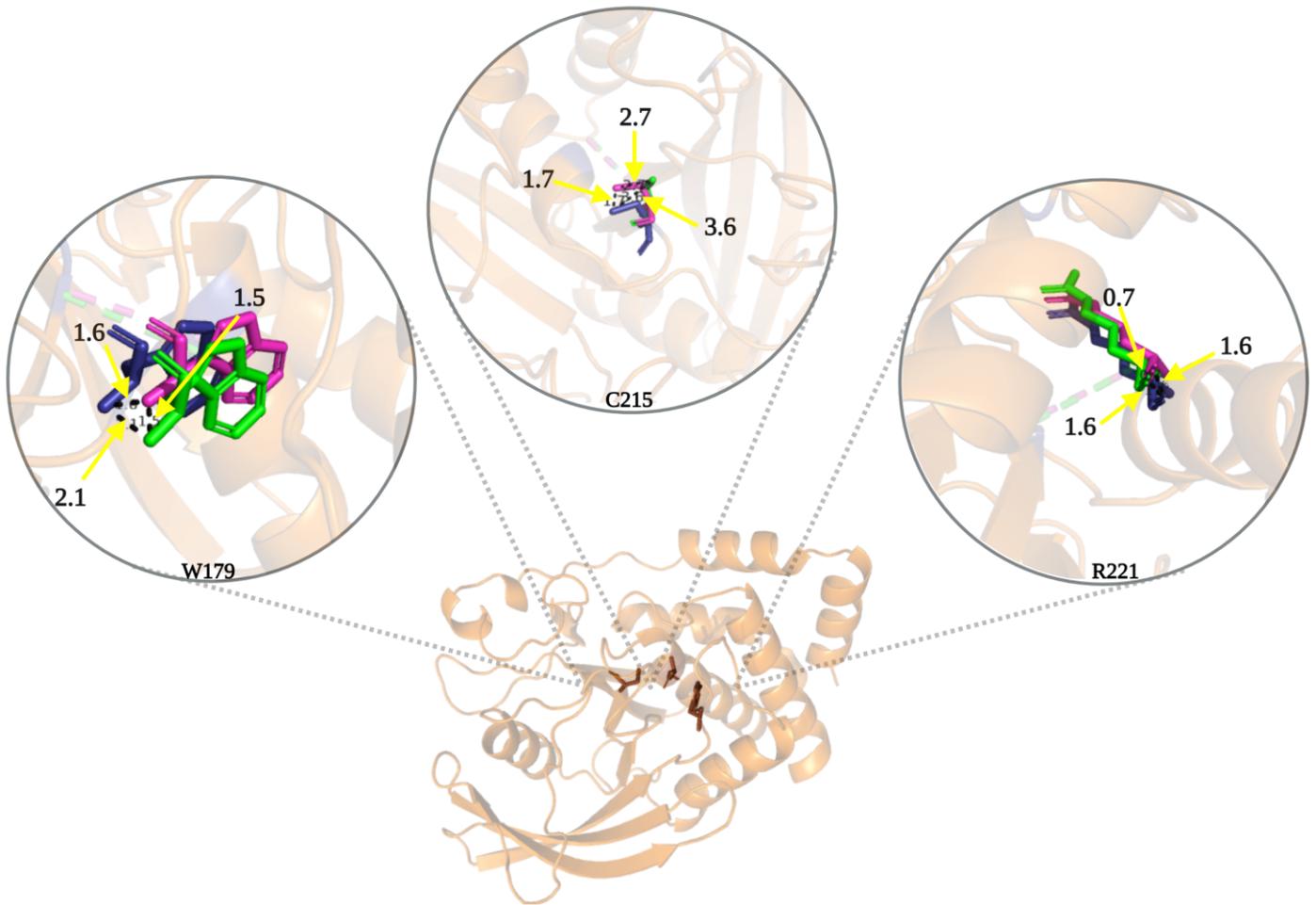


Figura 6. Aminoácidos correspondientes al sitio activo de hPTP1B alineados con las estructuras de hPTP1B a los 0ns (sticks azules), 20ns (sticks rosas) y 50ns (sticks verdes). Las flechas amarillas y los números hacen referencia a la distancia que hay entre los átomos de cada aminoácido de hPTP1B y las dos matrices utilizadas. La letra “W” es por Triptófano y corresponde al número 179, la “C” es de Cisteína y corresponde al aminoácido 215, mientras que la “R” es Arginina y corresponde al número 221.

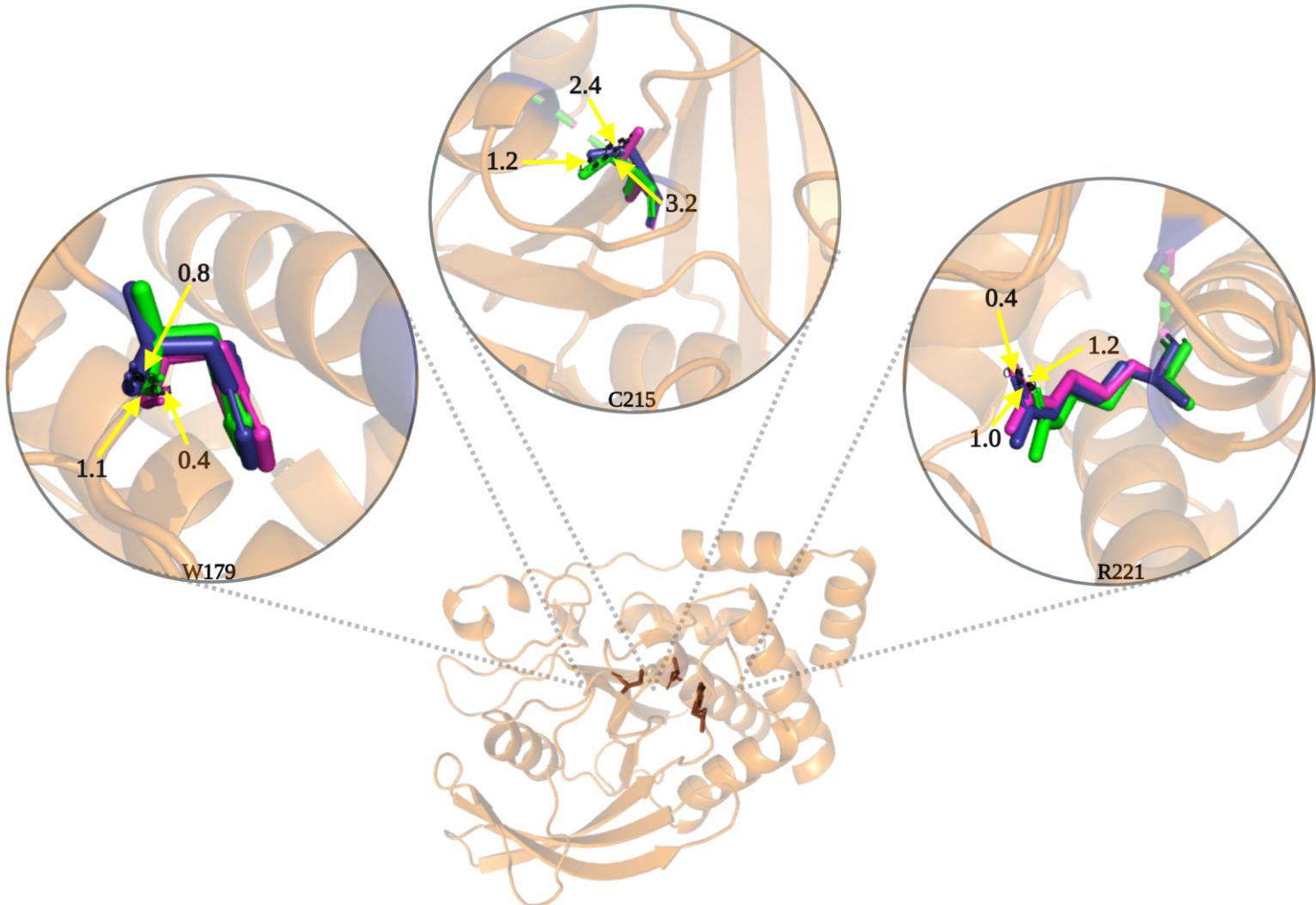


Figura 7. Aminoácidos correspondientes al sitio activo de *hPTP1B* alineados con las estructuras de *hPTP1B-Gli* a los 0ns (sticks azules), 20ns (sticks rosas) y 50ns (sticks verdes). Las flechas amarillas y los números hacen referencia a la distancia que hay entre los átomos de cada aminoácido de *hPTP1B* y las dos matrices utilizadas. La letra “W” es por Triptófano y corresponde al número 179, la “C” es de Cisteína y corresponde al aminoácido 215, mientras que la “R” es Arginina y corresponde al número 221.

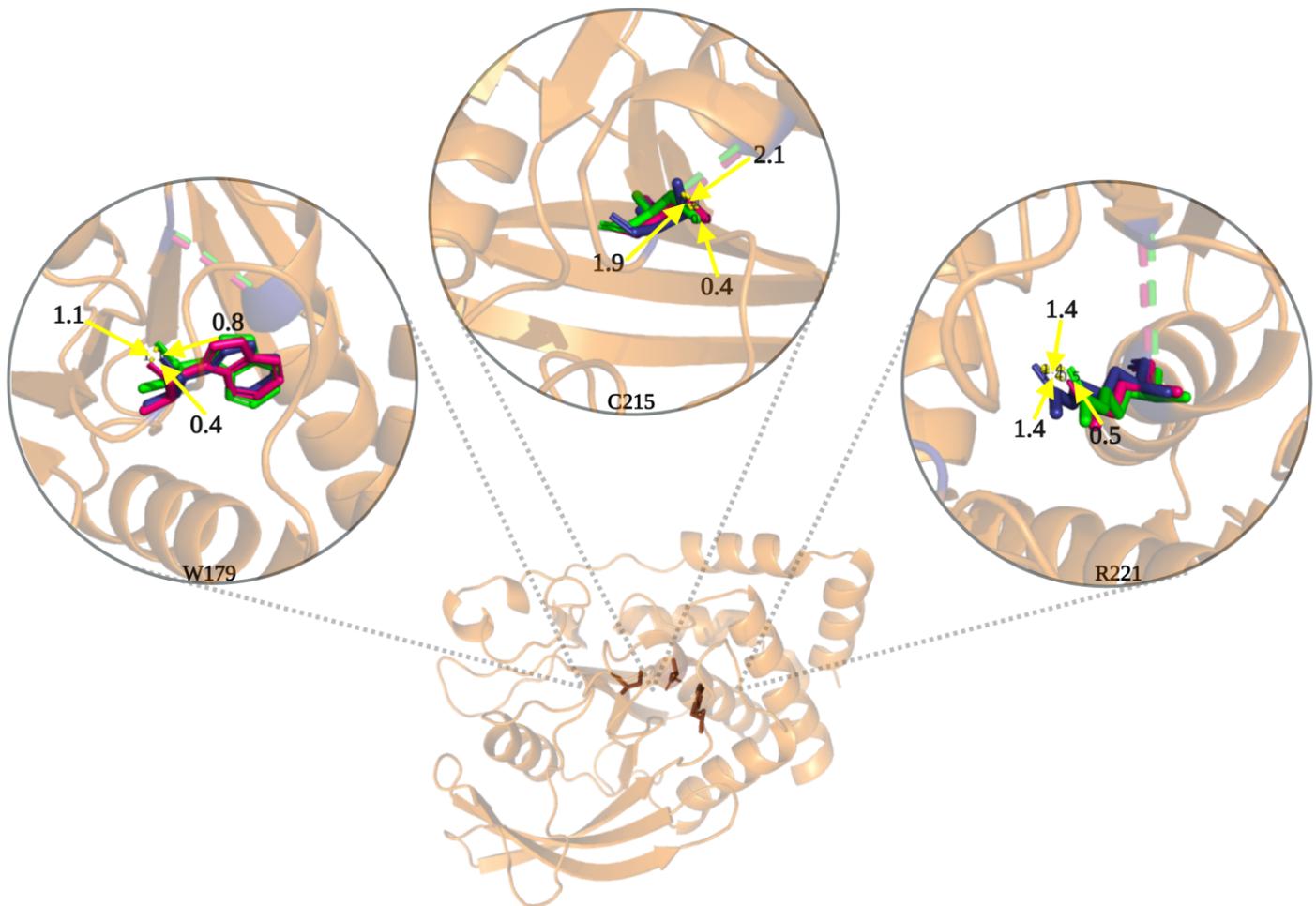


Figura 8. Aminoácidos correspondientes al sitio activo de *hPTP1B* alineados con las estructuras de *hPTP1B*-BSA-EDTA-Gli a los 0ns (sticks azules), 20ns (sticks rosas) y 50ns (sticks verdes). Las flechas amarillas y los números hacen referencia a la distancia que hay entre los átomos de cada aminoácido de *hPTP1B* y las dos matrices utilizadas. La letra “W” es por Triptófano y corresponde al número 179, la “C” es de Cisteína y corresponde al aminoácido 215, mientras que la “R” es Arginina y corresponde al número 221.