



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
CIENCIA DE LOS MATERIALES

“FISICOQUÍMICA DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS: LIPOSOMAS
COMO ACARREADORES DE INSULINA MEDIANTE UN ESTUDIO
COMPUTACIONAL”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:
SOFÍA DEL CARMEN TORRES REVUELTA

TUTOR PRINCIPAL
DR. HÉCTOR DOMÍNGUEZ CASTRO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2024



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Dra. Angélica Estrella Ramos Peña	IIM, UNAM.
Vocal:	Dr. Jorge López Lemus	UAEM.
Vocal:	Dra. Laura Domínguez Dueñas	FQ, UNAM.
Vocal:	Dra. Yareli Rojas Aguirre	IIM, UNAM.
Secretario:	Dra. Carol Siseth Martínez Caballero	IQ, UNAM.

La tesis se realizó en Instituto de Investigaciones en Materiales IIM, UNAM.

TUTOR DE TESIS:

Dr. Héctor Domínguez Castro

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, al Instituto en Investigaciones en Materiales, y a todos los profesionales con los que he tenido la suerte y fortuna de haberme formado.

Estoy en constante aprendizaje, les agradezco su infinita paciencia y oportunidades brindadas.

Gracias a mis padres, María Esther y Juan Manuel, son mi orgullo y alegría, además de a mi hermana Mariana por escucharme, abuelitos, familia y amigos por motivarme a emprender esta aventura, con su cariño y apoyo es posible el presente trabajo.

En verdad, gracias.

Sofía.

Reconocimientos

También quisiera reconocer a la coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM, además de reconocer al CONAHCyT por otorgarme una beca de la cual presento el CVU con el número 1222604, sin su increíble apoyo, esta experiencia hubiera sido truncada. Al doctor Héctor Domínguez Castro por permitirme trabajar con él como equipo de trabajo, además de prestarme su clúster de computadoras propias y del uso del proyecto DGTIC-UNAM LANCAD-UNAM-DGTIC-238, Miztli. Además de agradecer el apoyo del maestro Alejandro Pompa del IIM, por ayudarme con imprevistos del equipo de cómputo.

Por último, y no por ello menos importante, agradezco profundamente el tiempo y la dedicación que me brindaron mis sinodales: la Dra. Angélica Estrella Ramos Peña, el Dr. Jorge López Lemus, la Dra. Laura Domínguez Dueñas, la Dra. Yareli Rojas Aguirre y la Dra. Carol Siseth Martínez Caballero. Sus diferentes puntos de vista y conocimientos ampliaron mis perspectivas y enriquecieron significativamente este trabajo. Sus valiosas observaciones contribuyeron a complementar la presente investigación. Por razones de tiempo, algunas de estas observaciones quedarán como una perspectiva futura en caso de que se amplíe este estudio.

Presentaciones en congresos

1. Participación de presentación en cartel del trabajo: Estudios de bicapas de fosfolípidos, DPPC, con colesterol para el transporte de un monómero de insulina. Un análisis de estabilidad por dinámica molecular.
 - Autor: Sofía del Carmen Torres Revuelta, Héctor Domínguez Castro
 - Lugar: Congreso Internacional de la Sociedad Química de México 2023.
 - Sede: Facultad de Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí.
 - Fecha: 5 de Octubre del 2023.
2. Participación de presentación en cartel del trabajo: Stability study of phospholipid bilayers, DPPC, with cholesterol and vesicles for the transport of an insulin monomer: zeta potential and interactions of aminoacid residues with the polar heads of phospholipids, a study with molecular dynamics.
 - Autor: Sofía del Carmen Torres Revuelta, Héctor Domínguez Castro
 - Lugar: 13th Meeting on Molecular Simulation.
 - Sede: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Hotel Villa del Conquistador, Cuernavaca Morelos.
 - Fecha: 22 de Noviembre del 2023.
3. Participación de presentación del trabajo: Liposomas como acarreador de un monómero de insulina, un estudio con dinámica molecular.
 - Autor: Sofía del Carmen Torres Revuelta, Héctor Domínguez Castro
 - Lugar: XXVIII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C.
 - Sede: Facultad de Estudios Superiores Plantel Cuautitlán, Campo 1, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.
 - Fecha: 19 de Enero del 2024.

Declaración de autenticidad

Por la presente declaro que, salvo cuando se haga referencia específica al trabajo de otras personas, el contenido de esta tesis es original y no se ha presentado total o parcialmente para su consideración para cualquier otro título o grado en esta o cualquier otra Universidad. Esta tesis es resultado de mi propio trabajo y no incluye nada que sea el resultado de algún trabajo realizado en colaboración, salvo que se indique específicamente en el texto.

Sofía del Carmen Torres Revuelta. Ciudad Universitaria, CDMX, 2024

Resumen

En el presente trabajo se realizaron simulaciones computacionales por dinámica molecular, simulando bicapas y liposomas formadas a partir de fosfolípidos de DPPC (dipalmitoil fosfatidilcolina) y colesterol, para acarrear un monómero de insulina (proteína que consta de 51 aminoácidos) en un medio acuoso.

Tanto las vesículas como las bicapas fueron realizadas variando la concentración de colesterol, con la finalidad de observar cambios en la estabilidad de la membrana, graficando perfiles de densidad de los grupos funcionales concernientes a la cabeza polar (teniendo a los grupos fosfato y el grupo colina), el grupo glicerol éster y la cadena de acilos de la cola hidrofóbica. Las concentraciones de colesterol por sistema (bicapa y liposoma) fueron los siguientes: 2, 3, 5, 6, 8, 14, 20, 30, 40, 50% de colesterol por membrana de DPPC.

Se analizaron los radios de giro y los momentos de excentricidad de las vesículas en las cuales se encontró que al aumentar la concentración de colesterol, los liposomas disminuían su excentricidad, encontrando sistemas aún más esféricos con las mayores concentraciones de colesterol, esto podría deberse al fenómeno de rigidez que el colesterol tiene sobre los fosfolípidos.

Uno de los fundamentos de la estabilidad de los sistemas coloidales consiste en la carga superficial del sistema, experimentalmente se mide con el potencial zeta, pero a nivel computacional fue propuesto el análisis de los perfiles de densidad radial de cada átomo concerniente a las cabezas polares: los grupos colina y fosfato, además del glicerol éster, quienes poseen carga; posteriormente se realizó el perfil de densidad radial eléctrica, los cuales se integraron para obtener sus campos eléctricos y posteriormente el potencial eléctrico. Se reporta en el presente trabajo la diferencia de potencial de la superficie de cada vesícula así como los potenciales electrostáticos superficiales de estos sistemas.

Las interacciones estudiadas en los sistemas simulados fueron con los residuos de aminoácidos cargados positivamente con el grupo fosfato del fosfolípido: lisina ($Lys - PO_4$), arginina ($Arg - PO_4$) y los residuos de histidina ($His - PO_4$). De igual forma fue analizada la interacción del residuo glutamato (Glu) de la insulina con el grupo colina del fosfolípido ($Glu - N(CH_3)_3$), también la interacción de los demás aminoácidos polares sin carga de la insulina, como glutamina (Gln), cisteína (Cys), treonina (Thr), serina (Ser), asparagina (Asp) y prolina (Pro) con los grupos polares del fosfolípido, en las cuales se observaron energías de interacción de alta afinidad (espontáneas), algunas

variaron con respecto a la concentración de colesterol, pero no se observó una tendencia lineal.

Índice general

Índice de figuras	XIII
Índice de tablas	XVII
1 Introducción	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos particulares	3
1.2 Hipótesis	3
1.3 Planteamiento del problema	4
1.4 Metodología	4
1.5 Estructura de la tesis	4
2 Marco teórico	5
2.1 Fuerzas intermoleculares	5
2.1.1 Fuerzas dipolo-dipolo	5
2.1.2 Enlace de hidrógeno	7
2.1.3 Fuerzas de dispersión (dipolo inducido-dipolo inducido)	8
2.1.4 Fuerzas de van der Waals	8
2.1.5 Fuerzas de repulsión	9
2.2 Biomoléculas	9
2.2.1 Fosfolípidos	9
2.2.2 Colesterol	10
2.2.3 Fosfolípidos y colesterol como membranas biológicas	11
2.2.4 Aminoácidos	12
2.2.5 Proteínas	12
2.2.6 Monómero de insulina	13
2.3 Sistemas coloidales de asociación como acarreadores de fármacos	15
2.3.1 Sistema coloidal de asociación	15
2.3.2 Liposomas	16
2.3.2.1 Caracterización de liposomas	18
2.4 Simulaciones computacionales	19
2.5 Simulaciones de dinámica molecular	19

2.5.1	Dinámica	19
2.5.2	Potenciales intramoleculares	21
2.5.2.1	Distancia de enlace	21
2.5.2.2	Ángulo de enlace	21
2.5.2.3	Ángulo de torsión	22
2.5.3	Potenciales intermoleculares	23
2.5.3.1	Potencial de Lennard Jones	23
2.5.3.2	Potencial de Coulomb	24
2.5.4	Algoritmos de integración	26
2.5.4.1	Algoritmo de salto de rana	26
2.5.5	Condiciones periódicas de frontera	27
2.5.6	Convención de mínima imagen	28
2.5.7	Radio de corte	29
2.5.8	Función de distribución radial	30
2.5.9	Radio de giro	31
2.5.10	Excentricidad de un agregado esférico	31
2.6	Campo eléctrico	31
2.7	Potencial eléctrico	32
3	Metodología y simulación	35
3.1	Modelos	35
3.1.1	Dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC)	35
3.1.2	Colesterol	36
3.1.3	Monómero de insulina	36
3.2	Elaboración de los sistemas	36
3.2.1	Bicapas	37
3.2.2	Liposomas	37
3.3	Metodología de las simulaciones	38
4	Resultados y Análisis	39
4.1	Resultados de las bicapas	39
4.1.1	Perfiles de densidad parcial de bicapas	39
4.1.2	Parámetros de orden de las colas hidrofóbicas	44
4.1.3	Área por lípido de cada membrana	50
4.1.4	Energía configuracional	52
4.2	Resultados de los liposomas	54
4.2.1	Excentricidad a partir de radio de giro para liposomas esféricos	54
4.2.2	Perfiles de densidad radial de liposomas	55
4.2.3	Perfiles de densidad radial eléctricos	60
4.2.3.1	Campo, potencial eléctrico y potencial zeta	63
4.2.3.2	Potencial electrostático superficial	65
4.2.4	Interacciones de residuos de aminoácidos específicos con la cabeza polar	66

4.3	Parámetros estructurales del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas	70
4.3.1	Desviación cuadrática media (RMSD) del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas	70
4.3.2	Fluctuación cuadrática media (RMSF)	73
4.3.3	Coefficiente de difusión	75
4.3.4	Radio de giro	76
4.3.5	Puentes de Hidrógeno	79
4.3.6	Contactos	82
4.3.7	Estructura secundaria	83
5	Conclusiones	88
	Bibliografía	89

Índice de figuras

2.1	Fuerza intermolecular e intramolecular	5
2.2	Deslizamiento de densidad electrónica del H hacia el F	6
2.3	Interacciones dipolo-dipolo.	6
2.4	Enlace de hidrógeno N-H, O-H, F-H	7
2.5	Enlaces de hidrógeno intermoleculares	7
2.6	Fuerzas de dispersión instantáneas y la distribución de carga de un par de átomos de helio en tres instantes	8
2.7	Diagrama de flujo para determinar fuerzas intermoleculares	9
2.8	Estructuras de los fosfolípidos	10
2.9	Disposición de los compuestos anfipáticos en el agua	10
2.10	Estructura básica de los esteroides.	11
2.11	Estructura del colesterol	11
2.12	Aminoácidos y su clasificación	12
2.13	Ejemplo de grupo peptídico plano	13
2.14	Estructura primaria de la insulina cadenas A y B, y un fragmento de la proinsulina. La proinsulina consta de 84 aminoácidos; el péptido C, que se une a las cadenas A y B en la proinsulina, se representa en gris, pero no se muestra en su totalidad debido a limitaciones de espacio	14
2.15	Molécula del monómero de insulina.	15
2.16	Diagrama resumen de diferentes métodos de preparación de liposomas	17

2.17	Diagrama que ejemplifica el método general de preparación de suspensiones de liposomas	17
2.18	Representación del potencial zeta	18
2.19	La conexión entre el experimento, teoría y simulación por computadora	19
2.20	Interacción de 5 partículas con la partícula de prueba \mathbf{p}	20
2.21	Esquema de restricción aplicado a una molécula triatómica como el H_2O	21
2.22	Ángulo de enlace (θ)	22
2.23	Geometría del modelo de butano (C_4H_{10}), definiendo los ángulos de enlace θ , θ' , y el ángulo de torsión ϕ	22
2.24	Representación gráfica de las interacciones del potencial de Lennard-Jones	24
2.25	El algoritmo de salto de rana se llama así, porque r y v saltan como ranas	27
2.26	Una celda de 2 dimensiones de la condición periódica de frontera	28
2.27	Convención de mínima imagen de un sistema en dos dimensiones. La caja central contiene 4 moléculas, y la caja punteada fue construida con la molécula negra en su centro. El círculo rojo punteado representa el corte	29
2.28	Esquema de esfera de corte del potencial intermolecular, de radio r_c , y esfera de algoritmo de Verlet, de radio r_1 , para el átomo en negro, en una caja de simulación de arista L	30
2.29	Carga de prueba q_0 se mueve de un punto a a un punto b en un campo eléctrico E uniforme	33
3.1	Molécula de DPPC con sus etiquetas correspondientes	36
3.2	Molécula de colesterol con sus etiquetas correspondientes	36
3.3	Configuración inicial de la bicapa de 20%CHO-DPPC. Realizada con el software libre packmol [Martínez et al., 2009], formada por 16164 moléculas de agua, moléculas de dipalmitoil fosfatidilcolina y colesterol (naranja)	37
3.4	Propuesta de cálculo para elaborar los inputs de liposomas respetando el área por lípido y el grosor de la membrana del DPPC, además de brindar 10Å adicionales en el radio del liposoma para el monómero de insulina el cual esta representado en color rojo	38
4.1	Representación del cálculo del perfil de densidades en la dirección del eje Z. Se muestra la configuración final de la bicapa de 40%CHO-DPPC, formada por 16164 moléculas de agua, moléculas de dipalmitoil fosfatidilcolina y colesterol (naranja).	39
4.2	Configuraciones finales y perfiles de densidad parcial de bicapas de 8% CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina.	40
4.3	Configuraciones finales y perfiles de densidad parcial de bicapas de 30% CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina	41
4.4	Configuraciones finales y perfiles de densidad parcial de bicapas de 40% CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina	42
4.5	Configuraciones finales y perfiles de densidad parcial de bicapas de 50% CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina	43

4.6	Parámetros de orden correspondientes de carbonos hidrofóbicos deuterados contra su posición en la cadena de fosfolípido de las cadenas sn-1 y sn-2 y el parámetro de orden de primeros 10 carbonos del colesterol de los últimos 10 nanosegundos de las bicapas de 30 % CHO-DPPC, a) sin y b) con un monómero de insulina	45
4.7	Parámetros de orden correspondientes a NMR deuterados contra su posición en la cadena de fosfolípido a diferentes concentraciones de colesterol de las cadenas a) sn-1 y b) sn-2 de las bicapas sin monómero de insulina	46
4.8	Parámetros de orden correspondientes a NMR deuterados contra su posición en la cadena de fosfolípido a diferentes concentraciones de colesterol de las cadenas a) sn-1 y b) sn-2 de las bicapas con un monómero de insulina	47
4.9	Parámetros de orden correspondientes a NMR deuterados contra su posición en la cadena de colesterol, de sistemas de bicapas a diferentes concentraciones de colesterol, a) en ausencia y b) en presencia de un monómero de insulina . .	47
4.10	Promedio del parámetro de orden contra la concentración de colesterol de las cadenas sn-1, sn-2 y del colesterol de las bicapas a) en ausencia y b) en presencia de un monómero de insulina	48
4.11	Contribución de energía configuracional para las bicapas de % colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC, calculado de acuerdo a la ecuación 4.7 para las bicapas en ausencia y presencia de un monómero de insulina	53
4.12	Radio de giro y excentricidades del fosfolípido.	54
4.13	Configuraciones finales y perfiles de densidad radial de liposomas de 14 % CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina en su centro acuoso, configuraciones finales de 30ns	56
4.14	Configuraciones finales y perfiles de densidad radial de liposomas de 20 % CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina en su centro acuoso, configuraciones finales de 30ns	57
4.15	Configuraciones finales y perfiles de densidad radial de liposomas de 30 % CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina en su centro acuoso, configuraciones finales de 30ns	58
4.16	Configuraciones finales y perfiles de densidad radial de liposomas de 40 % CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina en su centro acuoso, configuraciones finales de 30ns	59
4.17	Configuraciones finales y perfiles de densidad radial de liposomas de 50 % CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina en su centro acuoso, configuraciones finales de 30ns	60
4.18	Etiquetas del DPPC.	61
4.19	Perfiles de densidad radial eléctrica de liposomas de 2 %CHO y de 20 %CHO .	62
4.20	Campo y potencial eléctrico graficado del liposoma de 0 %CHO-DPPC	63
4.21	Campo y potencial eléctrico graficado del liposoma de 2 %CHO-DPPC	64
4.22	Campo y potencial eléctrico graficado del liposoma de 6 %CHO-DPPC	64
4.23	Campo y potencial eléctrico graficado del liposoma de 14 %CHO-DPPC	65
4.24	Comparativa ΔV superficial de liposomas estudiados	66

4.25	Comparativa de energías de interacción total de residuos de aminoácidos cargados positivamente: histidina, arginina y lisina para todos los liposomas estudiados	67
4.26	Comparativa de energías de interacción total de residuos de aminoácido cargado negativamente: glutamato para todos los liposomas estudiados	68
4.27	Comparativa de energías de interacción total de residuos de aminoácidos polares sin carga: cisteína, serina y treonina con el fosfato del fosfolípido para todos los liposomas estudiados	68
4.28	Comparativa de energías de interacción total de residuos de aminoácidos polares sin carga: asparagina, glutamina, prolina con el grupo colina y el fosfato del fosfolípido para todos los liposomas estudiados	69
4.29	Comparativa de energías de interacción total de residuos de aminoácidos de sitio de interés propuestos: tirosina y fenilalanina para todos los liposomas estudiados	70
4.30	Gráficos de RMSD del monómero de insulina respecto a su estructura inicial (cristalográfica) con la estructura final despues de la simulación de 30 nanosegundos, a) bicapa y b) liposoma a 6 % CHO-DPPC	71
4.31	Gráficos de RMSD del monómero de insulina respecto a su estructura inicial (cristalográfica) con la estructura final despues de la simulación de 30 nanosegundos, a) bicapa y b) liposoma a 14 % CHO-DPPC	72
4.32	Gráficos de RMSD del monómero de insulina respecto a su estructura inicial (cristalográfica) con la estructura final despues de la simulación de 30 nanosegundos, a) bicapa y b) liposoma a 50 % CHO-DPPC	73
4.33	Gráficos de RMSF de los atomos C_{α} calculados de los ultimos 10 nanosegundos. Las líneas representan al monómero de insulina en su sistema a) bicapa y b) liposoma a 6 % CHO-DPPC	74
4.34	Gráficos de radio de giro del monómero de insulina en un sistema de liposoma a diferentes concentraciones de %CHO-DPPC a) 2 %CHO-DPPC y b) 40 % CHO-DPPC	78
4.35	Representación de la formación de un puente de hidrógeno	79
4.36	Gráficos de puentes de hidrógeno intramolecular del monómero de insulina en su sistema a) bicapa y b) liposoma a 40 % CHO-DPPC	80
4.37	Gráficos de DSSP de los atomos C_{α} calculados sobre los 30 nanosegundos de simulación. Las líneas representan al monómero de insulina en su sistema a) bicapa y b) liposoma a 6 % CHO-DPPC	84
4.38	Gráficos de DSSP de los atomos C_{α} calculados sobre los 30 nanosegundos de simulación. Las líneas representan al monómero de insulina en su sistema a) bicapa y b) liposoma a 14 % CHO-DPPC	85
4.39	Gráficos de DSSP de los atomos C_{α} calculados sobre los 30 nanosegundos de simulación. Las líneas representan al monómero de insulina en su sistema a) bicapa y b) liposoma a 50 % CHO-DPPC	86

Índice de tablas

4.1	Divisiones residuales del cuadripolos de deuterio residual ($\Delta\nu_Q$) en kHz para el primer carbono de las colas hidrofóbicas sn-1 y sn-2 del fosfolípido de bicapas de DPPC con diferentes concentraciones de colesterol en ausencia y presencia de un monómero de insulina.	49
4.2	Área por lípido de las bicapas de acuerdo a su concentración de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC) y la presencia del monómero de insulina en el área por lípido de la membrana calculadas de acuerdo a la ecuación 4.4.	51
4.3	Volumen de los sistemas de bicapas de acuerdo a su concentración de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC) y la presencia del monómero de insulina de la membrana, calculadas de acuerdo a la ecuación 4.5.	52
4.4	Carga asociada a átomos del fosfolípido DPPC.	61
4.5	Coeficiente de difusión del monómero de insulina para los sistemas de bicapa y liposoma de acuerdo a su concentración de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC)	76
4.6	Radio de giro del monómero de insulina para los sistemas de bicapa y liposoma de acuerdo a su concentración de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC) calculadas de acuerdo a la ecuación 4.8	77
4.7	Puentes de hidrógeno intramoleculares del monómero de insulina para los sistemas de bicapa y liposoma de acuerdo a su concentración de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC) calculadas de acuerdo al criterio del software Gromacs y la ecuación 4.20	81
4.8	Número de contactos del fosfolípido (DPPC) y las moléculas de agua con el monómero de insulina para los sistemas de bicapa y liposoma, reportados de acuerdo a su concentración de colesterol-fosfolípido (%CHO-DPPC)	82

Introducción

En 1965, en la Universidad de Cambridge utilizaron lípidos en polvo que, al entrar en contacto con el agua, se reorganizaron espontáneamente formando estructuras esféricas denominadas liposomas, en honor a su composición de lípidos (*lipos*, grasa; *soma*, cuerpo) [Bangham et al., 1965]. Los liposomas son sistemas coloidales de asociación cuya función y desarrollo son como acarreadores de fármacos, los cuales protegen al principio activo, el cual, puede ser lábil para diferentes condiciones fisiológicas. Su estabilidad es crucial para asegurar el transporte y la llegada del fármaco al sitio de acción farmacológica. Los lípidos que componen los liposomas incluyen fosfolípidos y colesterol.

Desde entonces, se han producido liposomas con una amplia variedad de tamaños y composiciones. Estos se clasifican según su tamaño en cuatro categorías, vesículas unilamelares pequeñas (SUV, con un tamaño en rango de $0.02\text{-}0.20\mu\text{m}$), vesículas medianas de una lamela (MUV, tamaño en rango de $0.20\text{-}0.50\mu\text{m}$), vesículas de una lamela grandes (LUV, de $0.5\text{-}10\mu\text{m}$) y vesículas unilamelares gigantes (GUV, de $100\text{ a }200\mu\text{m}$) [Anandrao and Kandekar, 2022, Almgren et al., 2000, Bozzuto and Molinari, 2015]. Asimismo, se distinguen por su lamelaridad en oligolamelares (OLV, con menos de 5 lamelas), multilamelares (de 5 a 20 lamelas) y multivesiculares (MVV, con más de 50 lamelas) [Lasic, 1992, Shah et al., 2020, Szoka and Papahadjopoulos, 1981].

La administración de insulina mediante liposomas ha sido objeto de investigación desde hace varias décadas. En 1990, Spangler [Spangler, 1990] propuso el uso de liposomas compuestos por colesterol, lecitina, digalactosil diglicérido y esfingosina, con el objetivo de mejorar la absorción oral de la insulina y prolongar su efecto. Estos liposomas, con un diámetro promedio de 80 nm, fueron diseñados para dirigirse a los hepatocitos, lo que podría mejorar su eficacia en la terapia de insulina.

Siguiendo esta línea de investigación, en 1997, Iwanaga [Iwanaga et al., 1997] propuso otro enfoque utilizando liposomas para la administración oral de insulina en ratas wistar. Estos liposomas, compuestos por DPPC, colesterol, DSPE-PEG e insulina bovina, mostraron resultados prometedores a pesar de tener un rango de diámetros más amplio, de 300 nm a $1\mu\text{m}$.

A lo largo de los años, diferentes investigadores han explorado diversas vías de adminis-

tración para mejorar la eficacia de la insulina. En 2006, Huang [Huang and Wang, 2006] propuso la administración pulmonar de insulina mediante liposomas, utilizando una combinación específica de fosfolípidos y PEG para diseñar partículas de tamaño nanométrico.

Además, en 2007, Jain [Jain et al., 2007] investigó la administración nasal y ocular de insulina utilizando liposomas recubiertos con quitosano y carbopol 974. Estos estudios demostraron un mayor efecto hipoglucémico por vía nasal, destacando la importancia de las estrategias de administración alternativas.

A pesar de estos avances, la administración oral de insulina sigue siendo un desafío debido a las condiciones del tracto gastrointestinal. Sin embargo, en la última década, la nanotecnología ha surgido como una prometedora opción para superar estas barreras. En 2021, Zhang [Zhang et al., 2021] y sus colegas desarrollaron nanoliposomas para la administración oral de insulina, utilizando tecnología "layer by layer" para recubrir los liposomas con capas de quitosano e insulina, lo que podría mejorar la estabilidad y la eficacia del fármaco.

Aunque aún quedan desafíos por superar, como el bajo encapsulamiento de insulina en algunas formulaciones, el desarrollo de nanoliposomas como el HDV de Diasome Pharmaceuticals Inc [Caster et al., 2017] ha llegado a ensayos clínicos de fase III, mostrando un progreso significativo en la búsqueda de alternativas a la administración tradicional de insulina mediante inyecciones subcutáneas.

El uso de simulaciones computacionales ha revolucionado el estudio de sistemas de transporte de fármacos, brindando una perspectiva detallada a través de técnicas como la dinámica molecular. En los años 90, Berger y colaboradores [Berger et al., 1997] fueron pioneros en esta área, realizando mediciones del área por lípido del DPPC y desarrollando campos de fuerza que se convirtieron en estándares en la investigación. Los primeros estudios se centraron en simular interacciones entre fosfolípidos para imitar las membranas celulares. Por ejemplo, Koubi y su equipo [Koubi et al., 2000] investigaron la interacción entre DPPC y halotano en una bicapa lipídica, observando cómo el halotano se distribuía en la cadena de acilos lipídicos.

Investigaciones posteriores, como las llevadas a cabo por Risselada y sus colegas, se enfocaron en desarrollar vesículas utilizando únicamente fosfolípidos en modelos de grano grueso. Lograron formar estas vesículas después de largos periodos de simulación, empleando campos de fuerza específicos para los fosfolípidos [Risselada and Marrink, 2009]. Aunque las simulaciones con modelos de grano grueso han sido útiles para comprender la estructura y estabilidad de los liposomas, tienen limitaciones para reproducir comportamientos a nivel atómico. Por ejemplo, estudios como el de Jambeck y sus colegas [Jambeck et al., 2014] han mostrado la formación de agregados de fármacos que no pueden ser totalmente modelados con estos enfoques.

Para abordar estos desafíos, investigadores como Nejabat y su equipo [Nejabat et al., 2022] han utilizado dinámica molecular para estudiar sistemas de transporte de fármacos más complejos. En su estudio, exploraron el comportamiento de nanopartículas de quitosano y tripolifosfato para el transporte de insulina, combinando experimentos *in vitro* con simulaciones *in silico* utilizando modelos de grano grueso.

Estos avances demuestran el papel crucial de las simulaciones computacionales en el diseño y estudio de sistemas de transporte de fármacos, aunque también destacan la necesidad de desarrollar enfoques más sofisticados para capturar completamente la complejidad de estos sistemas a nivel molecular.

En este trabajo se analizaron los fenómenos de encapsulamiento a nivel físicoquímico y evaluar las interacciones electrostáticas entre la insulina y las bicapas lipídicas. Se propuso estudiar simulaciones por dinámica molecular de acarreadores de fármacos cuyo propósito sea el transporte de insulina, se utilizaron modelos atomísticos; haciendo análisis de bicapas y liposomas de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) junto con colesterol a diferentes concentraciones, como acarreadores de un monómero de insulina.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Estudiar mediante técnicas de dinámica molecular los procesos de ensamblaje que existen en una membrana fosfolipídica con colesterol a través de sus interacciones hidrofóbicas en un medio acuoso para formar un liposoma, con la finalidad de conocer las interacciones físicoquímicas de los fosfolípidos de acuerdo a sus porcentajes de colesterol por membrana para emplear a los liposomas como un sistema acarreador de un monómero de insulina.

1.1.2. Objetivos particulares

Construir las bicapas y liposomas para analizar la variación de los diferentes sistemas con respecto a la concentración de colesterol por membrana de fosfolípidos de DPPC y la presencia de un monómero de insulina, ubicando las propiedades de los grupos funcionales que interactúan a nivel físicoquímico en la membrana.

Estudiar la influencia del colesterol en la estabilidad de la membrana para encontrar su concentración óptima para acarrear un monómero de insulina.

Observar la influencia del monómero de insulina en la bicapa, todo ello para sostener los fundamentos en la construcción de estos sistemas acarreadores.

Analizar la energía e interacciones electrostáticas de la insulina sobre las paredes de la bicapa de fosfolípidos.

1.2. Hipótesis

El colesterol, por su naturaleza hidrofóbica influirá en la estructura de una membrana de fosfolípidos en una bicapa o en vesículas (llamadas liposomas) orientándose paralelamente a las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos, también se espera que existan interacciones entre los residuos de aminoácidos de la insulina, los fosfolípidos y el

colesterol por la variedad de los residuos de aminoácidos que posee (polares, no polares, ácidos, básicos, neutros) para acarrear al monómero de insulina para asegurar la permanencia de la estructura de la membrana y de la proteína. Estableciendo las condiciones moleculares óptimas para la construcción de liposomas con insulina como una perspectiva a futuro que permita la construcción experimental de ellos para su uso y aplicaciones en la terapia de la diabetes.

1.3. Planteamiento del problema

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que afecta a la población mexicana, de la cual, la diabetes mellitus tipo I es conocida como la insulino dependiente, es decir, el cuerpo no produce suficiente insulina para que esta disminuya la concentración de glucosa en la sangre. La vía de administración tradicional de la insulina para este padecimiento crónico es subcutánea a 5cm del ombligo, por lo cual, se administra cerca de donde se necesita, el intestino.

Los sistemas acarreadores de fármacos son una propuesta para vías de administración menos invasivas, además de que buscan una buena biodisponibilidad, los liposomas, al tener una estructura similar a las membranas biológicas (fosfolípidos y colesterol), son una vía llamativa para el estudio *in silico* de su estabilidad como acarreador de insulina.

1.4. Metodología

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de la interacción entre los fosfolípidos con la proteína, analizando la estabilidad de las membranas. Para llegar a ello fueron llevadas a cabo diferentes simulaciones por dinámica molecular, lo cual se ahonda los detalles en el capítulo 3 de la presente tesis, "Diseño del experimento y metodología".

1.5. Estructura de la tesis

Este trabajo se encuentra dividido en 5 capítulos, los cuales consisten en: introducción, marco teórico, metodología y simulación, análisis de resultados, conclusiones, y un apartado final de referencias bibliográficas.

2.1. Fuerzas intermoleculares

Las fuerzas intermoleculares son las fuerzas de atracción entre las moléculas, responsables de formar los diversos estados condensados de la materia y también, de todas las propiedades macroscópicas de la materia (punto de fusión, ebullición; en general estas aumentan con respecto a la magnitud de fuerza intermolecular) [Chang, 1992, Huheey et al., 1997].

Las fuerzas intermoleculares son más débiles que las fuerzas intramoleculares (enlace químico). Como se ve en la figura 2.1, las fuerzas intramoleculares se ejemplifican como un enlace covalente con una contribución iónica, y las fuerzas intermoleculares como puentes de hidrógeno, mismos que son abordados más adelante a profundidad.

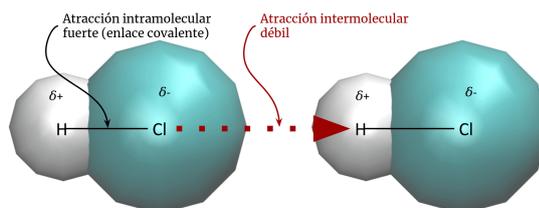


Figura 2.1: Fuerza intermolecular e intramolecular

[Brown et al., 2014]

Dependiendo del estado físico de una sustancia (gas, líquido o sólido) y la naturaleza de las moléculas, más de un tipo de interacción puede jugar un papel en la atracción total entre moléculas [Chang, 1992].

2.1.1. Fuerzas dipolo-dipolo

Para explicar las fuerzas dipolo-dipolo, es necesario mencionar que los átomos tienen una electronegatividad intrínseca, la cual indica la habilidad de un átomo para atraer electrones de un enlace químico [Chang, 1992, Huheey et al., 1997]. Al existir un enlace químico entre dos átomos, uno más electronegativo que el otro, genera una redistribución en la densidad electrónica del átomo menos electronegativo al más electronegativo, generando una separación de carga en la molécula, ejemplificado en la figura 2.2 [Huheey et al., 1997, Chang, 1992].

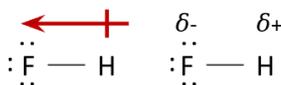


Figura 2.2: Deslizamiento de densidad electrónica del H hacia el F

Para mantener la neutralidad eléctrica en una molécula diatómica eléctricamente neutra, debe tener cargas en ambas terminales de la molécula iguales en magnitud y de signo opuesto [Chang, 1992]. Las fuerzas dipolo-dipolo son fuerzas que actúan entre moléculas polares, esto es, entre moléculas que tienen momento dipolar (μ), ver ecuación 2.1:

$$\mu = Q \cdot r \quad (2.1)$$

Q se refiere a la magnitud de la carga, siendo siempre positiva y r a la distancia de separación del enlace [Chang, 1992].

Las fuerzas dipolo-dipolo ocurren entre moléculas polares como resultado de interacciones electrostáticas [McMurry and Drašar, 2011] entre el extremo parcialmente positivo de una molécula y el extremo parcialmente negativo de una molécula vecina (son efectivas las fuerzas dipolo-dipolo si las moléculas tienen mutua cercanía) [Huheey et al., 1997], como se aprecia en la figura 2.3.

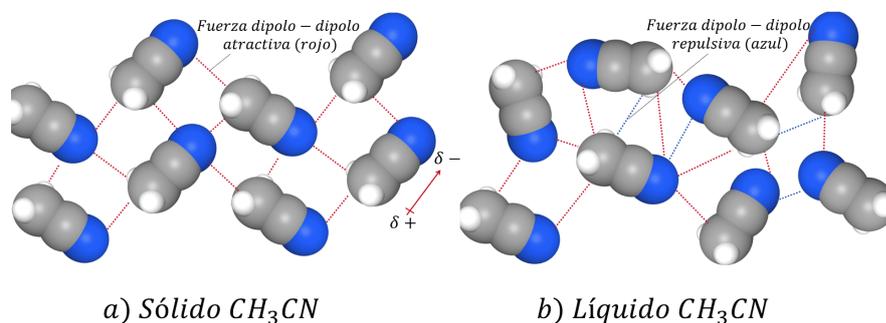


Figura 2.3: Interacciones dipolo-dipolo.

a) interacciones dipolo dipolo atractivas (esto porque ambos extremos de las moléculas vecinas poseen diferente carga parcial) y en b) interacciones dipolo dipolo repulsivas (las cargas parciales de las moléculas vecinas son las mismas, entonces se repelen)[Brown et al., 2014]

2.1.2. Enlace de hidrógeno

La interacción más importante a nivel no covalente en moléculas biológicas es el enlace de hidrógeno [McMurry and Drašar, 2011]. En esencia, un enlace de hidrógeno es una interacción dipolo-dipolo muy fuerte involucrando enlaces O-H o N-H. El átomo de hidrógeno no tiene electrones internos, por lo que el lado positivo del dipolo de enlace tiene la carga concentrada en el núcleo de hidrógeno. Esta carga positiva es atraída hacia la carga negativa del átomo electronegativo de una molécula vecina. Otros ejemplos de enlaces de hidrógeno intermoleculares se ven en la figura 2.4.

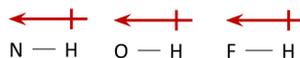


Figura 2.4: Enlace de hidrógeno N-H, O-H, F-H

El hidrógeno, siendo pequeño y deficiente de electrones, puede acercarse a un átomo electronegativo e interactuar fuertemente con éste. La energía promedio del enlace de hidrógeno es bastante mayor a la interacción dipolo-dipolo (más de 40 kJ/mol) [Chang, 1992]. Así los enlaces de hidrógeno constituyen una poderosa fuerza en la determinación de la estructura y propiedades de muchos compuestos. La figura 2.5 ejemplifica enlaces de hidrógeno intermoleculares.

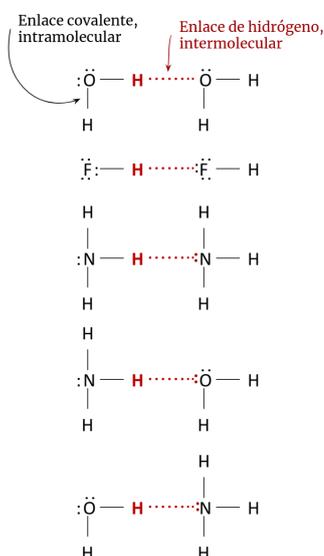


Figura 2.5: Enlaces de hidrógeno intermoleculares

[Brown et al., 2014]

2.1.3. Fuerzas de dispersión (dipolo inducido-dipolo inducido)

Las fuerzas de dispersión (o fuerzas de dispersión de London) ocurren entre todas las moléculas vecinas y surgen a causa de que la distribución de electrones entre moléculas está en constante cambio [McMurry and Drašar, 2011], ocurren como interacciones electrostáticas entre átomos y moléculas no polares, lo que significa que son eléctricamente neutras [Chang, 1992].

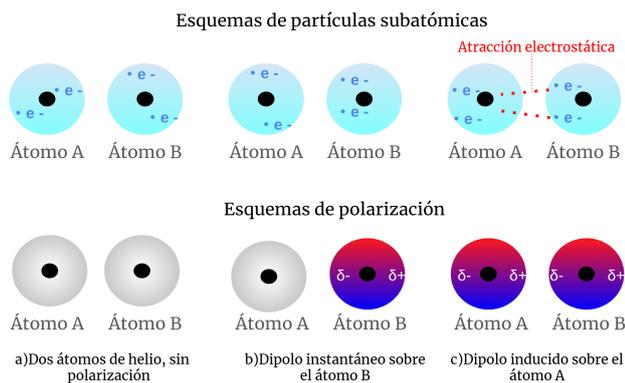


Figura 2.6: Fuerzas de dispersión instantáneas y la distribución de carga de un par de átomos de helio en tres instantes

[Brown et al., 2014]

Al ser átomos no polares, significa que carecen de un momento dipolar permanente,

pero, la distribución instantánea de los electrones puede ser diferente a la distribución promedio [Brown et al., 2014]. Los movimientos de los electrones de un átomo influyen en los movimientos de electrones de sus átomos cercanos. Pueden existir tres momentos diferentes que se ejemplifican en la figura 2.6.

El primer momento (incisos b y c en la figura 2.6), es el momento dipolar instantáneo: en este instante ambos electrones de un átomo de helio quedan en un lado del núcleo, por lo cual, el dipolo instantáneo de un átomo puede inducir un dipolo temporal en un átomo adyacente, ocasionando que los átomos se atraigan.

La facilidad con la que la distribución de carga se distorsiona se conoce como polarizabilidad. Las fuerzas de dispersión comúnmente aumentan con la masa molecular debido a que las moléculas con una masa molar grande tienden a tener más electrones, y las masas molares grandes a menudo indican átomos grandes, cuya distribución electrónica es más fácil perturbar debido a que los electrones externos están menos fuertemente atados al núcleo [Chang, 1992].

2.1.4. Fuerzas de van der Waals

Las fuerzas dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido y de dispersión, constituyen las fuerzas de van der Waals. Estas fuerzas son de atracción y juegan un papel importante en la determinación de las propiedades físicas de las sustancias [Chang, 1992]. El diagrama de la figura 2.7, ayuda a determinar las fuerzas intermoleculares.

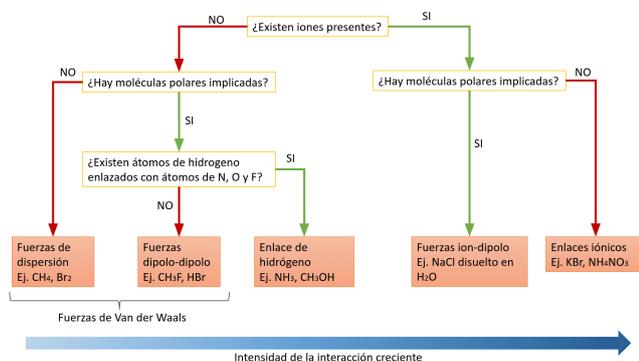


Figura 2.7: Diagrama de flujo para determinar fuerzas intermoleculares [Brown et al., 2014]

La distancia entre moléculas en un sólido o un líquido está determinada por el balance entre las fuerzas de van der Waals de atracción y las fuerzas de repulsión entre los electrones y sus núcleos.

El radio de van der Waals es la mitad de la distancia entre 2 átomos enlazados, equivalentes en su distribución más estable, esto es cuando las fuerzas netas de atracción están al máximo [Chang, 1992].

2.1.5. Fuerzas de repulsión

Las moléculas también ejercen fuerzas de repulsión entre ellas. Así, cuando dos moléculas están en contacto, entra en juego la repulsión entre los electrones y los núcleos de las moléculas; la magnitud de las fuerzas de repulsión aumenta a medida que la separación entre las moléculas en el estado condensado disminuye [Chang, 1992].

2.2. Biomoléculas

2.2.1. Fosfolípidos

Los fosfolípidos son los componentes principales de las membranas biológicas. La característica común de ellos es que contienen un residuo de ácido fosfórico esterificado con el grupo sn-C-3 del glicerol [Koolman and Röhm, 2004], como se observa en los fosfatidatos en la figura 2.8. Debido a la presencia del residuo fosfatidato, a pH neutro los fosfolípidos tienen por lo menos una carga negativa.

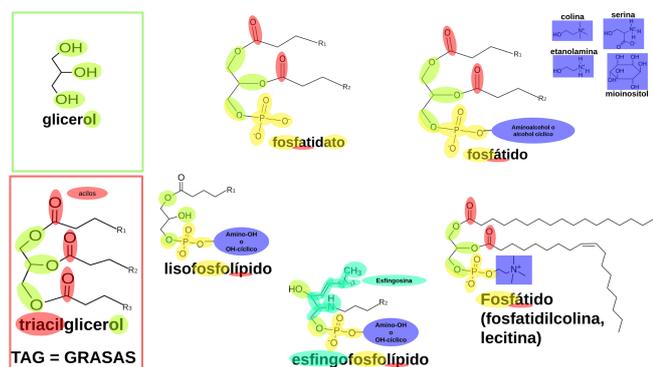


Figura 2.8: Estructuras de los fosfolípidos

[Koolman and Röhm, 2004]

Los fosfatidatos son ésteres fosfato del diacilglicerol que constituyen productos intermedios en la biosíntesis de las grasas y de los fosfolípidos [Koolman and Röhm, 2004, Malinovsky, 2022]. En la figura 2.8 se explica la estructura general de los fosfolípidos componentes principales de las membranas biológicas. La fosfatidilcolina (lecitina) es el fosfolípido más común de las membranas, su estructura también se aprecia en la figura 2.8.

Los fosfolípidos tienden a formar membranas dobles en medios acuosos, como se observa en la figura 2.9, debido a la anfipatía que poseen al tener una cabeza polar y dos colas hidrocarbonadas como estructura.

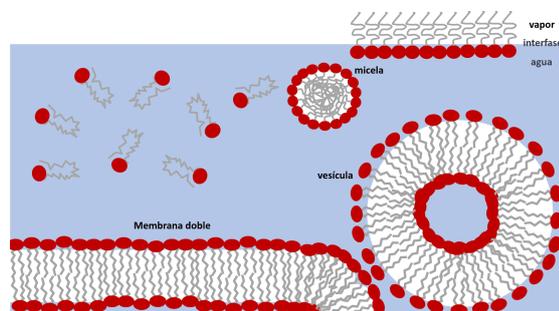


Figura 2.9: Disposición de los compuestos anfipáticos en el agua
[Koolman and Röhm, 2004]

2.2.2. Colesterol

Los tres grupos más importantes de esteroides son los esteroides, los ácidos biliares y las hormonas esteroides. Los esteroides son alcoholes esteroides que contienen un grupo hidroxilo en posición β en el C-3 y uno o más dobles enlaces en el anillo B (ver figura 2.11) y en la cadena lateral; carecen de otras funciones ácidas como los grupos carbonilo y carboxilo [Koolman and Röhm, 2004].

Todos los esteroides contienen un núcleo formado por cuatro anillos saturados que se llama gonano. Por otro lado, el colestano es la estructura básica de los esteroides (alcoholes esteroides), como se observa en la figura 2.10.

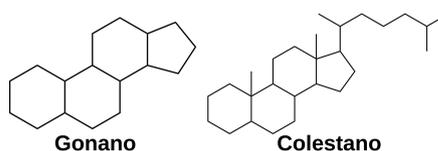


Figura 2.10: Estructura básica de los esteroides.

El esteroide más importante en los animales es el colesterol, estructura que se observa en la figura 2.11, que se encuentra presente en todos los tejidos animales pero en especial en el tejido nervioso [Cox and Lehninger, 2009, Malinovsky, 2022], es un componente esencial de las membranas celulares, en las cuales regula la fluidez, lo que se ahondará en la siguiente subsección.

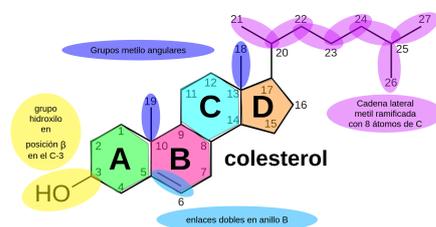


Figura 2.11: Estructura del colesterol

2.2.3. Fosfolípidos y colesterol como membranas biológicas

Los lípidos de la membrana son moléculas fuertemente anfipáticas con un grupo polar hidrófilo en su cabeza y una cola apolar hidrófoba. Los componentes de las membranas se mantienen unidos y pueden desplazarse de un lado a otro de su superficie en primer lugar por el efecto hidrófobo y fuerzas débiles de van der Waals. Esto confiere a la membrana un carácter más o menos líquido [Koolman and Röhm, 2004].

La fluidez de las membranas depende de la composición de los lípidos y de la temperatura circundante. A una temperatura de transición determinada las membranas pasan de una estructura semicristalina a un estado líquido [Pinkwart et al., 2019]. Los dobles enlaces de residuos acilo insaturados en las cadenas alquilo causan una alteración del estado semicristalino de la membrana. Por ende, la temperatura de transición será más baja cuanto mayor sea la proporción de lípidos insaturados [Malinovsky, 2022, Koolman and Röhm, 2004].

El contenido de colesterol también incide en la fluidez de la membrana. Mientras que el colesterol aumenta la fluidez de las membranas semicristalinas (estrechamente empaquetadas), las membranas fluidas se solidifican con un alto contenido de lípidos no saturados [Pinkwart et al., 2019, Koolman and Röhm, 2004].

2.2.4. Aminoácidos

Los aminoácidos son las unidades básicas de los péptidos y las proteínas. En el código genético (a nivel de codones, sólo estos aminoácidos pueden ser incorporados por traducción a las proteínas) se consideran los veinte aminoácidos proteicos, y son los que se encuentran regularmente en las proteínas [Cox and Lehninger, 2009] y se observan en la figura 2.12. Su clasificación se basa por un lado en la estructura química de su cadena lateral y por el otro en su polaridad.

En los lípidos también se encuentran aminoácidos o sus derivados como unidades básicas, como por ejemplo la serina en los fosfolípidos y la glicina en sales biliares [Koolman and Röhm, 2004].

Todos los aminoácidos tienen al menos dos grupos ionizables y por ese motivo su carga eléctrica depende del pH. Los grupos COOH se encuentran en el carbono α .

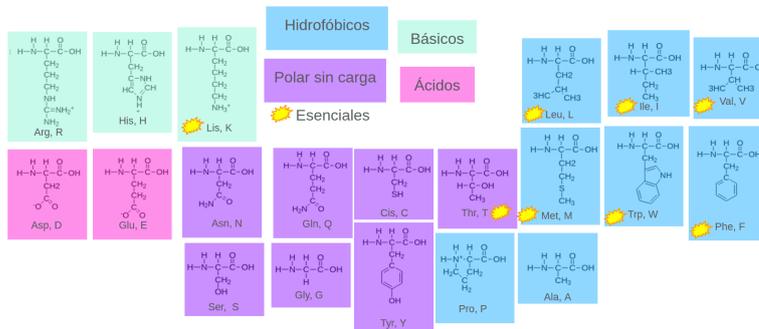


Figura 2.12: Aminoácidos y su clasificación

La carga eléctrica de los péptidos y las proteínas está determinada fundamentalmente por los aminoácidos ácidos y básicos que posea, es decir, su cadena lateral cargada positiva o negativamente.

El aminoácido en estudio presenta un comportamiento particular en su punto isoeléctrico (pI), donde adopta una estructura dipolar neutra conocida como zwitterión. En la referencia [Yveline and et al, 2007], se incluye una tabla con los valores de pKa de los 20 aminoácidos, los cuales pueden ser de gran utilidad en el ámbito experimental.

2.2.5. Proteínas

La unión de dos o más aminoácidos por uniones ácido-amida entre los grupos α -carboxilo y α -amino [Koolman and Röhm, 2004, Cox and Lehninger, 2009] mediante un enlace peptídico, forma un péptido. El enlace peptídico es rígido y plano, como se ve en la figura 2.13, por lo que las cadenas peptídicas tienen una dirección y por lo mismo dos extremos, el amino terminal (terminal N) que contiene un grupo amonio libre, y el terminal carboxilo (terminal C), formado por el carboxilato del último aminoácido.

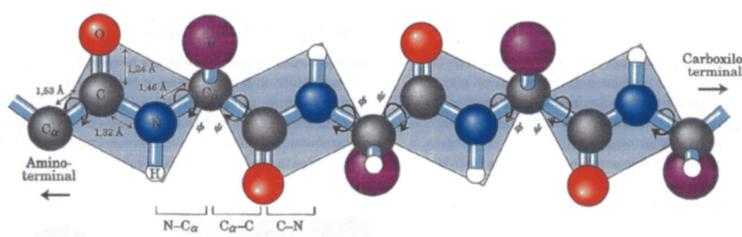


Figura 2.13: Ejemplo de grupo peptídico plano

[Cox and Lehninger, 2009]

Para describir la secuencia de aminoácidos, basta con ordenar de manera consecutiva las tres letras (o una sola) de la abreviatura del aminoácido, comenzando por el N terminal.

Conformación espacial de la cadena polipeptídica

Con excepción de los residuos terminales de una cadena polipeptídica, cada uno de los aminoácidos participa en la formación de dos enlaces peptídicos. Debido a la rotabilidad limitada del enlace C-N sólo es posible la rotación del nitrógeno en el carbono alfa (N-C $_{\alpha}$) y en el C $_{\alpha}$ -C $_2$ [Koolman and Röhm, 2004]. Las rotaciones de los enlaces peptídicos se describen mediante los ángulos diedros ϕ y ψ . El ángulo ϕ define la rotación alrededor del enlace N-C $_{\alpha}$, es decir, la posición del enlace peptídico anterior. Por otro lado, el ángulo ψ indica la rotación alrededor del enlace C $_{\alpha}$ -C $_2$, o sea, la posición del enlace peptídico siguiente. Estas rotaciones están restringidas por impedimentos estéricos, como se puede observar en la figura 2.13.

2.2.6. Monómero de insulina

El monómero de la insulina consta de 51 aminoácidos y tiene un peso molecular de 5,5 kDa, sin embargo posee todas las propiedades de una proteína globular, lo que implica que tiene una forma más o menos esférica y una estructura espacial bien definida para su función biológica, la cual es su conformación nativa. Además, en las proteínas globulares casi todos sus residuos de aminoácidos hidrófobos están dispuestos en su conformación nativa en el interior de la estructura, mientras que los aminoácidos polares se encuentran predominantemente en la superficie, siendo proteínas solubles en agua. Durante la biosíntesis de la insulina en el páncreas se sintetiza en primer término una cadena peptídica precursora de 84 residuos, la proinsulina. Luego del plegado de la molécula se forman los tres enlaces disulfuro antes de que sean separados los residuos 31 a 63 (el péptido C) de forma proteolítica [Koolman and Röhm, 2004]. El resto de la molécula consta de dos cadenas polipeptídicas: la cadena A (21 residuos) y la cadena B (30 residuos); uno de los puentes de disulfuro se encuentra en el interior de la cadena A y los otros dos unen ambas cadenas como se aprecia en la figura 2.14 que ejemplifica la estructura primaria de la insulina (secuencia de aminoácidos).

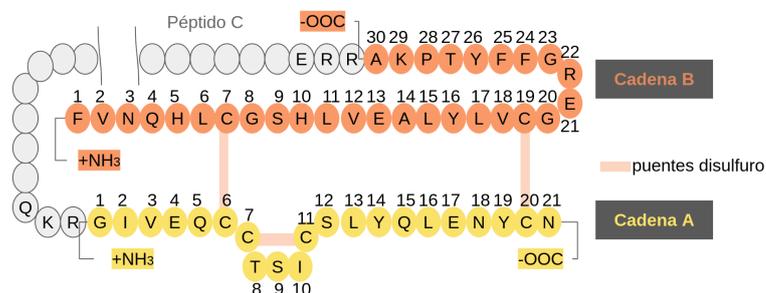


Figura 2.14: Estructura primaria de la insulina cadenas A y B, y un fragmento de la proinsulina. La proinsulina consta de 84 aminoácidos; el péptido C, que se une a las cadenas A y B en la proinsulina, se representa en gris, pero no se muestra en su totalidad debido a limitaciones de espacio

[Koolman and Röhm, 2004]

En la insulina predominan las regiones con estructura de hélice α (cadena polipeptídica que esta enrollada en forma de tornillo, con unos 3.6 residuos de aminoácidos por vuelta), presentes en el 57% de la molécula, en tanto el 6% corresponde a las estructuras de hoja plegada β y el 10% a los bucles β (entre cadenas de hoja plegada y hélices α) [Malinovsky, 2022][Koolman and Röhm, 2004]. El resto (27%) no tiene estructura definida.

La conformación plegada tridimensional de una proteína biológicamente activa se llama estructura terciaria. En la insulina es compacta y en forma de cuña. El vértice de la cuña está formado por la cadena B, en la figura 2.15a), que en este sitio cambia de dirección. La gran estabilidad de la insulina tiene su origen debido a los tres enlaces disulfuro que posee, los cuales se observan en la figura 2.15 b).



a) Cadena A de color azul, cadena B color rojo b) Residuos de colores, con ditioles en formato de esferas y varillas.

Figura 2.15: Molécula del monómero de insulina.

La insulina puede adoptar una estructura cuaternaria pero en la sangre se encuentra principalmente como dímero (complejo con simetría binaria). La insulina se almacena en

el páncreas como hexámeros estabilizados por iones Zinc (Zn^{2+}) [Koolman and Röhm, 2004]. La insulina activa dos principales vías de transducción: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas). La vía de la PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos [Reyes and Plancarte, 2008].

2.3. Sistemas coloidales de asociación como acarreadores de fármacos

2.3.1. Sistema coloidal de asociación

Los coloides son mezclas en la que una sustancia, llamada fase dispersa (también llamada fase interna) se encuentra homogéneamente distribuida en otra, conocida como medio dispersante (también se le refiere como fase continua). El tamaño de las partículas de la fase dispersa es mayor que el de sus moléculas individuales, pero aún demasiado pequeñas para ser afectadas significativamente por la gravedad, por lo que su movimiento principalmente es influenciado por el movimiento browniano [Sinko and Singh, 2011, Florence and Attwood, 2015]. Estos sistemas coloidales pueden clasificarse de diversas maneras para comprender mejor sus propiedades y comportamientos. Por ejemplo, el científico Ostwald propuso una clasificación basada en el tamaño de las partículas de la fase dispersa, que generalmente oscila entre 100 nm y 1 μ m de diámetro [Partington, 1964]. Además de esta clasificación, los coloides también pueden ser categorizados según su composición, carga eléctrica o comportamiento en disolventes específicos, lo que proporciona un marco conceptual amplio para su estudio. Los coloides son sostenidos en dispersión por interacciones electrostáticas con moléculas de agua. Además de que tienen un tamaño entre 1nm y 1 μ m [Jirgensons et al., 2013]. Los coloides de asociación son sustancias de bajo peso molecular que a una concentración dada se asocian en agregados coloidales, un ejemplo bastante usado son los tensoactivos, que son moléculas que poseen anfipatía (significa un grupo polar hidrofílico y una cola hidrofóbica) y a una concentración micelar crítica dada forman micelas.

2.3.2. Liposomas

Los liposomas son formados con moléculas de fosfolípidos, usualmente fosfatidilcolina derivada de huevo o de lecitina de soya [Chiari-Andréo et al., 2019] y colesterol [Ganem-Rondero et al., 2019], puestas en un exceso de agua, forman espontáneamente agregados lipídicos a través de las interacciones lipofílicas de las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos. Para estabilizar estos enlaces, la membrana formada se va cerrando formando una vesícula que contiene agua en el centro [Benson, 2005, Pautot et al., 2003]. Cuando uno desea que estas vesículas de fosfolípidos sean más estables, se añade a la composición colesterol o fosfatidilcolina de soya hidrogenada, generando una vesícula

rígida [Daudt et al., 2013, Pietzyk and Henschke, 2000].

Por la estructura que poseen los liposomas, al tener fosfolípidos formando una interfaz y conteniendo agua, son sistemas que permiten acarrear sustancias solubles en agua y también, sustancias liposolubles o anfifílicas [Chiari-Andréo et al., 2019].

Las sustancias liposolubles, debido a su afinidad por las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos, son insertadas en la membrana, mientras que las hidrofílicas se encuentran en el centro acuoso de la vesícula [Ganem-Rondero et al., 2019].

Las similitudes estructurales entre una membrana celular y los liposomas existen, por lo cual las interacciones entre los liposomas y células del cuerpo ocurren, lo que permite un mayor control en la liberación de su contenido [Bizerra and Silva, 2016].

Los liposomas liberan su carga por erosión [Bozzuto and Molinari, 2015] y/o por difusión de la vesícula [Dua et al., 2012], mientras que su distribución es controlada por el tamaño [Bizerra and Silva, 2016] y composición [Anandrao and Kandekar, 2022] de la membrana.

Existen diferentes métodos de preparación para obtener liposomas cargados, un resumen por carga pasiva es el siguiente diagrama:

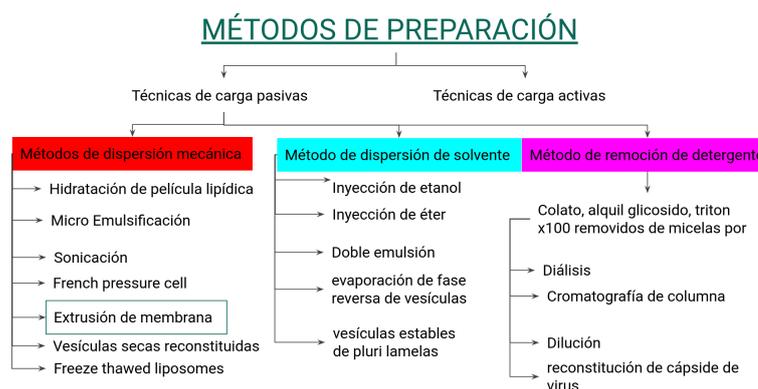


Figura 2.16: Diagrama resumen de diferentes métodos de preparación de liposomas

Los liposomas han sido utilizados en una larga lista de productos desde oftálmicos, inyectables, y también en productos cosméticos, su producción se puede resumir en tres pasos. El primer paso es la hidratación del lípido, el segundo es el diseño del liposoma y el tercero es remover el principio activo que no fue encapsulado. A escala industrial, los pasos 1 y 2 suelen llevarse a cabo de forma simultánea [Kulkarni et al., 2011].

Método general de preparación y carga de fármaco

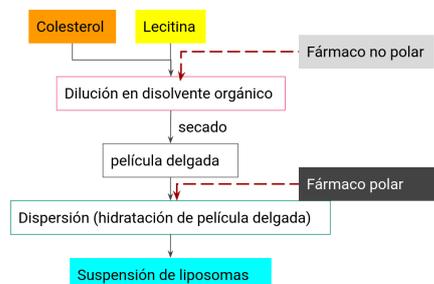


Figura 2.17: Diagrama que ejemplifica el método general de preparación de suspensiones de liposomas

Después de la preparación es necesario la caracterización física y química de los liposomas, cuyas características pueden influenciar en la liberación del principio activo [Kulkarni et al., 2011, Senior and Judith, 1987].

2.3.2.1. Caracterización de liposomas

Los principales parámetros analizados en la caracterización son el tamaño, medido normalmente con técnicas de microscopía electrónica, dispersión de luz, ultracentrifugación y contador Coulter, fluidez de membrana medida con microscopía de fluorescencia, número de lamelas con espectroscopía SAXS y NMR, además de morfología interna por microelectroforesis [Kulkarni et al., 2011, Senior and Judith, 1987, Eisermann et al., 2023].

La carga de un liposoma en una suspensión acuosa es descrito por el potencial zeta, ver figura 2.18. El potencial zeta (ζ) es la diferencia de potencial entre la superficie de la capa fuertemente unida (en la figura es el plano de corte) y la región electroneutra de la disolución. Cualquier liposoma tiene esta característica, y puede tener carga negativa, neutra o positiva dependiendo su composición [Szoka and Papahadjopoulos, 1981].

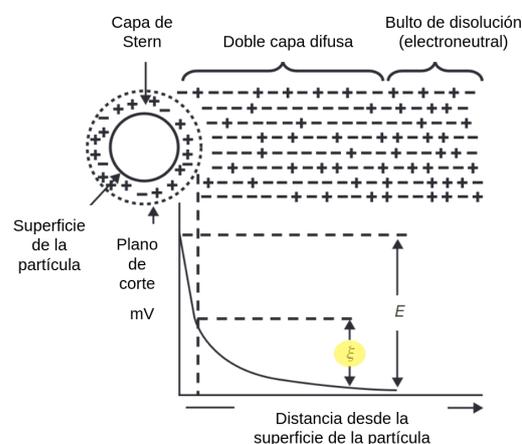


Figura 2.18: Representación del potencial zeta [Sinko and Singh, 2011]

La suspensión liposomal es estable cuando las partículas se mantienen separadas y no agregadas. Si son partículas cargadas, éstas se repelen unas a las otras en el medio por fuerzas repulsivas y la suspensión será estable [Almgren et al., 2000]. Cuando estas suspensiones tienen un potencial zeta mayor que 30mV o menos de -30mV son consideradas estables [Esposito et al., 2016]. Las propiedades electrostáticas de los liposomas pueden ser medidas con diversos métodos experimentales.

La mayoría de estos métodos se basan en titulaciones dependientes de carga de los liposomas, por ejemplo, la determinación de la conformación de los lípidos o la temperatura de transición [Singh and et. al, 2021]. La técnica usada para la rápida determinación de la carga superficial es con el velocímetro láser Doppler (VLD). Con este método se puede medir el potencial dependiente para su absorción [Esposito et al., 2015].

Los métodos más usados para la medición del potencial zeta es mediante técnicas de dispersión de luz, esto debido al cálculo de la frecuencia de fluctuaciones de la luz detectada por el movimiento de las partículas [Singh and et. al, 2021].

2.4. Simulaciones computacionales

Con los equipos de cómputo y software existentes se han realizado cálculos con gran precisión, siendo posible la realización de simulaciones con propiedades inherentes de sustancias reales para asemejar su comportamiento, siendo un área emergente importante.

La definición de simulación depende la fuente de información : en una definición se trata de algoritmos que representan aproximaciones que son analizadas bajo ciertas condiciones [Milner, 1971]. La primera simulación clásica de Monte Carlo por computadora de un líquido fue realizada en el año 1953 en los laboratorios Nacionales de los Alamos en los Estados Unidos, hazaña lograda con la computadora más poderosa de su tiempo, MANIAC [Metropolis et al., 1953].

Las simulaciones pueden compararse con experimentos reales, probando el modelo utilizado por la simulación. Al mismo tiempo, la simulación es un puente entre predicciones teóricas y los resultados experimentales [Allen and Tildesley, 2017], como se puede observar en la figura 2.19 .

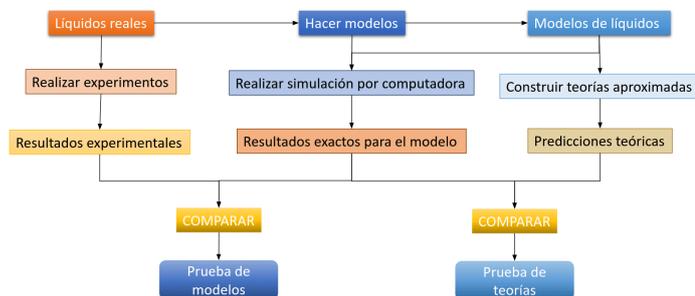


Figura 2.19: La conexión entre el experimento, teoría y simulación por computadora
[Allen and Tildesley, 2017]

2.5. Simulaciones de dinámica molecular

Los sistemas modelo de dinámica molecular se especifican en términos de posición y momento de un arreglo de partículas: de átomos y moléculas. Las simulaciones por dinámica molecular dependen de los campos de fuerza (potenciales) que representan interacciones entre las partículas del sistema, siendo así que la calidad de los resultados depende de que estos potenciales representen interacciones reales entre las partículas.

2.5.1. Dinámica

La dinámica es la relación entre el movimiento de un objeto y las fuerzas que lo provocan [Young, 2013], introduciendo así las leyes de movimiento de Newton, conociendo que momento, ρ es igual a

$$\rho = mv \quad (2.2)$$

donde m es masa y v es velocidad, la fuerza se define como la variación del momento lineal

$$F = \frac{d\rho}{dt} = \frac{d(mv)}{dt} = v \frac{dm}{dt} + m \frac{dv}{dt} \quad (2.3)$$

Al ser m constante, el término $v \frac{dm}{dt}$ es cero, quedando la ecuación 2.3 de la siguiente manera:

$$F = m \frac{dv}{dt} \quad (2.4)$$

Siendo F la fuerza total (suma total de fuerzas); t el tiempo; sabiendo que la velocidad es $v = \frac{dr}{dt}$ y la aceleración $a = \frac{dv}{dt} = \frac{d^2r}{dt^2}$ donde r es la posición, entonces se obtiene la expresión mejor conocida para la segunda ley de Newton:

$$F = m \frac{d^2r}{dt^2} = ma \quad (2.5)$$

Donde r , v y a son vectores, cuyas componentes para cada partícula se encuentran en las dimensiones: x, y, z. En general, las simulaciones de dinámica molecular se resuelven las ecuaciones de movimiento de Newton, donde para la partícula i se tiene

$$F_i(r_i) = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2}, i = 1, 2, \dots, N \quad (2.6)$$

F_i es la fuerza que actúa sobre la partícula i , m es la masa de la partícula i . Considerando una partícula p , como en la figura 2.20, esta partícula experimenta una fuerza debida a las partículas alrededor de ella. Estas fuerzas están asociadas a un potencial.

$$F_i(r_i) = -\nabla_i U(r_i, \dots, r_N), i = 1, 2, \dots, N \quad (2.7)$$

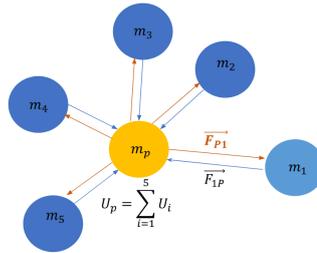


Figura 2.20: Interacción de 5 partículas con la partícula de prueba p

2.5.2. Potenciales intramoleculares

El campo de fuerza describe la dependencia de la energía potencial (U) de un sistema con respecto a las coordenadas de las partículas que lo conforman. Este campo de fuerza contiene ecuaciones y parámetros que describen las contribuciones intramoleculares e intermoleculares que tiene la energía total del sistema [Allen and Tildesley, 2017],

$$U_{total} = U_{intramolecular} + U_{intermolecular} \quad (2.8)$$

$$U_{intramolecular} = U_{distancia-enlace} + U_{ángulo-de-enlace} + U_{ángulo-de-torsión} \quad (2.9)$$

$$U_{intermolecular} = U_{Lennard-Jones} + U_{Coulomb} \quad (2.10)$$

Estos parámetros se obtienen por cálculos cuánticos, semi empíricos o de experimentos. La obtención de estos parámetros se enfoca en la reproducción de propiedades

calculadas para reproducir propiedades experimentales.

2.5.2.1. Distancia de enlace

Suponiendo a dos partículas enlazadas en una molécula, se considera que poseen potenciales que se puede modelar con un potencial armónico, como se aprecia en la figura 2.21.

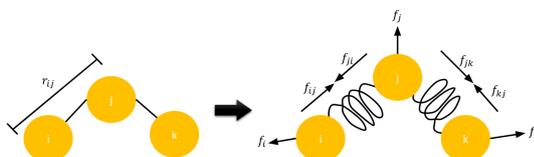


Figura 2.21: Esquema de restricción aplicado a una molécula triatómica como el H₂O

$$U(r_{ij}) = \frac{k_r}{2}(r_{ij} - r_0)^2 \quad (2.11)$$

Donde k_r es la constante de fuerza de enlace, r_0 es la distancia de equilibrio, r_{ij} es la distancia en los átomos i y j.

2.5.2.2. Ángulo de enlace

De igual manera, los ángulos de enlace θ también se representan por medio de un movimiento oscilatorio elástico, como se aprecia en la figura 2.22.

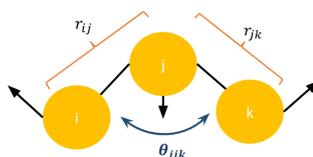


Figura 2.22: Ángulo de enlace (θ)

$$U(\theta) = \frac{k_\theta}{2}(\theta_{ij} - \theta_0)^2 \quad (2.12)$$

Donde k_θ es la constante de fuerza de ángulo de enlace, θ_0 es el ángulo de enlace en la distancia de equilibrio, θ_{ij} es el ángulo de enlace entre los átomos i,j y k.

2.5.2.3. Ángulo de torsión

El ángulo de torsión ($v^{torsion}(\Phi)$) mide la rotación de los átomos intermedios de una molécula entre dos planos; mide sólo un grado de libertad interna de la molécula, lo cual se aprecia en la figura 2.23 [Allen and Tildesley, 2017].

El ángulo de torsión se puede poner como una expresión de potencias del coseno que se conoce como el potencial de Ryckaert-Bellemans [Allen and Tildesley, 2017]. También se suele usar la expansión de términos del coseno de una serie de Fourier [Allen and Tildesley, 2017].

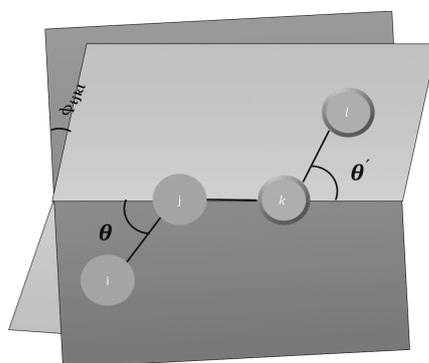


Figura 2.23: Geometría del modelo de butano (C_4H_{10}), definiendo los ángulos de enlace θ , θ' , y el ángulo de torsión ϕ

$$U(\phi_{ijkl}) = \sum_{n=0}^5 C_n (\cos(\Psi))^n \quad (2.13)$$

Donde $\Psi = \Phi_{ijkl} - 180$, Φ_{ijkl} es el ángulo entre dos planos, y C_n corresponde a constantes a usar. La siguiente expresión es la función de Fourier:

$$U(\phi_{ijkl}) = \frac{1}{2} [C_1(1 + \cos(\phi)) + C_2(1 + \cos(2\phi)) + C_3(1 + \cos(3\phi)) + C_4(1 + \cos(4\phi))] \quad (2.14)$$

2.5.3. Potenciales intermoleculares

Los potenciales intermoleculares se definen como aquellos potenciales de interacción entre átomos de moléculas vecinas (más no de la misma molécula), por lo cual, en dinámica molecular se conocen como potenciales no enlazantes. Estos potenciales tienen dos contribuciones: las de corto alcance y las de largo alcance, dadas por potenciales de Lennard-Jones y de Coulomb respectivamente. Las contribuciones al potencial

intermolecular se consideran aditivas por pares [Abraham et al., 2015].

$$U_{inter} = \sum_i^{N-1} \sum_{j>i}^N U(r_{ij}) \quad (2.15)$$

Donde i, j son átomos que no están enlazados.

2.5.3.1. Potencial de Lennard Jones

Al ser un potencial de corto alcance, tiende a cero con la distancia. Este potencial modela la parte de las fuerzas de dispersión de London o de van der Waals.

$$U(r_{ij}) = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.16)$$

Este potencial nos indica la distancia entre las partículas i y j , r_{ij} ; ϵ_{ij} es el mínimo de energía potencial (profundidad del potencial); σ_{ij} es el punto r_{ij} en el cual la energía potencial en función de la distancia entre las partículas es cero ($U(r_{ij}) = 0$), y este se relaciona con el diámetro de la partícula.

Los parámetros σ_{ij} y ϵ_{ij} dependen del par de átomos a estudiar la interacción.

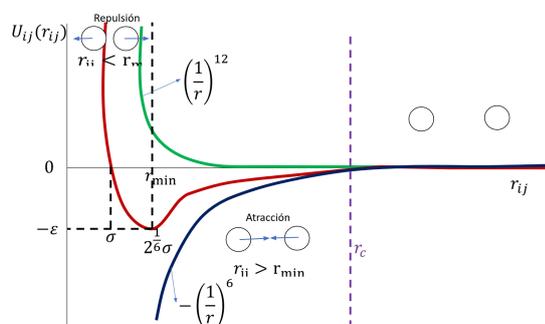


Figura 2.24: Representación gráfica de las interacciones del potencial de Lennard-Jones

En la figura 2.24 se puede observar la representación gráfica de la interacción de los potenciales de Lennard-Jones en las interacciones de dos átomos. La curva verde representa la repulsión a distancias cortas (es el término $(\frac{1}{r})^{12}$ en la ecuación del potencial 2.16). En contraste, la curva azul representa el término $(\frac{1}{r})^6$, mismo que representa la atracción a distancias largas.

La figura 2.24 ilustra una barrera de potencial que opera dentro del rango de $r \leq \sigma$, generando una interacción repulsiva que previene el traslape de partículas, mientras

que más allá de este rango, $r \geq \sigma$, se manifiesta una interacción atractiva que gradualmente disminuye hasta alcanzar cero. Estas características de la curva potencial sugieren que la energía de interacción puede considerarse despreciable más allá de una distancia aproximada de r_c . Esta distancia de corte, denotada como r_c , representa el punto donde el potencial puede ser truncado. Se ha observado que un aumento en el radio de corte conlleva a menores desviaciones ocasionadas por este truncamiento del potencial [Satoh, 2010].

Para obtener la interacción entre partículas distintas, i y j , se pueden construir utilizando distintos tipos de reglas de combinación, en esta tesis se usan las reglas de Lorentz-Berthelot:

$$\sigma_{ij} = \frac{1}{2}(\sigma_{ii} + \sigma_{jj}) \quad (2.17)$$

$$\epsilon_{ij} = (\epsilon_{ii}\epsilon_{jj})^{\frac{1}{2}} \quad (2.18)$$

El uso del modelo de Lennard-Jones tiene un uso bastante extendido debido a su conveniencia computacional.

2.5.3.2. Potencial de Coulomb

La ley de Coulomb describe la energía potencial electrostática entre dos partículas cargadas.

$$U_{coul}(r_{ij}) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (2.19)$$

Donde ϵ_0 es la constante de permitividad en el vacío, q_i y q_j son las cargas puntuales y r_{ij} es la distancia entre los centros de masa de las partículas de estas dos cargas. En este sentido se considera una interacción de largo alcance cuando el potencial $U(r)$ decae más lentamente que r^{-d} , siendo d la dimensionalidad del sistema (generalmente $d=3$). El potencial de coulomb varía con la distancia de forma $1/r$, tiene un efecto importante a distancias grandes entre átomos, como se describe en la ecuación 2.19.

El alcance de este potencial es mayor que la mitad de la arista de las cajas de simulación, por lo que no es posible truncar el potencial. Existe un método eficiente para calcular las interacciones electrostáticas en un sistema periódico infinito conocido como sumas de Ewald. Este método consiste en transformar una serie lenta y que converge condicionalmente en la suma de dos series que converjan rápidamente más un término constante:

$$\frac{1}{r} = \frac{G(r)}{r} + \frac{1 - G(r)}{r} + \text{constante} \quad (2.20)$$

Siendo $G(r)$ en la ecuación 2.20 una distribución gaussiana de cargas, $\frac{G(r)}{r}$ representa el espacio real (r) y $\frac{1-G(r)}{r}$ representa el espacio de Fourier (κ). Esta ecuación decae rápidamente con κ . La ecuación 2.20 puede reescribirse según el método de Ewald como:

$$\begin{aligned}
 U_{SE} &= \frac{1}{2} \sum_i \sum_a \sum_{j \neq i} q_{ia} \sum_b \frac{q_{jb} \operatorname{erfc}(\kappa r_{iajb})}{r_{iajb}} - \frac{1}{2} \sum_i \sum_a \sum_{b \neq a} \frac{q_{ia} q_{jb} \operatorname{erf}(\kappa r_{iajb})}{r_{iajb}} \\
 &= \frac{2\pi}{V} \sum_{\mathbf{h} \neq 0} Q(\mathbf{h}) S(\mathbf{h}) S(-\mathbf{h}) - \frac{\kappa}{\sqrt{\pi}} \sum_i \sum_a q_{ia}^2
 \end{aligned} \tag{2.21}$$

Donde $\operatorname{erf}(x)$ es la función error y $\operatorname{erfc}(x)$ es la función error complementaria, κ es un parámetro de convergencia arbitrario y V es el volúmen. La elección adecuada del parámetro κ permite utilizar un número moderado de vectores κ para modelar el espacio recíproco.

Los dos primeros términos de la ecuación 2.21 se deben al potencial del sistema de cargas puntuales apantalladas que se calculan en el espacio real. El tercer término se debe a la distribución compensadora y se calcula en el espacio recíproco sumando sobre los vectores $\mathbf{h} = 2\pi\mathbf{n}/L^2$. El último término es la autocorrección de la energía.

Una descripción física de esta ecuación es que cada punto con carga en el sistema se apantalla por una distribución de carga gaussiana de igual magnitud pero de signo opuesto. Para contrarrestar esta distribución de carga, se agrega una segunda distribución de carga gaussiana del mismo signo y magnitud que la distribución original a cada carga. Los términos en el espacio κ están definidos de acuerdo a las ecuaciones 2.22.

$$\begin{aligned}
 S(\mathbf{h}) &= \sum_i \sum_a q_{ia} e^{i\mathbf{h} \cdot \mathbf{r}_{ia}} \\
 Q(\mathbf{h}) &= \frac{e\kappa^2 - h^2}{\kappa^2 h^2} \\
 \mathbf{r}_{iajb} &= \mathbf{r}_{ia} - \mathbf{r}_{jb}
 \end{aligned} \tag{2.22}$$

En la presente tesis se utilizó el método Smoothed Particle Mesh Ewald (PME en gromacs), el cual, es una modificación de las sumas de Ewald, con un cuarto orden de interpolación (más preciso). En el método SPME, los términos en el espacio real son calculados de la misma manera que en el método normal de las sumas de Ewald. No obstante, la suma en el espacio recíproco se representa por una celda rectangular tridimensional y requiere una transformada de Fourier rápida en tres dimensiones (FFT), la cual debe ser distribuida sobre los procesos de estudio.

2.5.4. Algoritmos de integración

En simulaciones de dinámica molecular, las ecuaciones de movimiento se resuelven usando diferentes métodos [Sharma et al., 2009] :

- Método de Verlet
- Metodo de velocidad de Verlet

- Metodo de salto de rana

El método de Verlet es un método en el que se descartan los términos de velocidad para determinar la posición molecular en el siguiente tiempo de integración; para fines de este trabajo, únicamente se menciona su existencia, además de que a partir de este método se obtiene el de velocidad de Verlet. En la presente tesis fué utilizado el método de salto de rana.

2.5.4.1. Algoritmo de salto de rana

El método de salto de rana evalúa las posiciones, fuerzas y velocidades, usando tiempos en manera de salto de rana. Requiere valores de la posición (r) y fuerza (f) a un tiempo (t) mientras que las velocidades (v) estan medio paso de tiempo atrás, como se observa en la figura 2.25. Este método es superior que el método de Verlet y el de método de velocidades de Verlet dado a su estabilidad y exactitud [Sharma et al., 2009].

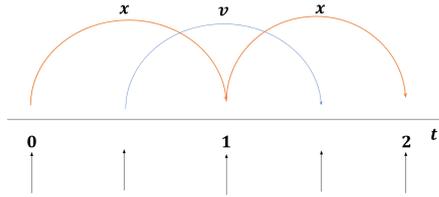


Figura 2.25: El algoritmo de salto de rana se llama así, porque r y v saltan como ranas

Este algoritmo usa las posiciones r al tiempo t y velocidades v al tiempo $t - \frac{1}{2}\Delta t$ integrando la fuerza f :

$$v(t + \frac{1}{2}\Delta t) \leftarrow v(t - \frac{1}{2}\Delta t) + \Delta t \frac{f(t)}{m} \quad (2.23)$$

donde m es la masa de un sitio y Δt es el intervalo de tiempo. Las posiciones avanzan usando las nuevas velocidades:

$$r(t + \Delta t) \leftarrow r(t) + \Delta t v(t + \frac{1}{2}\Delta t) \quad (2.24)$$

En el algoritmo de salto de rana, la velocidad al tiempo t se obtiene del promedio de las velocidades a la mitad de un intervalo de tiempo t :

$$v = \frac{1}{2}[v(t - \frac{1}{2}\Delta t) + v(t + \frac{1}{2}\Delta t)] \quad (2.25)$$

En el presente trabajo utilizamos el algoritmo de salto de rana como integrador de

velocidad.

2.5.5. Condiciones periódicas de frontera

Para estudiar las propiedades de un sistema al usar dinámica molecular, podría ser suficiente una gran caja de simulación de tal manera que pocas moléculas estén en la superficie de esta caja, para esto se necesitaría un tiempo de simulación excesivo [Wu et al., 2014]. En el caso de utilizar una caja de simulación más pequeña, las moléculas se encontrarían en el borde de la caja de simulación.

Por ello se utilizan las condiciones periódicas de frontera que eliminan la existencia de superficie y evitan una gran cantidad de moléculas o una caja de simulación de gran tamaño [deLeeuw et al., 1980]. Con estas condiciones se forma un sistema infinito, repitiendo el cuadro de simulación en todo el espacio [Wu et al., 2014], [Allen and Tildesley, 2017], como se aprecia en la figura 2.26.

Cuando una molécula sale de la caja, una de sus imágenes entra por la cara opuesta en el mismo camino y dirección. Las moléculas en la simulación se conservan, y el sistema se considera que no posee una superficie.

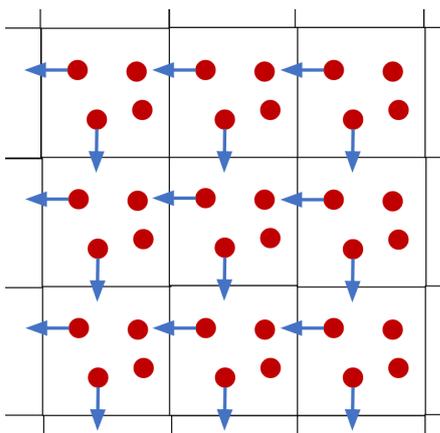


Figura 2.26: Una celda de 2 dimensiones de la condición periódica de frontera

2.5.6. Convención de mínima imagen

La convención de mínima imagen restringe el número de interacciones para analizar, dado que con las condiciones periódicas de frontera se vuelve un sistema infinito [Allen and Tildesley, 2017]. La convención de imagen más cercana (o el de mínima imagen) calcula la interacción entre el átomo original y la imagen más cercana de los otros átomos en uno de los cuadros cercanos. Para el uso de esta convención, es necesario que el potencial sea menor que la mitad del largo de la caja (cuando la longitud de la caja sea menos del doble del valor de radio de corte).

En esta convención, el cálculo de energía potencial debido a interacciones aditivas por

pareja involucra términos $\frac{1}{2}N(N-1)$; este cálculo es sustancial para sistemas grandes, sistemas por ejemplo mayores a 1000 partículas [Allen and Tildesley, 2017].

Es importante que la convención de mínima imagen sea codificada de la misma manera que las condiciones periódicas de frontera [Smith, 1989], [Kamali and Kharazmi, 2011].

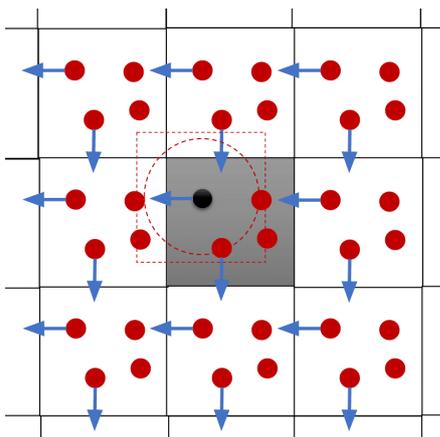


Figura 2.27: Convención de mínima imagen de un sistema en dos dimensiones. La caja central contiene 4 moléculas, y la caja punteada fue construida con la molécula negra en su centro. El círculo rojo punteado representa el corte

2.5.7. Radio de corte

Como fué mencionado en la sección de parámetros de Lennard Jones, en los potenciales de interacción de corto alcance se reduce la distancia a evaluar con el radio de corte. El potencial de Lennard-Jones con radio de corte, define un potencial truncado $V_c(r_{ij})$ [Haile, 1992, Frenkel et al., 1996]:

$$V_c(r_{ij}) = \left\{ \left[4\epsilon \left(\left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right) \right], r_{ij} \leq r_c \right. \quad (2.26)$$

$$\left. 0, \quad r_{ij} > r_c \right\} \quad (2.27)$$

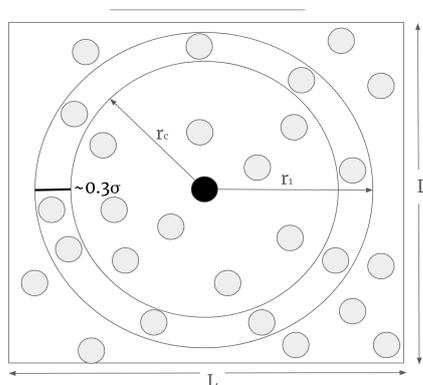


Figura 2.28: Esquema de esfera de corte del potencial intermolecular, de radio r_c , y esfera de algoritmo de Verlet, de radio r_1 , para el átomo en negro, en una caja de simulación de arista L

[Cruz-Valcárcel, 2008]

Con el radio de corte (r_c) el método mejora la eficiencia de las interacciones de Lennard Jones. Es importante destacar que r_c no debe exceder la mitad de la longitud de la arista de la caja, en consonancia con la convención de mínima imagen. Con este método, la corrección del potencial de Lennard Jones puede necesitarse para calcular la energía y presión (propiedades termodinámicas). El radio de corte no puede ser utilizado para calcular las interacciones Coulómbicas, dado que las interacciones Coulómbicas no son convergentes para estas interacciones, ya se vió que se utiliza el método de suma de Ewald [Takahashi et al., 2011].

2.5.8. Función de distribución radial

La función de distribución radial $g(r)$ también llamada función de correlación por pares, $g_{AB}(r)$ entre partículas de tipo A y B es definida como:

$$g_{AB}(r) = \frac{\langle p_B(r) \rangle}{\langle p_B \rangle_{local}} \quad (2.28)$$

$$g_{AB}(r) = \frac{1}{\langle p_B \rangle_{local}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2} \quad (2.29)$$

Con $\langle p_B(r) \rangle$ siendo la densidad de la partícula B a una distancia r alrededor de las partículas A . Y, $\langle p_B \rangle_{local}$ la densidad de partículas del tipo B promediada sobre todas las esferas alrededor de las partículas A con radio r_{max} [Levine et al., 2011], [Levine, 2011]. Usualmente el valor de r_{max} es la mitad del largo de la caja [Abraham et al., 2015].

2.5.9. Radio de giro

El radio de giro (R_g) se define como la distancia cuadrática media ponderada de una colección de átomos desde su centro de masa común [Hassan et al., 2014]:

$$R_g^2 = \sum_i \frac{m_i(r_i - R_c)^2}{M} \quad (2.30)$$

Donde m_i y r_i denotan la masa y la posición del átomo i , respectivamente. R_c y M denotan la posición del centro de masa del agregado y el total de la masa, respectivamente.

Se puede determinar el radio de un agregado molecular R con el promedio de radio de giro del agregado, asumiendo una distribución de masa aproximadamente uniforme [Tang et al., 2014].

2.5.10. Excentricidad de un agregado esférico

La esfericidad de un agregado molecular esférico puede ser analizada por medio de la excentricidad [Ritter et al., 2016], e , que es definida como:

$$e = 1 - \frac{I_{min}}{\langle I \rangle} \quad (2.31)$$

Donde I_{min} representa el momento principal de inercia con la magnitud más pequeña, y $\langle I \rangle$ es el promedio de los tres principales momentos de inercia [Lebecque et al., 2017]. Un agregado con una excentricidad cercana a cero es cercano a ser esférico, mientras que los agregados planos o alargados tendrían mayores excentricidades [LeBard et al., 2012].

2.6. Campo eléctrico

Una colección de un gran número de cargas elementales puede considerarse como una distribución de carga continua [Young, 2013]. Cuando una carga se establece en un punto, genera un campo eléctrico, y esta interacción electromagnética influye en la trayectoria y comportamiento de otra carga en el entorno. Este fenómeno puede visualizarse como un intercambio entre las cargas y el campo eléctrico que las rodea [Resnick et al., 2007], como se aprecia en la expresión 2.32.

$$carga \rightleftharpoons campo \rightleftharpoons carga \quad (2.32)$$

El campo eléctrico \mathbf{E} está definido como la fuerza experimentada por una carga de prueba positiva q_0 en un punto dado, como se expresa en la ecuación 2.33:

$$\mathbf{E} = \frac{\mathbf{F}}{q_0} \quad (2.33)$$

La dirección del vector \mathbf{E} coincide con la dirección de la fuerza \mathbf{F} , dado que q_0 es un escalar positivo. Dimensionalmente, el campo eléctrico es la fuerza por unidad de carga, y su unidad en el SI es el Newton/Coulomb (N/C), también es frecuente expresarla como Volt/metro (V/m)[Resnick et al., 2007].

Al tratar con cargas puntuales, la magnitud de fuerza que actúa sobre q_0 está determinada por la ley de Coulomb, expresada en la ecuación 2.34. Esta ley establece la fuerza de interacción entre dos cargas puntuales q y q_0 separadas por una distancia r

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{qq_0}{r^2} \quad (2.34)$$

La magnitud del campo eléctrico en el lugar de la carga de prueba según la ecuación 2.33, obtenemos la siguiente expresión:

$$\mathbf{E} = \frac{\mathbf{F}}{q_0} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q}{r^2} \quad (2.35)$$

Donde la dirección de \mathbf{E} es la misma que la dirección de \mathbf{F} , a lo largo de una línea radial que parte de q , apuntando hacia afuera si es positiva y hacia adentro si q es negativa. obteniendo así, el campo eléctrico:

$$E = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q}{r^2} \quad (2.36)$$

Dimensionalmente, el campo eléctrico es la fuerza por unidad de carga, y su unidad en el SI es el Newton/Coulomb (N/C), también es frecuente expresarla como Volt/metro (V/m)[Resnick et al., 2007].

2.7. Potencial eléctrico

La fuerza entre dos partículas cargadas depende de la magnitud y signo de cada carga. Al potencial eléctrico se define como la energía potencial por unidad de carga de prueba. El potencial eléctrico V en un punto P debido a un conjunto de cargas se

define como

$$V = \frac{U_p}{q_0} \quad (2.37)$$

El potencial debe ser un escalar, porque este se calcula a partir de los escalares U y q , además de que el potencial es independiente de la magnitud de la carga de prueba. En vez de hacer referencia a un punto en el infinito, a menudo deseamos determinar la diferencia de potencial eléctrico entre dos puntos a y b en un campo eléctrico. Para hacerlo, movemos una carga de prueba q_0 desde a hasta b , la diferencia de potencial eléctrico se define como:

$$\Delta V = V_b - V_a = \frac{U_b - U_a}{q_0} \quad (2.38)$$

En donde V_b es el potencial eléctrico de la carga de prueba q_0 en un punto b , y V_a es el potencial eléctrico de la carga de prueba q_0 en un punto a .

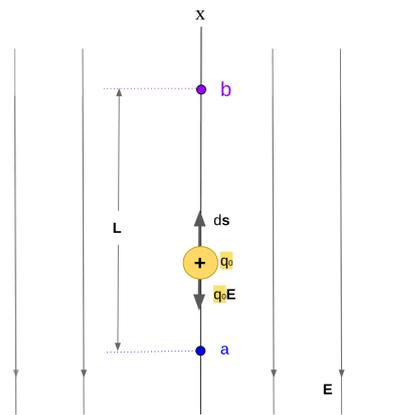


Figura 2.29: Carga de prueba q_0 se mueve de un punto a a un punto b en un campo eléctrico E uniforme

Con un campo eléctrico E podemos calcular el potencial V .

$$\vec{E}(\vec{r}) \rightarrow V(\vec{r}) \quad (2.39)$$

En la figura 2.29 los puntos a y b están en un campo eléctrico uniforme E , y desde el punto b hasta a hay una distancia L . Además de que supongamos que la carga de prueba positiva q_0 se mueve desde a hasta b en la línea recta que se muestra en esa figura. La fuerza eléctrica sobre la carga es $q_0 E$ y apunta en dirección x negativa. La carga se mueve en la dirección ds desde el punto a hasta el punto b , y el trabajo realizado por el campo eléctrico (constante) está expresado como:

$$W_{ab} = F_x \Delta x = (-q_0 E)(L) = -q_0 E L \quad (2.40)$$

Utilizando la definición de la diferencia en la energía potencial, $\Delta U = -W$, podemos combinar las ecuaciones 2.38 y 2.40 para obtener:

$$\Delta V = V_b - V_a = \frac{U_b - U_a}{q_0} = \frac{-W_{ab}}{q_0} = EL \quad (2.41)$$

Para encontrar el trabajo total W_{ab} realizado por el campo eléctrico cuando la carga de prueba se mueve desde a hasta b , se deben integrar las contribuciones del trabajo para toda la trayectoria, esto se traduce a:

$$W_{ab} = q_0 \int_a^b \mathbf{E} \cdot d\mathbf{s} \quad (2.42)$$

Con la ecuación 2.41, la ecuación 2.42 da:

$$\Delta V = V_b - V_a = \int_a^b \mathbf{E} \cdot d\mathbf{s} \quad (2.43)$$

La unidad del potencial en el SI es el Joule/Coulomb, el cual es el volt.

$$1 \text{ volt} = 1 \text{ joule/coulomb} \quad (2.44)$$

Metodología y simulación

Las simulaciones con dinámica molecular fueron realizadas con el software libre Gromacs [Abraham et al., 2015], para estudiar la interacción entre los fosfolípidos de DPPC y colesterol como vesículas con un monómero de insulina contenido en su centro acuoso.

Simulaciones realizadas en el ensamble isotermico-isobárico NPT, cuyas siglas significan que tienen constantes el número de partículas, presión y temperatura, las cuales fueron 1 bar y 298.15K respectivamente. Para controlar las condiciones de simulación se utilizaron los algoritmos de acoplamiento de temperatura de Nose-Hoover y el barostato de Parrinello-Rahman, con un acoplamiento isotrópico.

3.1. Modelos

Los modelos utilizados en este trabajo fueron los siguientes: un fosfolípido conocido como dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), colesterol y un monómero de insulina. Con estos modelos se investigaron las interacciones entre los residuos de aminoácidos de la proteína, además de la estabilidad de la membrana y del sistema acarreador por medio de sus perfiles de densidad. Todos estos sistemas fueron simulados en disolución, del cual se utilizó el modelo de agua SPC [Smith and Van Gunsteren, 1993].

3.1.1. Dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC)

En la figura 3.1 tenemos a la molécula de DPPC que consiste en una sección de cabezas polares con un grupo colina y un grupo fosfato, recordando que un oxígeno del fosfato es perteneciente al esqueleto de glicerol como fue visto en la sección 2.2.2, además de las cadenas acilo hidrofóbicas de 15 carbonos. En la sección a) de la figura 3.1 vemos las etiquetas correspondientes de cada átomo de esta molécula.

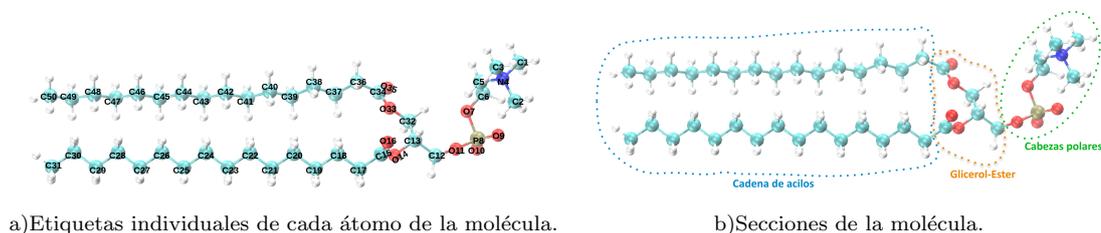


Figura 3.1: Molécula de DPPC con sus etiquetas correspondientes

El modelo utilizado del DPPC fué un modelo de todos los átomos, del cual se utilizaron los campos de fuerzas validados reportados por Berger [Berger et al., 1997].

3.1.2. Colesterol

En cuanto al colesterol, se aprecia en la figura 3.2 tanto el esqueleto de gonano y su cadena alifática. El campo de fuerzas y estructura utilizados fueron obtenidos de la referencia [Malde et al., 2011].

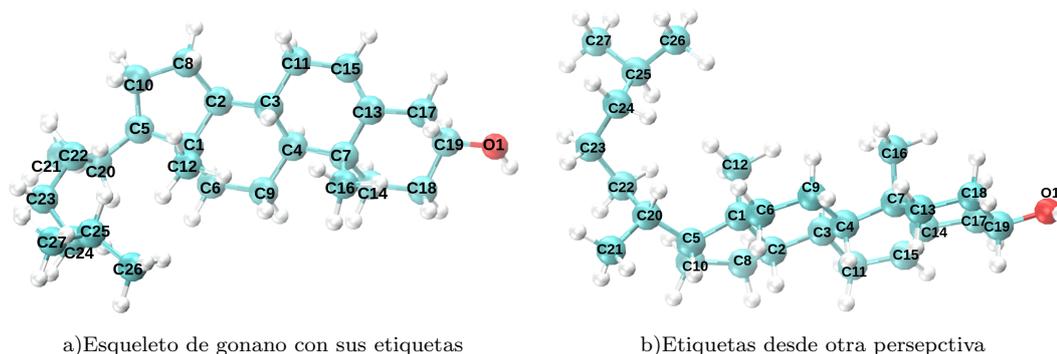


Figura 3.2: Molécula de colesterol con sus etiquetas correspondientes

3.1.3. Monómero de insulina

El monómero de insulina consta de 51 aminoácidos, ver figura 2.14. El modelo de insulina utilizado en la simulación fué la estructura reportada por Turkenburg [Turkenburg et al., 2018](pdb: 1ZNI), estructura que se aprecia en las figuras 2.15.

3.2. Elaboración de los sistemas

Las bicapas y los liposomas se construyeron variando la concentración de colesterol por membrana para el proceso de simulación. Utilizamos el software gratuito Packmol

[Martínez et al., 2009] para generar las membranas. Este software ofrece herramientas versátiles para la construcción de sistemas biomoleculares, permitiéndonos diseñar bicapas y liposomas.

3.2.1. Bicapas

Como referencia utilizamos el input de ejemplo predeterminado de Packmol [Martínez et al., 2009] para generar bicapas, las cuales fueron adaptadas para ajustarse al tamaño de la molécula de DPPC (dipalmitoil fosfatidilcolina). Cada fosfolípido tiene aproximadamente 27\AA de longitud, y empleamos 64 fosfolípidos por lado de la bicapa. La variación en la concentración de colesterol por bicapa fue propuesta sobre la cantidad total de lípidos por membrana. Además, incorporamos un total de 16 264 moléculas de agua del modelo SPC, las cuales fueron previamente equilibradas a las mismas condiciones de temperatura y presión de simulación. Las cajas de simulación se establecieron con dimensiones de $6\times 6\times 20$ nanómetros, como se puede apreciar en la figura 3.3. Fueron propuestos los siguientes porcentajes de colesterol por bicapa: 2, 3, 5, 6, 8, 14, 20, 30, 40 y 50%. Las simulaciones se llevaron a cabo con y sin un monómero de insulina a 30 nanosegundos.

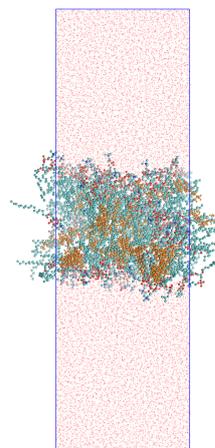


Figura 3.3: Configuración inicial de la bicapa de 20%CHO-DPPC. Realizada con el software libre packmol [Martínez et al., 2009], formada por 16164 moléculas de agua, moléculas de dipalmitoil fosfatidilcolina y colesterol (naranja)

3.2.2. Liposomas

Una vez realizadas las bicapas, se propuso pasar a los liposomas, con el cual, se tomó en consideración el radio de giro de la proteína utilizada en un medio acuoso a las mismas condiciones de simulación, la cual tuvo un radio de esfera de 14.45\AA . Considerando el área de una esfera y el área por lípido del DPPC, $63.3\text{\AA}^2/\text{molécula}$, se llegó a la conclusión del cálculo de cantidad total de fosfolípidos por vesícula, mostrados en la figura 3.4:

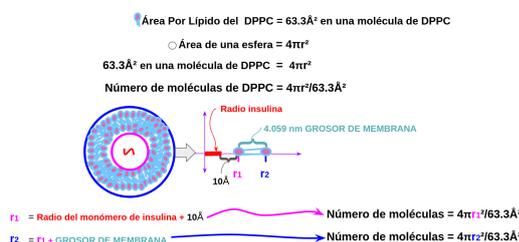


Figura 3.4: Propuesta de cálculo para elaborar los inputs de liposomas respetando el área por lípido y el grosor de la membrana del DPPC, además de brindar 10\AA adicionales en el radio del liposoma para el monómero de insulina el cual esta representado en color rojo

Partiendo de la propuesta de cálculo anterior, se elaboraron diferentes liposomas con concentraciones de colesterol de 2, 3, 5, 6, 8, 20, 30, 40 y 50 % por membrana, con 248 798 moléculas de agua del modelo SPC [Smith and Van Gunsteren, 1993] en cajas cúbicas de simulación de 20 nanómetros llevadas a cabo con y sin un monómero de insulina a 30 nanosegundos.

3.3. Metodología de las simulaciones

Fué necesario minimizar la energía de los sistemas, y posteriormente se llevaron a cabo las simulaciones de dinámica molecular en el ensamble NPT con un tiempo de simulación de 30 nanosegundos. Las simulaciones se llevaron a cabo con un radio de corte que se estableció de aproximadamente la mitad del tamaño de la caja de simulación en el eje x, esto con el fin de obtener la mayoría de interacciones en el sistema para las interacciones de corto alcance. Para las interacciones de largo alcance (potenciales de Coulomb) se usaron las sumas de Ewald con la técnica de PME. El tiempo de paso de integración fué de 0.002. El algoritmo de integración fué el de salto de rana. Los parámetros de simulación para el campo de fuerzas fueron del fosfolípido (DPPC) [Berger et al., 1997], para el colesterol [Malde et al., 2011] y la estructura del monómero de insulina [Turkenburg et al., 2018] con el campo de fuerzas gromos53a7 (obtenido con pdb2gmx) para el modelo del agua, que fue el modelo SPC [Smith and Van Gunsteren, 1993].

Resultados y Análisis

4.1. Resultados de las bicapas

4.1.1. Perfiles de densidad parcial de bicapas

Los perfiles de densidad parcial se obtuvieron calculando la densidad local de átomos en una dirección determinada, a través de la caja de simulación en el eje z para los sistemas de bicapas, se obtiene dividiendo al sistema en rebanadas pequeñas de tamaño Δz , ver figura 4.1. Una vez determinadas las rebanadas en el sistema, se contabilizó el número de átomos del grupo a estudiar y se divide entre el volumen de la rebanada. Estos cálculos se realizan por un tiempo largo de simulación y se promedian los valores obtenidos para cada rebanada sobre el número de configuraciones, lo cual se representa en la figura 4.1. Los átomos se agruparon dependiendo su clasificación dentro del mismo fosfolípido; teniendo por cabeza polar a los átomos C1, C2, C3, N4, C5, C6, O7, P8, O9, O10 y O11; en el grupo glicerol éster a los átomos: C12, C13, O14, C15, O16, C32, O33, C34 y O35; finalmente, los átomos de carbono correspondientes a los acilos son: C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26, C27, C28, C29, C30, C31, C36, C37, C38, C39, C40, C41, C42, C43, C44, C45, C46, C47, C48, C49 y C50, ver figura 3.1, en el capítulo 3. La ecuación 4.1 representa el cálculo del perfil de

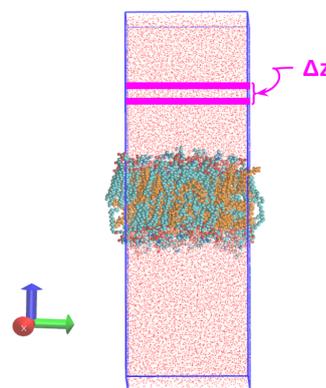


Figura 4.1: Representación del cálculo del perfil de densidades en la dirección del eje Z . Se muestra la configuración final de la bicapa de 40%CHO-DPPC, formada por 16164 moléculas de agua, moléculas de dipalmitoil fosfatidilcolina y colesterol (naranja).

densidad numérica $\rho_n(z)$ para cada rebanada del sistema (Δz).

$$\rho_n(z) = \frac{1}{L_x L_y \Delta z} \sum_i^N n_i(z) \quad (4.1)$$

Donde N es el número total de configuraciones, $n_i(z)$ representa el número de partículas presentes en cada rebanada del sistema, L_x y L_y son las dimensiones de la celda de simulación en las direcciones X y Y respectivamente y Δz es el espesor de la rebanada. A continuación, se presentan las configuraciones finales y los perfiles de densidad de los últimos 10 nanosegundos de simulación de las bicapas de 8, 30, 40 y 50 % colesterol-DPPC.

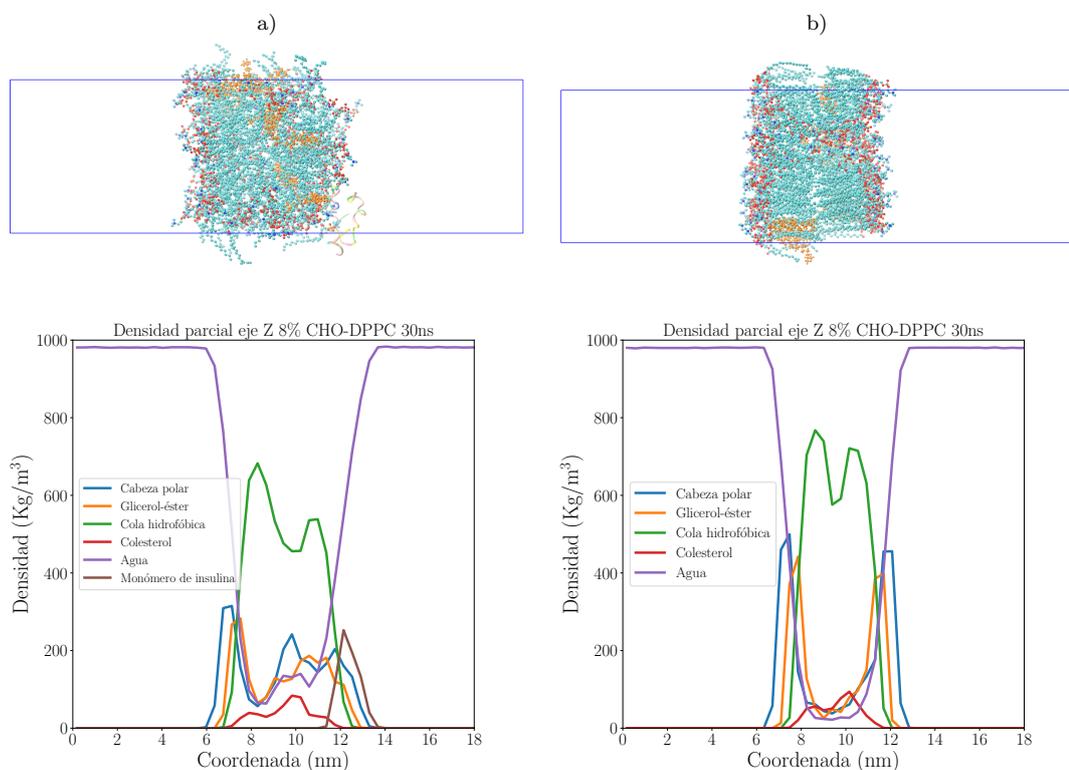


Figura 4.2: Configuraciones finales y perfiles de densidad parcial de bicapas de 8 % CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina.

En la figura 4.2 se aprecian los perfiles de densidad parcial de las bicapas de 8 % colesterol-DPPC en presencia y ausencia de un monómero de insulina en la caja de simulación, en la última se observa que los picos de los perfiles de las cabezas polares están expuestas en la superficie vecina a las moléculas de agua, posteriormente se encuentran los átomos del glicerol éster y finalmente, la cola hidrofóbica de acilos de los

fosfolípidos se encuentra oculta, de igual manera el perfil de densidad del colesterol se muestra en la misma posición de las colas hidrofóbicas. En el caso de la bicapa con un monómero de insulina, muestra que la insulina se coloca entre la interfase lípido-agua, lo que modifica los perfiles de densidad de la cabeza polar y posteriormente el glicerol éster.

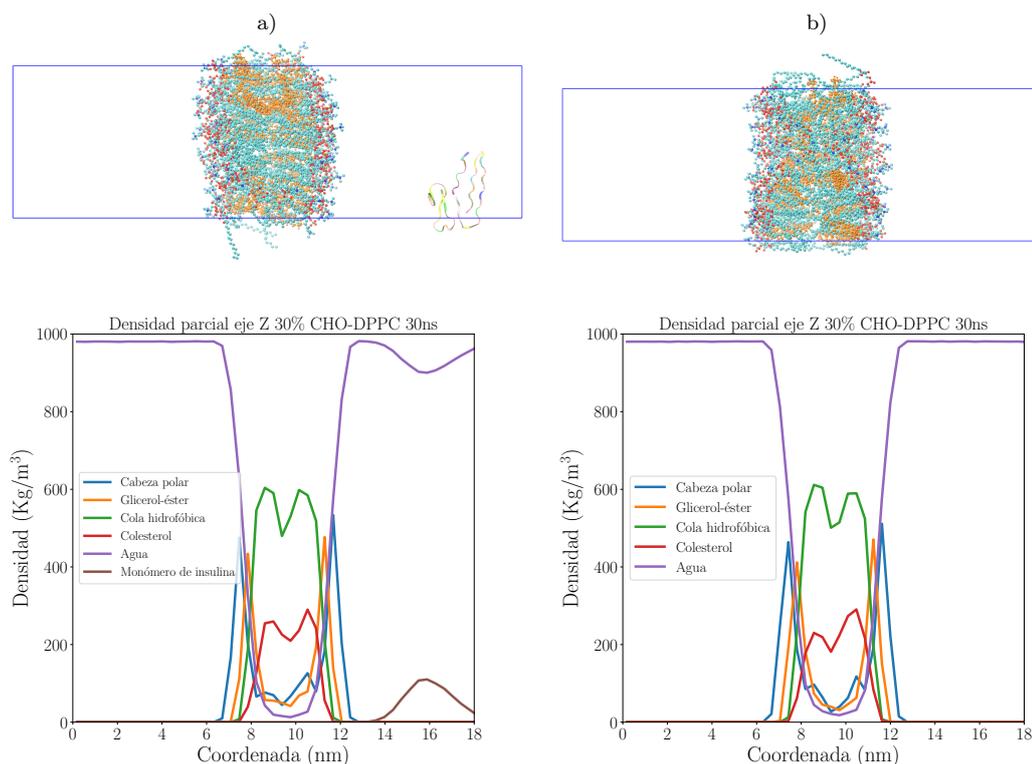


Figura 4.3: Configuraciones finales y perfiles de densidad parcial de bicapas de 30 % CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina

En la figura 4.3 se presentan los perfiles de densidad parcial de las bicapas de 30 % colesterol-DPPC, presencia y ausencia de un monómero de insulina, se muestra que los picos no se deforman en el primer caso. El perfil del colesterol tiende al perfil de la cola hidrofóbica, con la diferencia que el sistema con monómero de insulina presenta un pico de densidad en su configuración final apartado 3 nanómetros de las cabezas polares después de 30 nanosegundos. De igual forma se observa que los perfiles de densidad de la interfase fosfolípido-agua se modifican debido a la presencia del monómero de insulina, por lo que esta proteína se encuentra modificando la estructura en ciertas áreas de la membrana, lo que ocasiona cambios locales en la distribución general de la densidad volumétrica, lo que podría estar generando la reducción de los picos de densidad, recordando que ambas cajas de simulación tienen las mismas cantidades de moléculas de agua, fosfolípido y colesterol, lo único que varía es en la presencia de un

monómero de insulina.

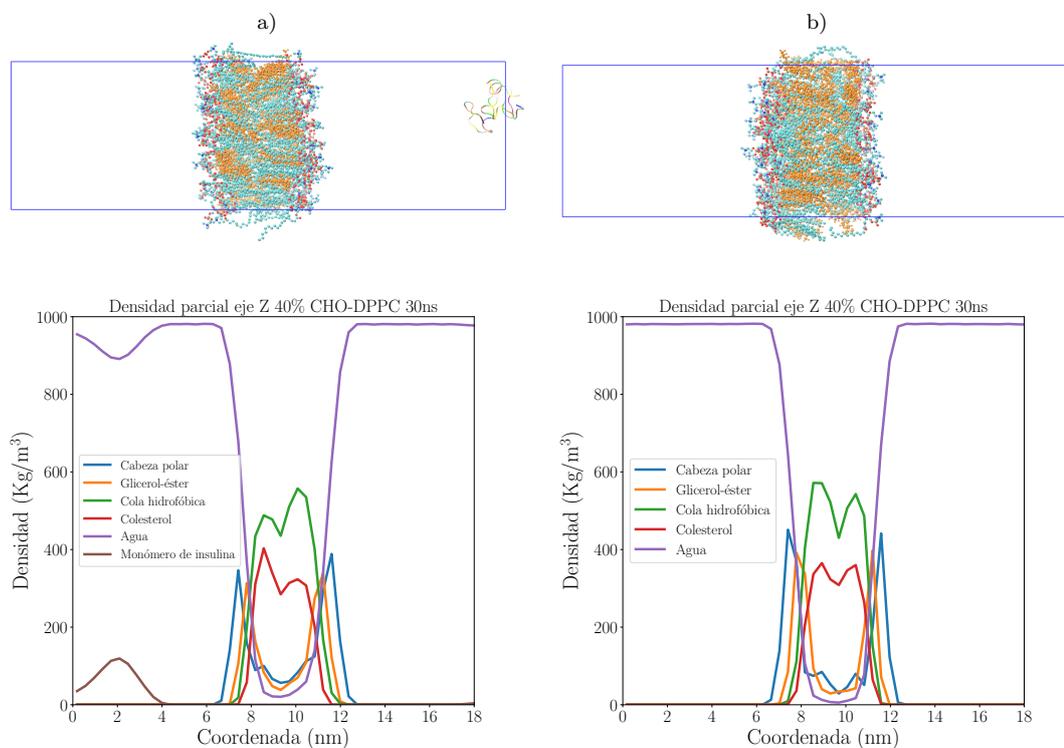


Figura 4.4: Configuraciones finales y perfiles de densidad parcial de bicapas de 40 % CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina

En la figura 4.4 se presentan de igual manera los perfiles de las configuraciones finales de los sistemas de 40 % colesterol-DPPC en ausencia y en presencia de un monómero de insulina. De igual forma se observa que los picos no cambian en ambos sistemas, mostrando que la proteína podría tener mayor afinidad a las cabezas polares a menores concentraciones de colesterol por membrana. En ambos sistemas, los perfiles de densidad se encuentran bien definidos.

Conforme aumenta la concentración de colesterol se refinan todos los perfiles, además de que también observamos en los perfiles de densidad del agua que entra a la bicapa entre las cabezas polares y los grupos glicerol éster, pudiendo interactuar con los grupos carbonilos, lo cual en el artículo de [Egberts et al., 1994] también observaron esta tendencia.

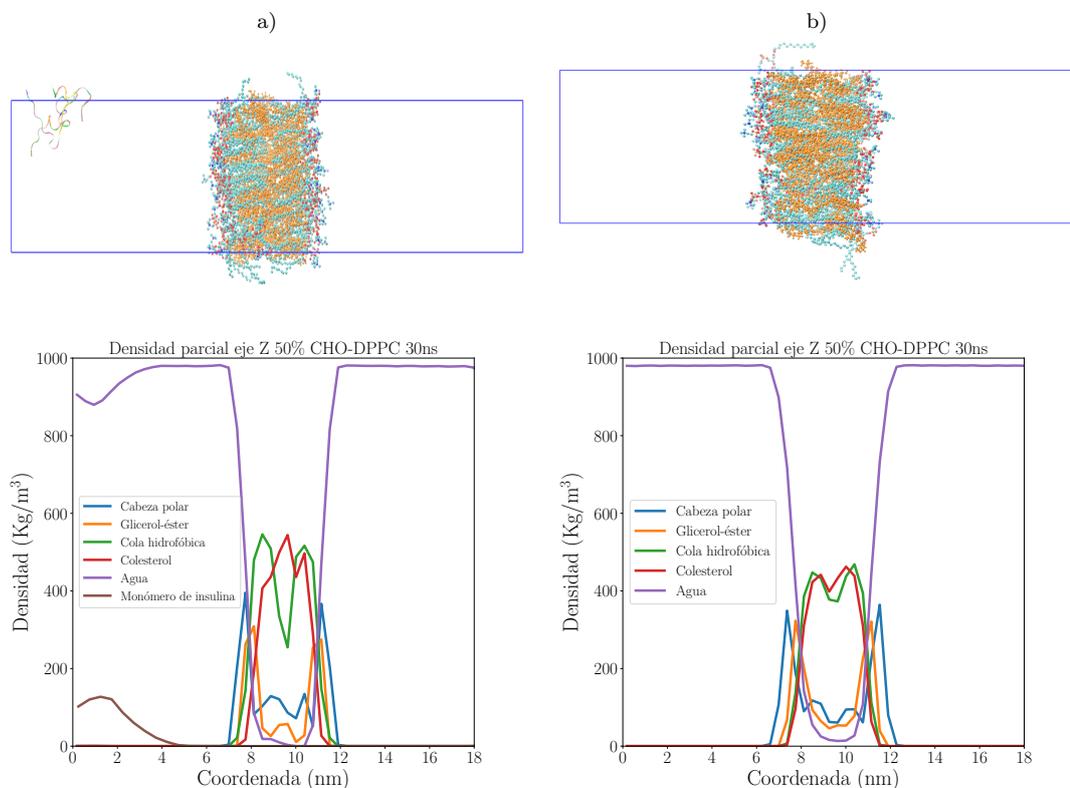


Figura 4.5: Configuraciones finales y perfiles de densidad parcial de bicapas de 50 % CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina

Finalizando esta sección, la figura 4.5 muestra el perfil de densidad parcial de las bicapas de 50 % colesterol-DPPC en ausencia y presencia de un monómero de insulina. Vemos que los perfiles de densidad parcial de la cola hidrofóbica y de la molécula de colesterol tienden a la misma forma, lo que nos indica que el colesterol se coloca de forma paralela a estas, lo que se puede corroborar con el cálculo de orden, lo cual se vera en la siguiente sección. Al observar el sistemas con monómero de insulina apreciamos que la proteína no modifica los perfiles de densidad de las cabezas polares, grupos glicerol-éster ni colas hidrofóbicas debido al aumento en la concentración de colesterol. De igual forma observamos que disminuye la densidad lipídica de la cola hidrofóbica en la mitad de la bicapa en presencia de un monómero de insulina, lo cual es congruente con resultados experimentales de bicapas obtenidas hace décadas [Franks, 1976]. Considerando que el aumento de la concentración de colesterol conduce a una disminución de la interacción con proteínas, se observa que el colesterol aumenta la rigidez de la membrana al alinearse con las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos. Esto puede corroborarse aún más en la siguiente sección mediante el análisis del orden de las colas hidrofóbicas y el esqueleto del colesterol. El colesterol podría influir potencialmente en la difusión de moléculas a través de la

membrana, lo que sugiere que el monómero de insulina podría estar interactuando a un menor %CHO-DPPC con la cola hidrofóbica del fosfolípido, el colesterol o la cabeza polar debido a su diversa gama de residuos. Estos residuos incluyen hidrofóbicos (Ile, Val, Leu, Ala, Phe, Pro), polares (His, Lys, Arg cargados positivamente y Glu cargado negativamente) y polares sin carga (Gly, Gln, Cys, Thr, Ser, Tyr, Asn), como se ilustra en las Figuras 2.12 y 2.14.

4.1.2. Parámetros de orden de las colas hidrofóbicas

Una propiedad utilizada en dinámica y a nivel experimental es la determinación del orden de las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos, el parámetro de orden se define como un ensamble y una medida de alineación para cada pseudoenlace entre partículas promediada en el tiempo, siendo θ el ángulo entre el pseudoenlace y la normal de la bicapa. las cuales se obtienen a partir de resonancia magnética nuclear (RMN) con deuterios. El parámetro de orden puede ser definido para cada grupo de CH_2 en las cadenas hidrofóbicas como se expresa en la ecuación 4.2.

$$S_{CD} = \frac{1}{2}(3\langle \cos^2 \theta_{CD} \rangle - 1) \quad (4.2)$$

Donde θ_{CD} es el ángulo (dependiente del tiempo) entre el vector de enlace de un carbono etiquetado con un deuterio (CD-cadena) y un eje de referencia [Vermeer et al., 2007, HofsaB et al., 2003] y a nivel simulacional es del ángulo de un CH-cadena y la normal de la membrana. Los paréntesis angulares indican que debe ser un promedio de los dos enlaces de hidrógeno en cada grupo CH_2 , de todos los fosfolípidos y sobre el tiempo de simulación. Decidimos graficar los parámetros de orden con respecto a la posición en la cadena de forma separada para ambas cadenas del DPPC, cadena sn-1 (carbonos C34, C37-C50) y sn-2 (carbonos C15, C17-C31), ver figura 3.1. Para analizar a la molécula de colesterol, se tomaron los carbonos de sus anillos C y D, analizando así a los átomos C2-C6 y C8-C10, ver figura 3.2. Antes de partir a la comparación de todos los sistemas, se adjuntan los parámetros de orden de las dos cadenas de DPPC (sn-1 y sn-2) junto al colesterol para el mismo sistema de 30 %CHO-DPPC, en ausencia y presencia de un monómero de insulina respectivamente, como se puede apreciar en la figura 4.6.

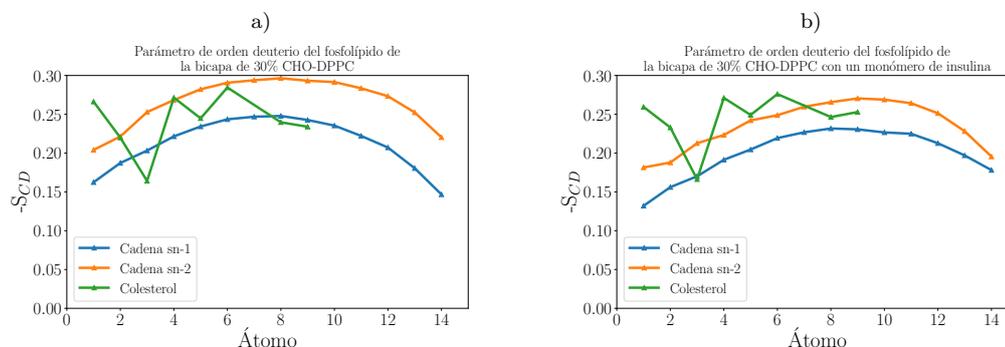


Figura 4.6: Parámetros de orden correspondientes de carbonos hidrofóbicos deuterados contra su posición en la cadena de fosfolípido de las cadenas sn-1 y sn-2 y el parámetro de orden de primeros 10 carbonos del colesterol de los últimos 10 nanosegundos de las bicapas de 30 % CHO-DPPC, a) sin y b) con un monómero de insulina

Con la figura 4.6 apreciamos que el perfil del orden de la cadena sn-2 tiende a ser mayor que el de la cadena sn-1 del fosfolípido DPPC, además de que el perfil del colesterol se mantiene en su mayoría en medio de ambos perfiles de las colas hidrofóbicas del fosfolípido. La tendencia curva, de acuerdo con [Schindler and Seelig, 1975] indica que los elementos predominantes en la estructura son segmentos trans orientados paralelos a la normal de la bicapa, tendencia que se observa en ambos sistemas, además de las figuras 4.7 y 4.8.

En la figura 4.7 el orden de las cadenas del fosfolípido sn-1 en los sistemas sin monómero de insulina observamos que tiende a tener un menor orden que la cadena sn-2, además de que ambas cadenas tienden a formar un pico pronunciado a la mitad de la cadena, comparando con el sistema de la bicapa de únicamente fosfolípido (en el gráfico, es el 0%CHO-DPPC), vemos que ese pico pronunciado puede deberse a la influencia del colesterol en los sistemas, comportamiento que también fué reportado por [HofsaB et al., 2003].

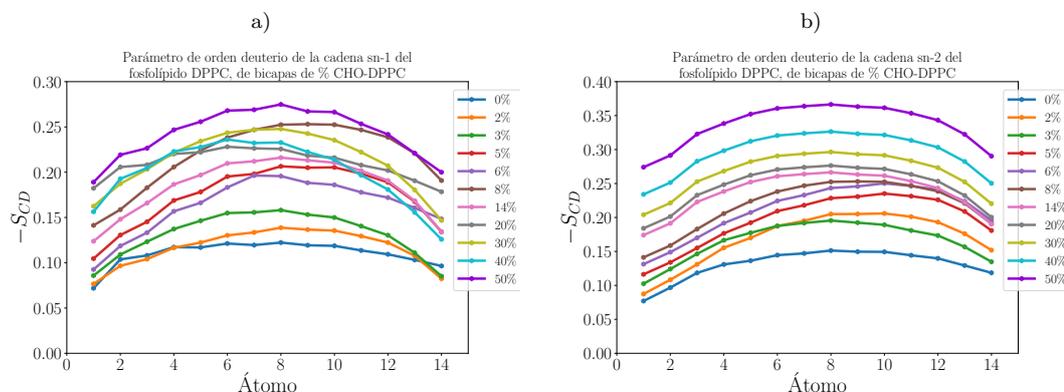


Figura 4.7: Parámetros de orden correspondientes a NMR deuterados contra su posición en la cadena de fosfolípido a diferentes concentraciones de colesterol de las cadenas a) sn-1 y b) sn-2 de las bicapas sin monómero de insulina

La interpretación de los parámetros de orden de deuterio cualitativamente puede caracterizarse como se describe a continuación. Las moléculas anfifílicas se anclan por sus grupos polares en la interfase lípido-agua. El empaquetamiento cercano de las cabezas polares impone restricciones estéricas en las cadenas de carbono hidrogenadas reduciendo la libertad conformacional de las moléculas individuales de la cadena [Seelig, 1977]. Esta es una justificación para el parámetro de orden constante en la parte inicial de la cadena. En la parte central de la bicapa, la cual es una región de extremos libres, las restricciones estéricas son liberadas y el valor de parámetro de orden disminuye.

El origen molecular de la flexibilidad de la cadena es debido a la rápida isomerización entre las conformaciones trans y gauche de los enlaces carbono-carbono. Para una discusión preliminar de los parámetros de orden es importante considerar dos tipos de cambios conformacionales, el primero y el de nuestro interés es el de formación de una sola conformación gauche aislada. La formación de un segmento aislado gauche implica la reorientación colectiva de todos los segmentos entre el segmento gauche y el terminal metilo libre de la cadena. Es energéticamente improbable que un estado aislado gauche se presente cerca de la interfase polar, dado que esto interrumpe el empaquetamiento paralelo de las cadenas hidrocarbonadas.

De igual manera, en la figura 4.8 podemos observar el orden de las colas hidrofóbicas sn-1 y sn-2 del DPPC para los sistemas de bicapas con un monómero de insulina, también observamos la formación de un pico en la cadena sn-1 al aumentar la concentración de colesterol por membrana, pero otra característica llamativa es que la cadena sn-2 en presencia de un monómero de insulina y mayores concentraciones de colesterol (de 30 hasta 50 %) también empieza a formar un pico al alejarse de los carbonos enlazados al glicerol.

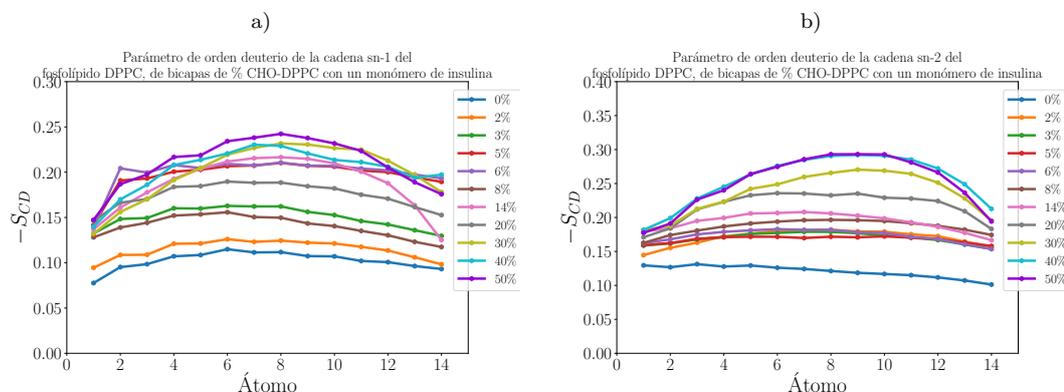


Figura 4.8: Parámetros de orden correspondientes a NMR deuterados contra su posición en la cadena de fosfolípido a diferentes concentraciones de colesterol de las cadenas a) sn-1 y b) sn-2 de las bicapas con un monómero de insulina

Comparando los parámetros de orden del colesterol para todos los sistemas, se muestran en la figura 4.9, graficando cada parámetro de orden con respecto a su posición en la molécula para cada concentración utilizada. De las cuales se observa que al aumentar la concentración de colesterol, el orden de los sistemas aumenta, además de que la influencia del monómero de insulina hace que los ordenes del colesterol disminuyan.

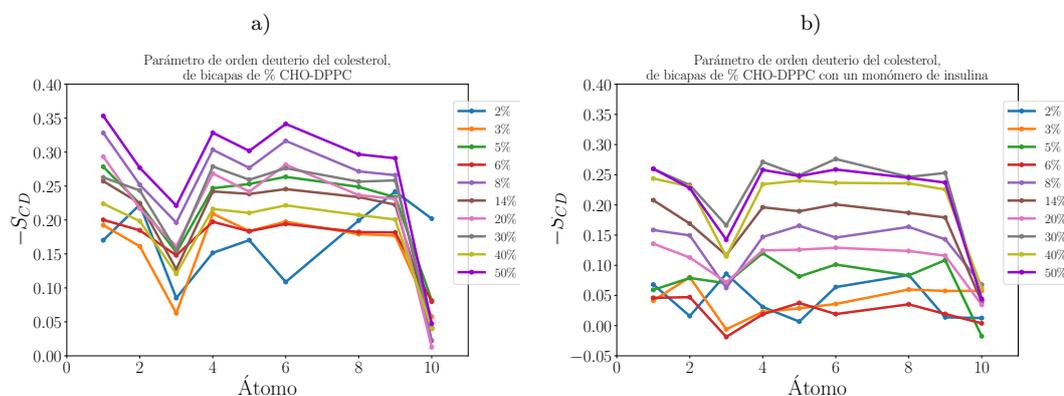


Figura 4.9: Parámetros de orden correspondientes a NMR deuterados contra su posición en la cadena de colesterol, de sistemas de bicapas a diferentes concentraciones de colesterol, a) en ausencia y b) en presencia de un monómero de insulina

Obteniendo el promedio del parámetro de orden de las cadenas sn-1, sn-2 y del colesterol y al agruparlas por concentración de colesterol, se obtienen los perfiles que apreciamos en la figura 4.10, de las cuales vemos que el orden promedio aumenta al incrementar la concentración de colesterol, además de que el perfil de la cadena sn-2

es mayor que el perfil de la cadena sn-1, y que el colesterol se mantiene paralelo entre ambas cadenas en la mayoría de los casos, relacionando esto con la posición del colesterol en las membranas, las cuales deben orientarse paralelamente a las colas hidrofóbicas sn-1 y sn-2.

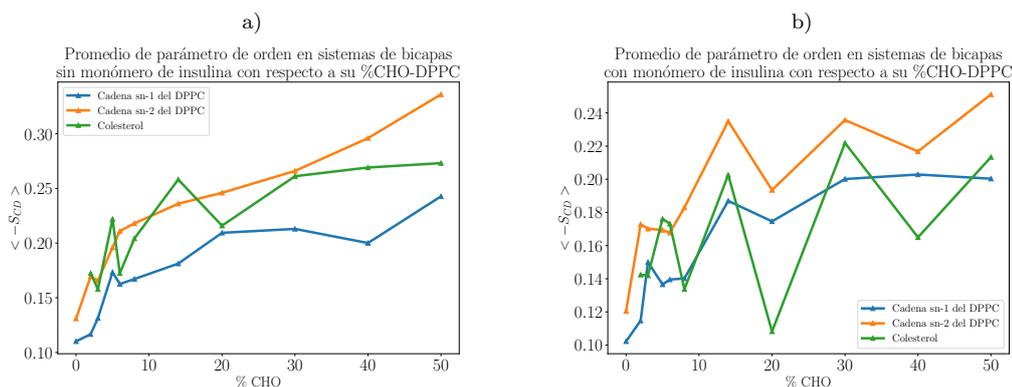


Figura 4.10: Promedio del parámetro de orden contra la concentración de colesterol de las cadenas sn-1, sn-2 y del colesterol de las bicapas a) en ausencia y b) en presencia de un monómero de insulina

Lo que podemos observar al comparar gráficamente el valor promedio del orden de los carbonos correspondientes de la cadena sn-1, sn-2 y los carbonos correspondientes al colesterol es que, la tendencia de la cadena sn-2 es aumentar con respecto a la concentración de colesterol. La cadena sn-1, por su parte presenta un pico en la concentración de 5%CHO-DPPC, pico que podría corresponder a un valor promedio obtenido de 14%CHO-DPPC, fenómeno también reportado por [HofsaB et al., 2003]. También observamos que la tendencia del colesterol no es lineal, en los sistemas con un monómero de insulina observamos que en las concentraciones de 20 y 40%CHO-DPPC sus valores promedio tienden a un menor orden, probablemente observamos un cambio conformacional de la molécula al comparar también el perfil obtenido del gráfico 4.9. El parámetro de orden es importante calcularlo, dado que gracias a la ecuación 4.3 se pueden relacionar directamente con la división residual de cuadrupolos ($\Delta\nu_Q$), lo cual son resultados de resonancia magnética nuclear [Seelig and Waespe-Sarcevic, 1978].

$$\Delta\nu_Q = \left(\frac{3}{4}\right)\left(\frac{e^2qQ}{h}\right)S_{CD} \quad (4.3)$$

La constante estática de acoplamiento del cuadrupolo de deuterón, representada como (e^2qQ/h) , se ha medido en 170 kHz para enlaces alifáticos C-D, de acuerdo a una referencia histórica [Seelig and Waespe-Sarcevic, 1978]. Los valores de $\Delta\nu_Q$, calculados a partir de la ecuación 4.3, con el valor de la constante antes mencionada, se detallan en la tabla 4.1, y presenta los valores de $\Delta\nu_Q$ del primer carbono de las colas hidrofóbicas

Carbono 1 de la cola hidrofóbica	$\Delta\nu_Q$ (kHz)										
	%CHO-DPPC										
	0	2	3	5	6	8	14	20	30	40	50
sn-1 sin insulina	9.16	9.77	10.94	13.33	11.80	13.61	15.78	23.2	20.70	19.93	24.09
sn-2 sin insulina	9.82	11.13	13.06	14.83	16.74	18.01	22.19	23.47	26.02	29.84	34.94
sn-1 con insulina	9.89	12.04	16.87	18.04	17.72	16.33	17.46	18.64	16.83	17.80	18.78
sn-2 con insulina	16.51	18.43	20.23	20.32	20.67	20.73	23.16	22.88	23.13	21.78	22.61

Tabla 4.1: Divisiones residuales del cuadrípulo de deuterio residual ($\Delta\nu_Q$) en kHz para el primer carbono de las colas hidrofóbicas sn-1 y sn-2 del fosfolípido de bicapas de DPPC con diferentes concentraciones de colesterol en ausencia y presencia de un monómero de insulina.

sn-1 y sn-2 del fosfolípido DPPC a diferentes concentraciones de colesterol, tanto en ausencia como en presencia de un monómero de insulina.

Al examinar los valores de división residual de cuadrupolos reportados, el artículo [Akutsu, 2020] menciona valores de fosfatidilcolina que se asemejan a los valores obtenidos en la tabla 4.1 a mayores concentraciones de colesterol (desde 20 hasta 50 % CHO-DPPC).

Analizando la tabla 4.1, se observa que al aumentar la concentración de colesterol en los sistemas sin monómero de insulina, el valor calculado de $\Delta\nu_Q$ aumenta en consonancia con el incremento del colesterol por bicapa para ambas colas sn-1 y sn-2. También se observa que en ambos casos la cola sn-2 tiende a tener mayores valores que la cola sn-1.

Por otro lado, la presencia del monómero de insulina en la caja de simulación afecta significativamente a los valores calculados, especialmente en lo que respecta a la cola hidrofóbica sn-2. Se nota que la cola sn-1 tiende a aumentar su valor calculado de $\Delta\nu_Q$ a medida que aumenta la concentración de colesterol desde 0 hasta 14 % CHO-DPPC debido a la influencia del monómero de insulina. Además, se observa que la influencia del monómero de insulina provoca una disminución en el valor de $\Delta\nu_Q$ para la cola sn-1, pero la cola sn-2 aumenta compensando esta disminución en las concentraciones de 20 hasta 50 % CHO-DPPC.

El hecho que los valores fluctuen con respecto a la concentración de colesterol corrobora que las moléculas no forman dominios aislados, mezclándose a nivel molecular.

4.1.3. Área por lípido de cada membrana

La determinación del área por lípido es un parámetro reportado para el DPPC, y tiene un valor de 0.64 nm^2 (64\AA^2 [Nagle, 1993]) el cual fue el criterio de utilizar 64 fosfolípidos por lado en la membrana (teniendo un total de 128 lípidos). Sin embargo, al aumentar la concentración de colesterol por bicapa, la influencia de esta propiedad cobra una importancia significativa en la estructura y dinámica de la membrana. Por lo tanto, se calcularon las áreas por lípido de cada sistema utilizando la ecuación 4.4 [Berger et al., 1997]. Este enfoque nos permite cuantificar cómo varía el área por lípido en presencia de diferentes concentraciones de colesterol, lo que nos ayuda a comprender mejor cómo el colesterol afecta la organización y las propiedades de la membrana.

$$APL = \frac{Box - X * Box - Y}{64} \quad (4.4)$$

La ecuación de área por lípido utilizada fue la 4.4 [Berger et al., 1997], donde Box-X y Box-Y son las dimensiones de la caja de simulación en los eje X y Y, respectivamente.

Área por lípido			
Bicapa	APL (nm ²)	Bicapa con monómero de insulina	APL (nm ²)
0 %CHO-DPPC	0.6328	0 %CHO-DPPC	0.6375
2 %CHO-DPPC	0.6203	2 %CHO-DPPC	0.6249
3 %CHO-DPPC	0.6190	3 %CHO-DPPC	0.6243
5 %CHO-DPPC	0.6191	5 %CHO-DPPC	0.6225
6 %CHO-DPPC	0.6191	6 %CHO-DPPC	0.6234
8 %CHO-DPPC	0.6177	8 %CHO-DPPC	0.6226
14 %CHO-DPPC	0.6139	14 %CHO-DPPC	0.6192
20 %CHO-DPPC	0.6136	20 %CHO-DPPC	0.6174
30 %CHO-DPPC	0.6093	30 %CHO-DPPC	0.6133
40 %CHO-DPPC	0.6059	40 %CHO-DPPC	0.6099
50 %CHO-DPPC	0.6020	50 %CHO-DPPC	0.6029

Tabla 4.2: Área por lípido de las bicapas de acuerdo a su concentración de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC) y la presencia del monómero de insulina en el área por lípido de la membrana calculadas de acuerdo a la ecuación 4.4.

De acuerdo con la tabla 4.2 vemos que el área por lípidos totales (se mantiene constante el valor de lípido por lado en la ecuación 4.4) disminuye al aumentar la concentración de colesterol por sistema, además de que la influencia del monómero de insulina es aumentar el área por lípido, recalcamos el hecho de que la influencia de ambos no disminuye tanto el valor del área por lípido, de acuerdo a [Vermeer et al., 2007, Chapman et al., 1969], es una tendencia normal, debido a que aunque el colesterol se encuentra en las colas hidrofóbicas de forma paralela, el colesterol tiene poco efecto en esta propiedad.

Al disminuir el área por lípido, teniendo condiciones con mismas cantidades de agua, la diferencia en el volumen de los sistemas también se vio afectada, por lo que anexamos el volumen de las cajas de simulación obtenidas de acuerdo a la ecuación 4.5.

$$V_{sistema} = Box - X * Box - Y * Box - Z \quad (4.5)$$

De igual forma que en la ecuación 4.4, Box-Z en la ecuación 4.5 es la dimensión de la caja de simulación en el eje Z.

Volúmen del sistema			
Bicapa	$V_{sistema}$ (nm ³)	Bicapa con monómero de insulina	$V_{sistema}$ (nm ³)
0 %CHO-DPPC	644.699	0 %CHO-DPPC	651.647
2 %CHO-DPPC	640.575	2 %CHO-DPPC	649.036
3 %CHO-DPPC	640.054	3 %CHO-DPPC	647.834
5 %CHO-DPPC	638.181	5 %CHO-DPPC	644.487
6 %CHO-DPPC	638.298	6 %CHO-DPPC	646.193
8 %CHO-DPPC	635.787	8 %CHO-DPPC	644.692
14 %CHO-DPPC	631.296	14 %CHO-DPPC	638.427
20 %CHO-DPPC	628.251	20 %CHO-DPPC	635.182
30 %CHO-DPPC	620.446	30 %CHO-DPPC	627.563
40 %CHO-DPPC	614.193	40 %CHO-DPPC	621.568
50 %CHO-DPPC	607.135	50 %CHO-DPPC	613.826

Tabla 4.3: Volumen de los sistemas de bicapas de acuerdo a su concentración de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC) y la presencia del monómero de insulina de la membrana, calculadas de acuerdo a la ecuación 4.5.

Conforme aumenta la concentración de colesterol, disminuye el volúmen total del sistema, de acuerdo a lo que podemos apreciar en la tabla 4.3, lo cual se puede entender desde el hecho de que la molécula de colesterol tiene un volumen menor que el de un fosfolípido de DPPC.

4.1.4. Energía configuracional

Para calcular la energía de interacción de cada sistema, incluyendo las moléculas de agua, fosfolípido, colesterol y en su caso, insulina; fueron calculadas las energías de Lennard-Jones (LJ) y las de Coulomb (Coul), energías de interacción no enlazantes [Abraham et al., 2015] de las cuales se llevó a cabo la suma de ambas energías para obtener la energía de interacción total, lo cual se expresa con la ecuación 4.6.

$$E_{total-sistema-interés} = E_{total-sistema-LJ} + E_{total-sistema-Coul} \quad (4.6)$$

A partir de la ecuación 4.6, fué obtenida la relación 4.7 para el cálculo de la contribución energética, con la cual, se utilizó la energía del sistema de la bicapa de 0 %CHO-DPPC ($E_{total-0\%CHO-DPPC}$) el cual fué multiplicado su porcentaje de DPPC usado (%DPPC).

$$E = E_{total-sistema-interés} - \%DPPC * E_{total-0\%CHO-DPPC} \quad (4.7)$$

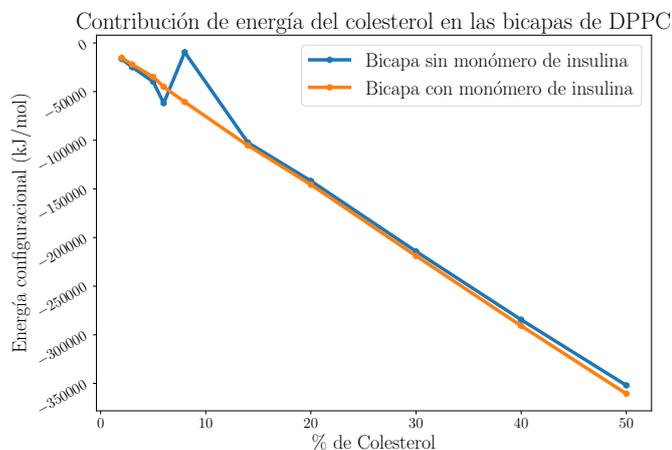


Figura 4.11: Contribución de energía configuracional para las bicapas de % colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC, calculado de acuerdo a la ecuación 4.7 para las bicapas en ausencia y presencia de un monómero de insulina

Con la figura 4.11 se observa que conforme aumenta la concentración de colesterol, la energía de los sistemas disminuye, a lo cual puede significar que la disposición de los componentes requiere menos energía para mantenerla, implicando que el sistema tiende a mantener esta configuración más favorable desde el punto de vista energético. Las excepciones pueden verse a menores concentraciones de colesterol, como el caso de las bicapas sin monómero de insulina en las concentración de 8% CHO-DPPC, con la cual se observa que el sistema no está tan favorecido a comparación de ese mismo sistema con un monómero de insulina, observando que la influencia de esta proteína en las bicapas también aporta estabilidad a nivel energético.

Con los diferentes análisis de las bicapas como lo fueron sus perfiles de densidad, parámetros de orden de las colas hidrofóbicas, el área por lípido de las bicapas y las energías configuracionales de los sistemas, fué considerado que a estas condiciones de simulación sería necesario más tiempo de simulación, pero se desconoce con exactitud el intervalo faltante para empezar a observar la formación de vesículas.

En el proceso experimental de preparación de los liposomas, se utilizan disolventes orgánicos para formar las bicapas. Luego, se elimina el disolvente para obtener películas, y posteriormente se emplea un medio acuoso para cargar el fármaco polar en el centro acuoso de la vesícula. Dado que la insulina es una proteína globular y, por lo tanto, soluble en agua, este proceso se lleva a cabo mediante agitación y cambios de temperatura, lo que facilita la introducción mecánica del fármaco. Además, al iniciar este proceso, nos enfrentamos a la necesidad de proponer una nueva cantidad de fosfolípidos y colesterol que mantengan el área por lípido del DPPC. Con este fin, propusimos la preparación de liposomas con el monómero de insulina ya incorporado en su centro acuoso. Se llevaron a cabo simulaciones tanto con liposomas cargados con un monómero

de insulina en su centro acuoso, así como liposomas sin insulina, utilizando la misma metodología empleada para la formación de las bicapas.

4.2. Resultados de los liposomas

4.2.1. Excentricidad a partir de radio de giro para liposomas esféricos

Fueron analizadas los radios de giro y los momentos de excentricidad de las vesículas, se encontró que al aumentar la concentración de colesterol, los liposomas disminuían su radio de giro, como se observa en la figura 4.12, encontrando sistemas aún más esféricos con las mayores concentraciones de colesterol, esto pudiendo deberse al fenómeno de rigidez que el colesterol tiene sobre los fosfolípidos.

El cálculo del radio de giro [Abraham et al., 2015] es mediante la ecuación 4.8:

$$Rg(x) = \sqrt{\frac{\sum_i m_i \|r_i\|^2}{\sum_i m_i}} = \sqrt{\frac{I}{\sum_i m_i}} \quad (4.8)$$

Donde m_i es la masa del átomo i y r es la posición del átomo i con respecto a centro de masa de la molécula. A partir de esta relación se puede obtener el momento de inercia (I), la cual es de ayuda para el cálculo de excentricidad (e), expresada en la ecuación 4.9.

$$e = 1 - \frac{I_{\text{mínimo}}}{\langle I \rangle} \quad (4.9)$$

A partir del radio de giro también se puede calcular el radio de una esfera, de acuerdo con la ecuación 4.10.

$$r_s = \sqrt{\frac{5}{3}} Rg \quad (4.10)$$

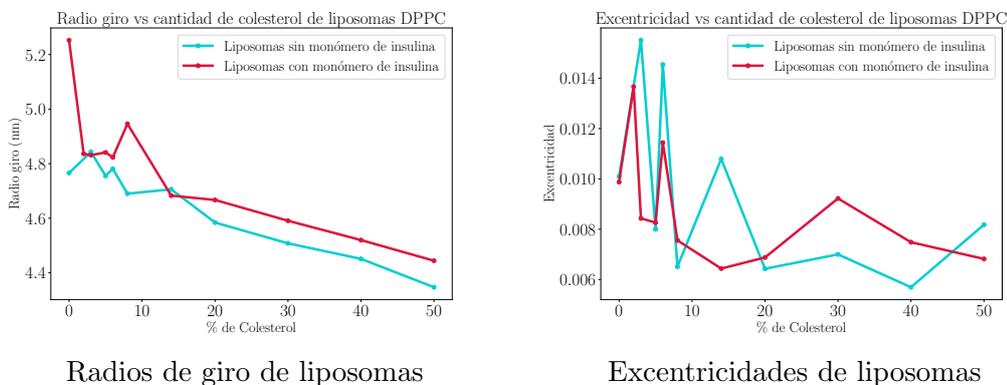


Figura 4.12: Radio de giro y excentricidades del fosfolípido.

Al saber que una excentricidad cercana a cero implica que tenemos un sistema esférico, lo que apreciamos en la figura 4.12 es que al aumentar la concentración de colesterol la excentricidad es más cercana a cero, junto a los resultados de orden de las bicapas atribuimos este fenómeno al empaquetamiento de los colesteroles compactando las colas hidrofóbicas del fosfolípido, además de justificar que la aproximación del agregado a una esfera es correcto, con lo cual se puede calcular los perfiles de densidad radial a partir de esa aproximación, como a continuación se explica.

4.2.2. Perfiles de densidad radial de liposomas

Los perfiles de densidad radial fueron realizados con el objetivo de observar la estructura de los liposomas en las simulaciones. Para ello se calculó la densidad del número de átomos concerniente a cada grupo presente en la molécula del fosfolípido: la cabeza polar, el glicerol-éster y las cadenas hidrofóbicas de acilos; además, de que se calculó el perfil de densidad radial de las moléculas de colesterol y el monómero de insulina con la misma metodología que con las bicapas (agrupando átomos de la molécula de DPPC como se observa en la figura 3.1 del capítulo 3).

El cálculo de los perfiles de densidad radiales fué realizado a diferentes distancias radiales desde el centro del liposoma. Partiendo de la definición de un perfil de densidad radial, ($\rho(r)$), el cual es el número de átomos por unidad de volumen [Cedillo-Cruz et al., 2021].

$$\rho(r) = \frac{\text{número de átomos}}{\text{nm}^3} = \frac{dN}{dV} \quad (4.11)$$

Para obtener el número de átomos, uno debe calcular la integral definida por el perfil de densidad radial con respecto al volumen desde el centro del liposoma al radio de corte, lo cual se expresa:

$$\text{número de átomos} = \int_0^{r_c} \rho(r) dV \quad (4.12)$$

Un agregado con una excentricidad cercana a cero [LeBard et al., 2012] es cercano a ser esférico. Con esta condición, con la ecuación del volumen de una esfera, sustituimos $dV = 4\pi r^2 dr$, y obtenemos:

$$\text{número de átomos} = \int_0^{r_c} \rho(r) 4\pi r^2 dr \quad (4.13)$$

A continuación, se muestran las comparaciones del corte transversal de las configuraciones finales y los perfiles de densidad radial obtenidos para los sistemas más representativos: sistemas de 14 %, 20 %, 30 %, 40 % y 50 % de colesterol con y sin monómero de insulina en su centro acuoso.

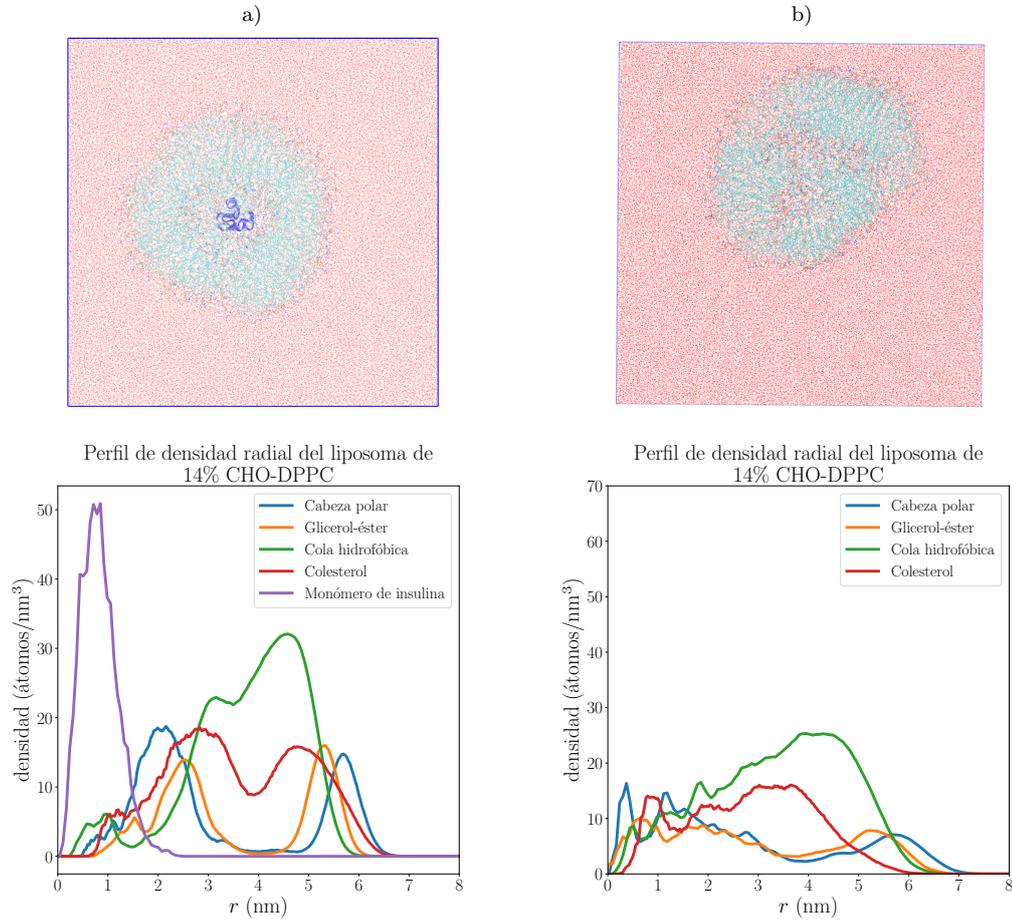


Figura 4.13: Configuraciones finales y perfiles de densidad radial de liposomas de 14% CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina en su centro acuoso, configuraciones finales de 30ns

En la figura 4.13 comparando los perfiles de densidad de los liposomas de la misma concentración pero en ausencia o presencia del monómero de insulina, podemos observar que su presencia afecta el orden de la membrana de la vesícula. Se observan picos mejor definidos de la vesícula con la insulina para el caso de los grupos de la cabeza polar, los glicerol ester y el colesterol. El liposoma mantiene al monómero de insulina en su centro acuoso pasando los 30 nanosegundos de simulación, y curiosamente la insulina provoca que los picos de los perfiles se muestren más definidos, mostrando la estructura de la membrana que posee.

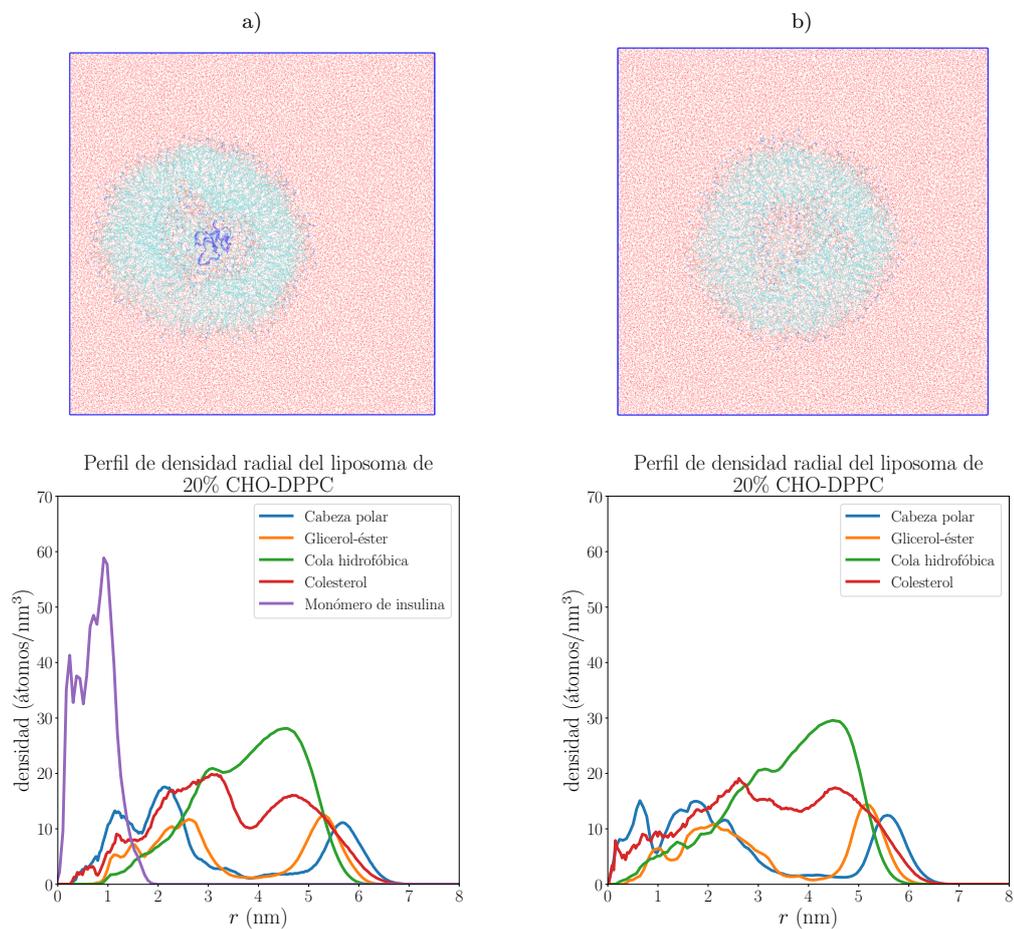


Figura 4.14: Configuraciones finales y perfiles de densidad radial de liposomas de 20% CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina en su centro acuoso, configuraciones finales de 30ns

Del mismo modo vemos en la figura 4.14 los perfiles de densidad radial de los liposomas cuya concentración de colesterol-DPPC fué del 20 %, comparando las configuraciones finales de una simulación de 30 nanosegundos de los sistemas en ausencia y en presencia de un monómero de insulina en su centro acuoso.

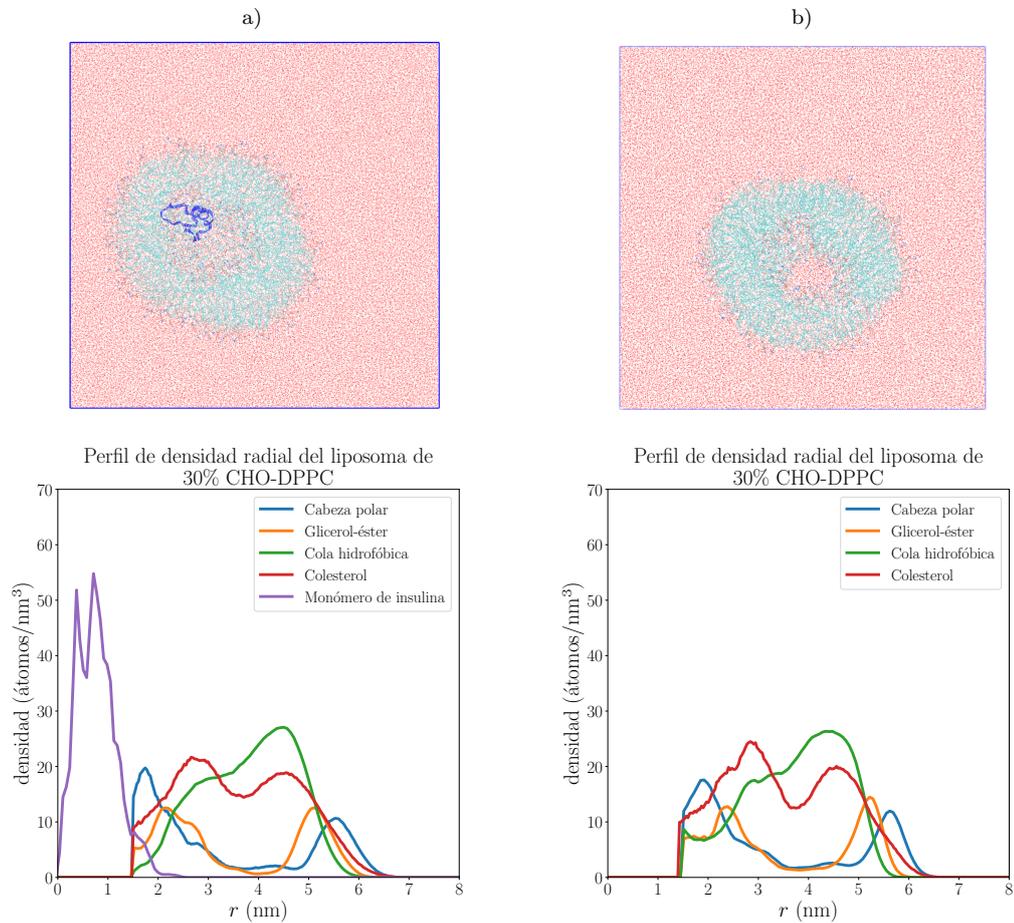


Figura 4.15: Configuraciones finales y perfiles de densidad radial de liposomas de 30 % CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina en su centro acuoso, configuraciones finales de 30ns

Comparando ambos sistemas de liposomas de 30 % colesterol-DPPC con la figura 4.15, uno con un monómero de insulina y el otro en su ausencia, vemos de igual manera que los perfiles de densidad de las secciones del fosfolípido se refinan, manteniendo en su centro acuoso al monómero de insulina.

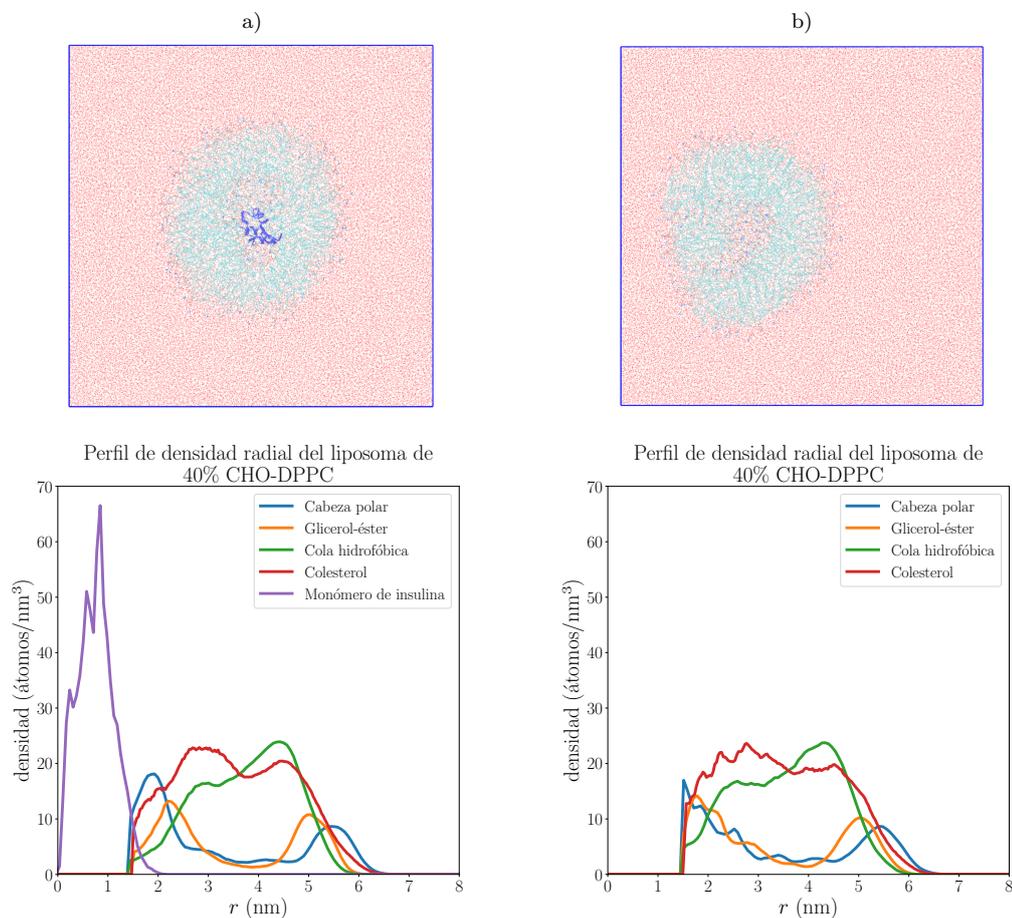


Figura 4.16: Configuraciones finales y perfiles de densidad radial de liposomas de 40% CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina en su centro acuoso, configuraciones finales de 30ns

En la figura 4.16 también hacemos la comparativa de las configuraciones finales de un tiempo de simulación de 30 nanosegundos, de igual forma vemos que los perfiles de densidad radial de la bicapa compuesta por fosfolípido DPPC y colesterol muestra picos más definidos que en ausencia del monómero de insulina.

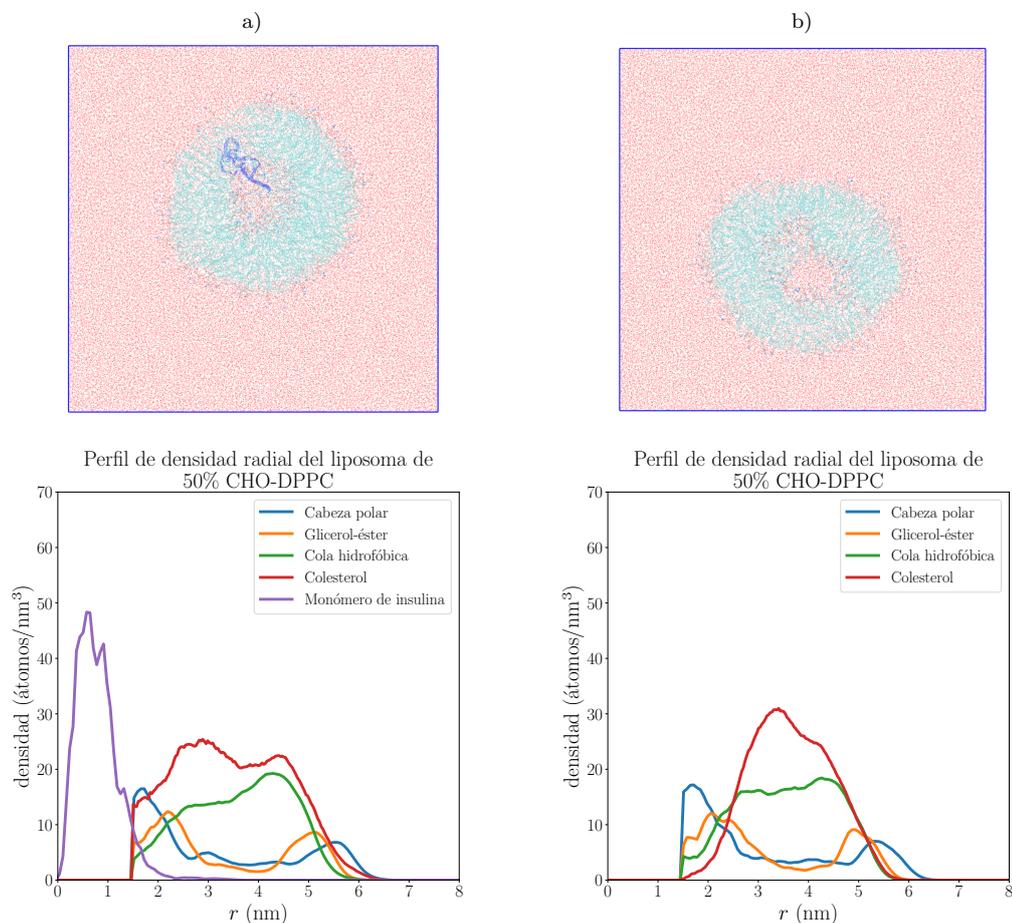


Figura 4.17: Configuraciones finales y perfiles de densidad radial de liposomas de 50 % CHO-DPPC a) con y b) sin un monómero de insulina en su centro acuoso, configuraciones finales de 30ns

Finalmente, comparando los perfiles de densidad radial de los liposomas cuya concentración colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC) es de 50 % en la figura 4.17, vemos que al ser la concentración más alta de colesterol propuesta en estas simulaciones, el perfil de la molécula de colesterol se mantiene a una altura similar al de los perfiles de densidad radial de la cola hidrofóbica de los fosfolípidos. También podemos apreciar que la membrana mantiene un grosor de membrana de 4.5nm en presencia y ausencia del monómero de insulina.

4.2.3. Perfiles de densidad radial eléctricos

En esta sección se calculan los perfiles de densidad eléctrica Sabiendo los perfiles de

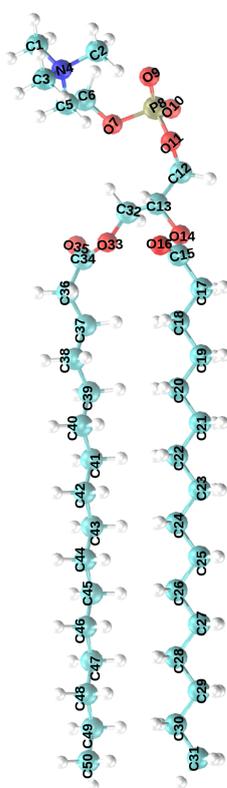


Figura 4.18: Etiquetas del DPPC.

Sistema	Átomo	Carga asociada
Cabeza polar	C1	0.4
	C2	0.4
	C3	0.4
	N4	-0.5
	C5	0.3
	C6	0.4
	O7	-0.8
	P8	1.7
	O9	-0.8
	O10	-0.8
O11	-0.7	
Glicerol-éster	C12	0.4
	C13	0.3
	O14	-0.7
	C15	0.7
	O16	-0.7
	C32	0.5
	O33	-0.7
	C34	0.8
	O35	-0.6

Tabla 4.4: Carga asociada a átomos del fosfolípido DPPC.

densidad radial de cada átomo, se multiplica cada uno por su carga puntual asociada y se suman todos para obtener el perfil de densidad radial total eléctrico. A continuación se presentan 4 perfiles de densidad radial de cada átomo cargado del fosfolípido, figuras de los liposomas de 0 y 20 % colesterol-DPPC.

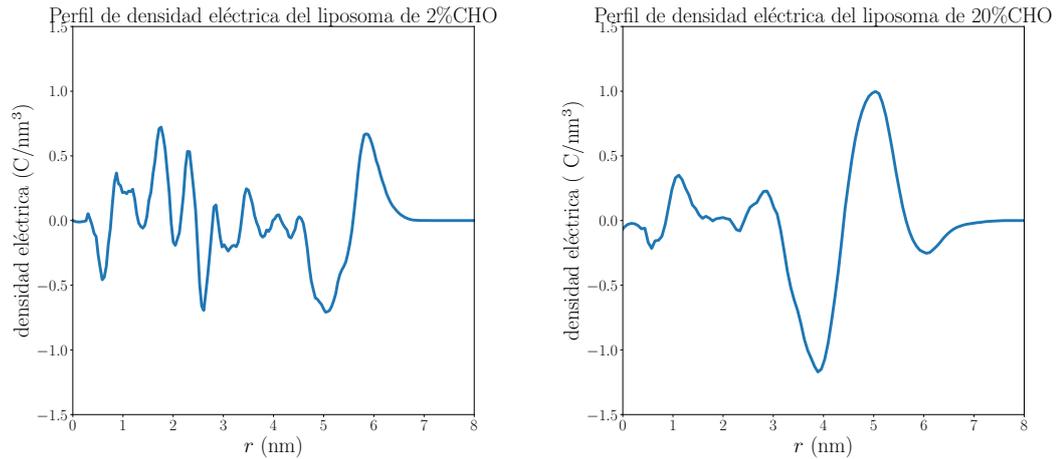


Figura 4.19: Perfiles de densidad radial eléctrica de liposomas de 2%CHO y de 20%CHO

Como se puede apreciar en la Figura 4.19, se muestra el perfil de densidad eléctrica de los liposomas con 2% y 20% de colesterol, ambos sin la presencia del monómero de insulina. Ambos perfiles muestran una distribución de densidad que abarca los fosfolípidos del interior de la membrana. Se observa una mayor cantidad de picos antes de alcanzar el borde superficial. Esta característica se debe a que los perfiles de densidad eléctrica se obtuvieron mediante la suma de todos los perfiles de densidad radial de cada átomo, multiplicados por sus cargas respectivas. Es probable que esta mayor cantidad de picos refleje el grado de desorden en la membrana, el cual parece disminuir con el incremento de la concentración de colesterol. Al final de la distribución de densidad, se observan picos con un marcado contraste entre un pico negativo y otro positivo. Estos picos podrían corresponder al fosfato y al grupo colina respectivamente, dados los patrones de carga de estos grupos químicos. A medida que la distancia supera los 7 nanómetros, la distribución tiende a la neutralidad, lo que indica que hemos pasado el borde superficial.

4.2.3.1. Campo, potencial eléctrico y potencial zeta

Justificando que la interacción es electrostática y no de otra naturaleza, nos interesa el campo eléctrico, el cual definimos con la ecuación 2.36 del marco teórico

$$E(r) = \frac{1}{\varepsilon_0} \int_0^d \rho(r) dr \quad (4.14)$$

Y el potencial eléctrico:

$$V(r) = -\frac{1}{\varepsilon_0} \int_0^d \int_0^d q(r) dr dr \quad (4.15)$$

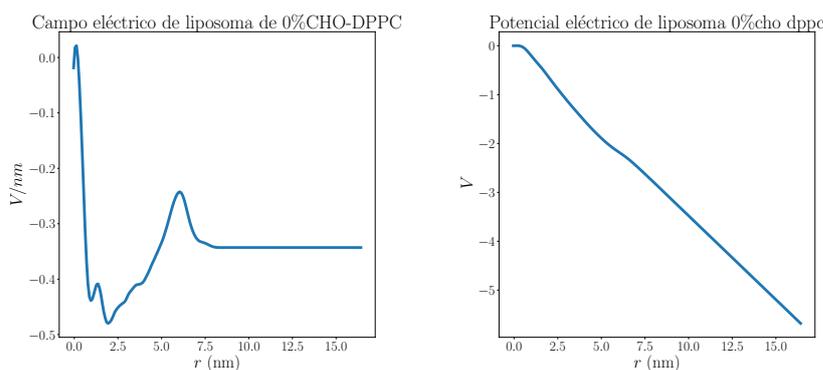


Figura 4.20: Campo y potencial eléctrico graficado del liposoma de 0%CHO-DPPC

En la figura 4.20 observamos el campo y el potencial eléctrico del liposoma sin colesterol (únicamente fosfolípido), observamos que desde el origen del liposoma hasta 3.5nm tiene un valle negativo, lo cual podría atribuirse a los grupos fosfato, pasando los 4 nanometros vemos una distribución de carga que no es lo suficientemente intensa para alterar significativamente el campo eléctrico que sigue siendo negativo, esta distribución de carga diferente puede representar el grupo colina y los carbonos δ positivos intramoleculares. El potencial eléctrico no posee un máximo y un mínimo definido, teniendo una pendiente negativa que decrece conforme avanza en la caja de simulación. Estos gráficos representan la carga de los liposomas.

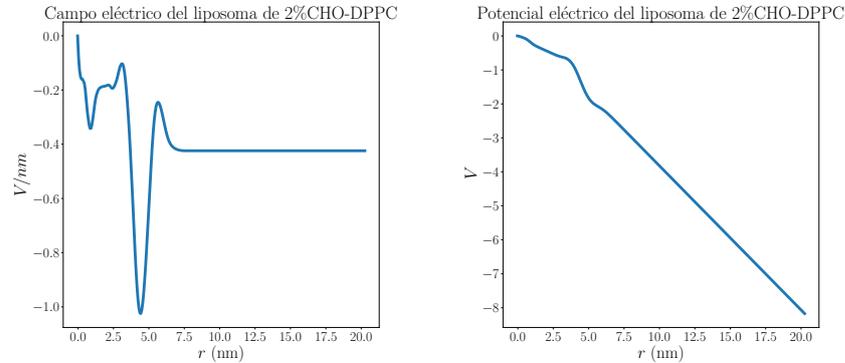


Figura 4.21: Campo y potencial eléctrico graficado del liposoma de 2%CHO-DPPC

Se observa en la figura 4.21 el campo y el potencial eléctrico del liposoma de 2%CHO-DPPC de concentración, los cuales fueron calculados de acuerdo con la ecuación 4.14 y 4.15, respectivamente. En el campo eléctrico se observa que llega a un pozo de potencial entre 4 y 5 nanómetros del centro de la vesícula, en la superficie vemos que aumenta el campo pero se mantiene constante en un valor de -0.4, lo cual implicaría que el liposoma carga la caja de simulación. De igual manera el potencial eléctrico tiene una pendiente negativa, del cual no tiene bien marcado el mínimo y máximo para el cálculo de la diferencia de potencial. La disminución observada del potencial al aumentar el radio es consistente con la ley de Coulomb, que establece que debido a una carga puntual el potencial electrostático disminuye inversamente con la distancia respecto a la carga.

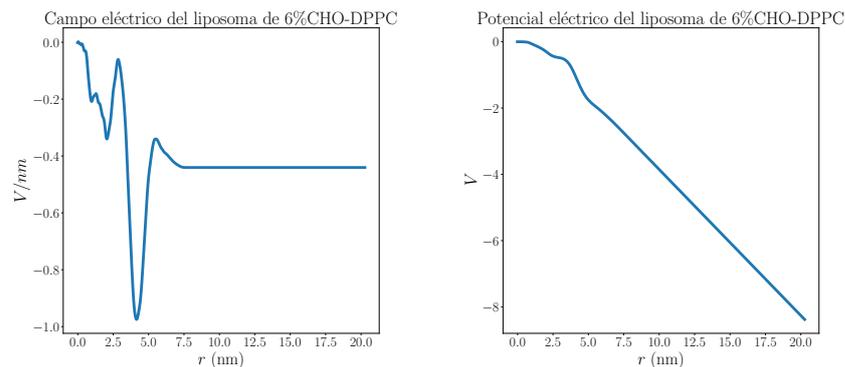


Figura 4.22: Campo y potencial eléctrico graficado del liposoma de 6%CHO-DPPC

La figura 4.22 muestra el campo eléctrico obtenido a partir de la integración del

perfil de densidad radial eléctrico $q(r)$, y un aumento ligero para mantener constante el campo en -0.4 V. La integración de este campo eléctrico da un potencial eléctrico que no tiene bien definido el máximo y el mínimo, con una pendiente negativa. En los gráficos del potencial eléctrico de las vesículas de 2 % y de 6 % CHO-DPPC vemos un cambio en la pendiente entre 3 y 5 nanómetros, lo cual podría corresponder a las distancias intermoleculares o interpartículas donde ocurren cambios significativos, puede deberse a interacciones en la propia membrana, recordando que estas vesículas tienen una baja concentración de colesterol, por lo que puede implicar la formación de una ondulación.

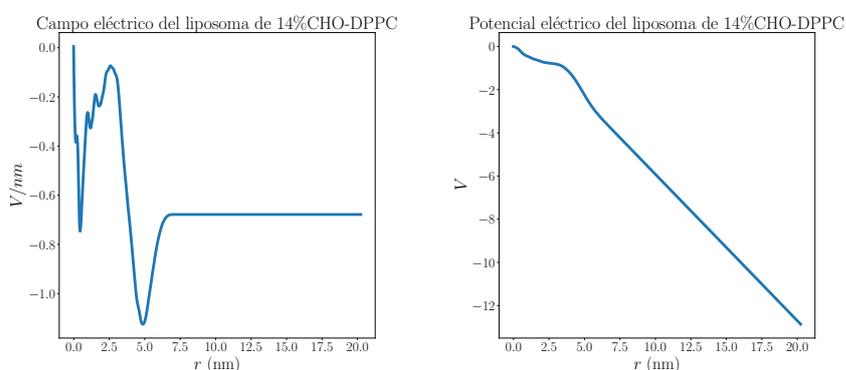


Figura 4.23: Campo y potencial eléctrico graficado del liposoma de 14%CHO-DPPC

Con la comparativa del campo y potencial del liposoma de 14 % CHO-DPPC, observamos un campo eléctrico negativo que se mantiene en -0.8 V/m al alejarse de las cargas que lo generan.

Lo que observamos al aumentar la concentración de colesterol en las vesículas, es que el campo y el potencial eléctrico mantienen una carga negativa que no tiene una tendencia lineal, pero tampoco difieren tanto unas de las otras, por lo que el colesterol parece no afectar en la carga superficial, dado que este únicamente separa las cabezas unas de otras al orientarse en la cola hidrofóbica del fosfolípido. Vemos gráficos con tendencias similares en presencia y ausencia del monómero de insulina, por lo que remarcamos la carga depende meramente de la concentración de fosfolípido, el cual puede interactuar con las moléculas de agua, colesterol y el monómero de insulina.

4.2.3.2. Potencial electrostático superficial

Una vez obtenido el potencial eléctrico de la superficie de cada sistema, se obtuvo una diferencia de potencial ΔV , es cual fue considerado una aproximación al *potencial zeta*, pero en realidad es el potencial electrostático superficial, dado que el sistema no posee una capa difusa, además de que, por la tendencia de los potenciales obtenidos, están entre el potencial de superficie y el potencial de Stern.

El potencial zeta fué calculado como se expresa en la ecuacion 4.16:

$$\Delta V = V_{20nm} - V_{7.5nm} \quad (4.16)$$

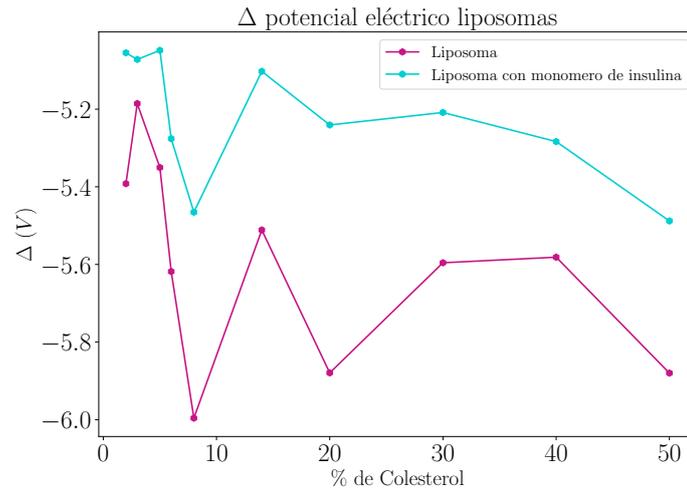


Figura 4.24: Comparativa ΔV superficial de liposomas estudiados

La diferencia de potencial revela que la interacción del monómero de insulina con el liposoma modifica ligeramente la carga de este último hacia valores menos negativos. A pesar de las variaciones observadas, es importante destacar que dichos valores negativos se mantuvieron en un rango cercano, oscilando entre -5 y -6 V/m. Estas mediciones fueron obtenidas siguiendo el criterio establecido en la ecuación mencionada 4.16, lo cual proporciona una base sólida para la interpretación de los resultados. Los resultados experimentales de liposomas con DPPC y colesterol reportan mismas tendencias pero valores que oscilan de -10 a -13 mV [Le-Deygen et al., 2022], por lo que los valores obtenidos con esta aproximación fueron 500 veces el valor experimental.

4.2.4. Interacciones de residuos de aminoácidos específicos con la cabeza polar

Sabemos que la energía es una propiedad extensiva de la materia, pero también nos interesa conocer el tipo de interacción entre los diferentes residuos de aminoácidos con la cabeza polar del fosfolípido (la cual tiene un grupo colina positivo y un grupo fosfato negativo). La energía de interacción entre los grupos fosfato ($-PO_4^-$) y colina ($-N^+(CH_3)_3$) con residuos de aminoácidos de interés para este trabajo: positivos (His, Arg, Lys), negativos (Glu), polar sin carga (Gln, Cys, Thr, Ser, Asn, Pro) y aromáticos (Tyr). La energía de interacción total ($IE_{interacción_{total}}$), definida como la

combinación de las energías de corto alcance de Lennard-Jones (LJ-SR) y Coulomb (Coul-SR) [Trabalzini et al., 2022], se analizó en relación a la interacción de los residuos de aminoácidos con la cabeza polar del fosfolípido a distintas concentraciones de colesterol. Matemáticamente, este valor se expresa como la suma de las contribuciones de Coulomb y Lennard-Jones, ver ecuación 4.6.

Este enfoque permite cuantificar y comprender mejor la influencia del colesterol en las interacciones entre los residuos de aminoácidos y la cabeza polar de los fosfolípidos, observando el comportamiento molecular en este sistema específico. Las interacciones estudiadas fueron las siguientes: $Glu - N^+(CH_3)_3$, $His - PO_4^-$, $Arg - PO_4^-$, $Lys - PO_4^-$, $Cys - PO_4^-$, $Ser - PO_4^-$, $Thr - PO_4^-$, $Asn - PO_4^-$, $Gln - PO_4^-$, $Pro - PO_4^-$, $Asn - N^+(CH_3)_3$, $Gln - N^+(CH_3)_3$, $Pro - N^+(CH_3)_3$, $Tyr - PO_4^-$, $Thr - PO_4^-$, $Tyr - N^+(CH_3)_3$ y $Thr - N^+(CH_3)_3$ se observan en los siguientes gráficos, las cuales sugieren que hay interacciones espontáneas de alta afinidad.

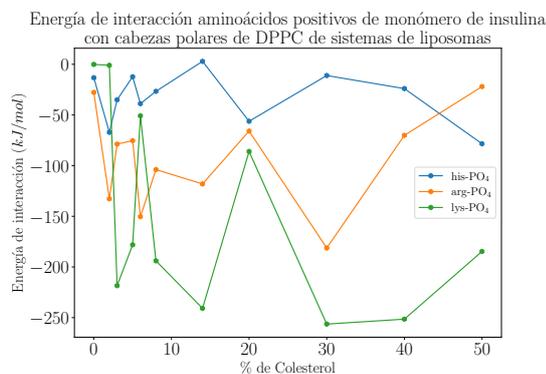


Figura 4.25: Comparativa de energías de interacción total de residuos de aminoácidos cargados positivamente: histidina, arginina y lisina para todos los liposomas estudiados

Al aumentar la concentración de colesterol, se observa que las interacciones más favorecidas son las que involucran a los residuos de lisina con el grupo fosfato ($Lys - PO_4^-$), mostrando menores energías de interacción en las concentraciones de 30 y 40 % de colesterol. Luego, con los residuos de arginina y el grupo fosfato ($Arg - PO_4^-$), se aprecia en la figura 4.25 la menor energía de interacción en la concentración del 30 % de colesterol (-181.3012 kJ/mol). Por último, con los residuos de histidina, se observan interacciones de menor fuerza intermolecular con el grupo fosfato del fosfolípido ($His - PO_4^-$). Esto podría atribuirse al hecho de que la histidina es un aminoácido positivo, pero su interacción se ve limitada debido a que contiene un grupo imidazol en su cadena, el cual es un heterociclo formado por dos aminas.

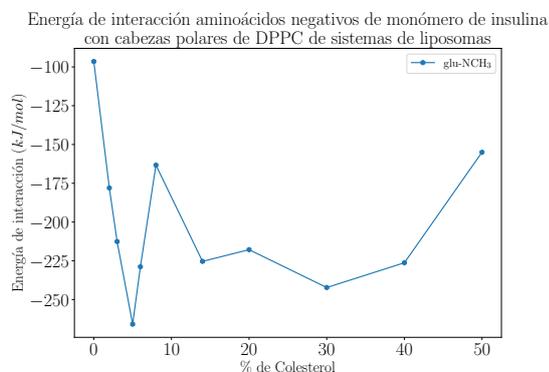


Figura 4.26: Comparativa de energías de interacción total de residuos de aminoácido cargado negativamente: glutamato para todos los liposomas estudiados

De los aminoácidos presentes en la molécula de insulina, únicamente el glutamato se encuentra con carga negativa. Esto se debe a que el glutamato, en realidad, corresponde al anión del ácido glutámico. En el radical asociado a su carbono alfa, el glutamato contiene un grupo ácido carboxílico, lo cual le confiere una carga negativa. Esta característica se puede apreciar en la figura 4.26. En esta figura, se muestra que la interacción más favorable del residuo de glutamato con el grupo de colina se observa a una concentración de 5 % de colesterol, alcanzando un valor de -265.8636 kJ/mol.

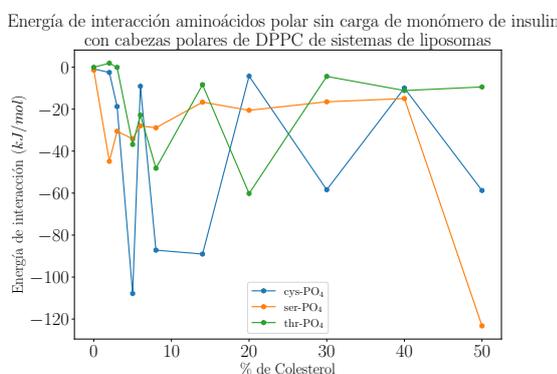


Figura 4.27: Comparativa de energías de interacción total de residuos de aminoácidos polares sin carga: cisteína, serina y treonina con el fosfato del fosfolípido para todos los liposomas estudiados

La energía de interacción total de los residuos de serina con los grupos fosfato ($Ser - PO_4^-$) como se observa en la figura 4.27 se mantienen constantes a menores concentraciones de colesterol, observando interacciones débiles, pero aumenta dramáticamente la energía de interacción en la concentración de 50 %colesterol-DPPC, la cual

llega hasta -120 kJ/mol. Las interacciones entre los residuos de treonina con el grupo fosfato ($Thr - PO_4^-$) en la figura 4.27 y los residuos de histidina con el grupo fosfato ($His - PO_4^-$) en la figura 4.25 oscilan en un rango de energías de 0 hasta -50 kJ/mol, lo cual puede indicar una interacción espontánea pero débil.

La interacción más destacada de los residuos de cisteína con el grupo fosfato del fosfolípido se observa a una concentración del 8% de CHO-DPPC, llegando incluso a -110 kJ/mol, lo que indica una alta afinidad. Es importante recordar que este valor representa el promedio de interacción de los 6 residuos de cisteína presentes en el monómero de insulina.

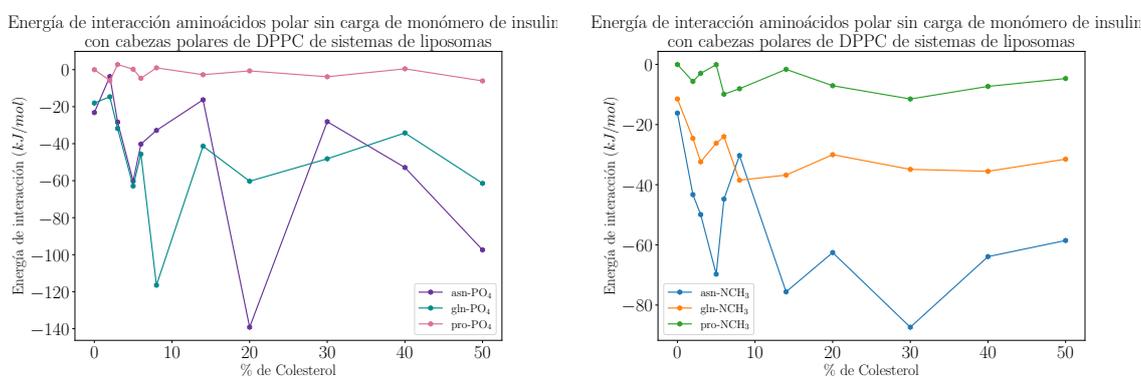


Figura 4.28: Comparativa de energías de interacción total de residuos de aminoácidos polares sin carga: asparagina, glutamina, prolina con el grupo colina y el fosfato del fosfolípido para todos los liposomas estudiados

Al aumentar la concentración de colesterol, se observa una disminución en la energía de interacción de los residuos de asparagina con el grupo fosfato ($Asn - PO_4^-$) y su interacción con el grupo colina ($Asn - N^+(CH_3)_3$), como se muestra en la figura 4.28. Por otro lado, la energía de interacción de los residuos de glutamina con los grupos fosfato ($Gln - PO_4^-$) se ve menos favorecida a mayores concentraciones de colesterol, alcanzando su mínimo en una concentración del 8% de CHO-DPPC con un valor de -120 kJ/mol. A medida que aumenta la concentración de colesterol, esta energía se mantiene en un rango de valores entre -60 y -40 kJ/mol. Por último, las interacciones que parecen no modificarse con respecto al aumento en la concentración de colesterol son aquellas con los residuos de prolina y los grupos fosfato ($Pro - PO_4^-$) y con el grupo colina ($Pro - N^+(CH_3)_3$), lo cual podría atribuirse al grupo radical impedido que poseen, con la amina dentro del ciclo.

En el capítulo 2, ver 2.15 se mencionó que en el monómero de insulina existen dos vías de transducción activadas por la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). Es interesante analizar el tipo de interacción que tienen los residuos de tirosina, aunque estos no son ligandos específicos para el receptor ya que es el receptor quien se autofosforila. En este análisis, se examinaron las interacciones de los residuos de tirosina

4.3 Parámetros estructurales del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas

con los grupos colina y el grupo fosfato, $Tyr-N^+(CH_3)_3$ y $Tyr-PO_4^-$ respectivamente.

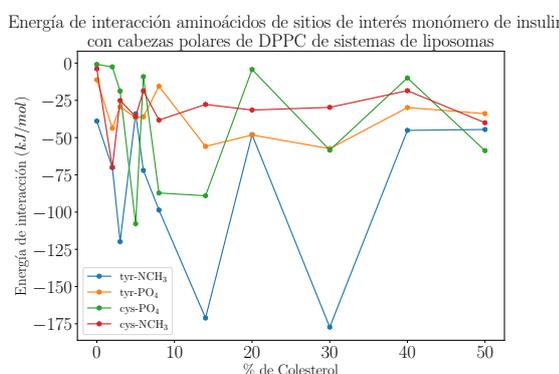


Figura 4.29: Comparativa de energías de interacción total de residuos de aminoácidos de sitio de interés propuestos: tirosina y fenilalanina para todos los liposomas estudiados

Con la figura 4.29 se observan interacciones débiles entre los residuos de tirosina con el grupo fosfato ($Tyr-PO_4^-$) e interacciones espontáneas con mayor afinidad de los residuos de cisteína con el grupo fosfato ($Cys-PO_4^-$) con el cual se observa su menor energía de interacción con la concentración de 5% de colesterol con un valor de -107.8407 kJ/mol, además de que con el grupo colina $Cys-N^+(CH_3)_3$ tiene energías de interacción débiles (oscilan los -15 a -60 kJ/mol). Los residuos de tirosina con el grupo colina presentan mayores energías de interacción en las concentraciones de 14 y 30% CHO-DPPC con valores de -171.1096 y -177.25 kJ/mol respectivamente.

4.3. Parámetros estructurales del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas

4.3.1. Desviación cuadrática media (RMSD) del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas

Los gráficos de la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de ciertos átomos en una molécula con respecto a una estructura de referencia ajustada por mínimos cuadrados, en este caso el esqueleto (N, C_α, C) del monómero de insulina, son fundamentales para evaluar la estabilidad de la proteína en el sistema. Inicialmente, la estructura de referencia se establece como $t_2=0$, y posteriormente se procede a calcular el RMSD para monitorear cualquier variación.

El cálculo del RMSD con Gromacs [Abraham et al., 2015] se realiza mediante la si-

guiente expresión:

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (4.17)$$

Donde $M = \sum_{i=1}^N m_i$ y $r_i(t)$ es la posición del átomo i en el tiempo t . En el caso de los siguientes gráficos, la estructura de referencia fué la configuración final de la minimización con el ensamble microcanónico (NVE) que se grafica de color naranja y tiene la etiqueta de *backbone_{crystal}*, dado que se utilizó la estructura cristalográfica reportada por [Turkenburg et al., 2018] en todas las simulaciones.

De acuerdo con Kufareva [Kufareva and Abagyan, 2011] las distribuciones RMSD no reflejan la verdadera precisión del modelo porque son en gran medida afectadas por regiones flexibles y mal definidas, como C-terminales, bucles y α hélices, cuya principal desventaja es el hecho de que está dominada por las amplitudes de errores. Aún así, este método para el análisis de estabilidad de proteínas mediante estudios de dinámica molecular sigue siendo usado, retomando un artículo de la introducción [Nejabat et al., 2022], también analizaron la estabilidad de su insulina mediante estudios de RMSD a diferentes pH con una sola nanopartícula de quitosano. A continuación, se muestran las comparativas de los gráficos de RMSD de las bicapas y liposomas de concentraciones de 6, 14 y 50 % colesterol (concentraciones para abarcar concentración baja, media y alta de colesterol con DPPC).

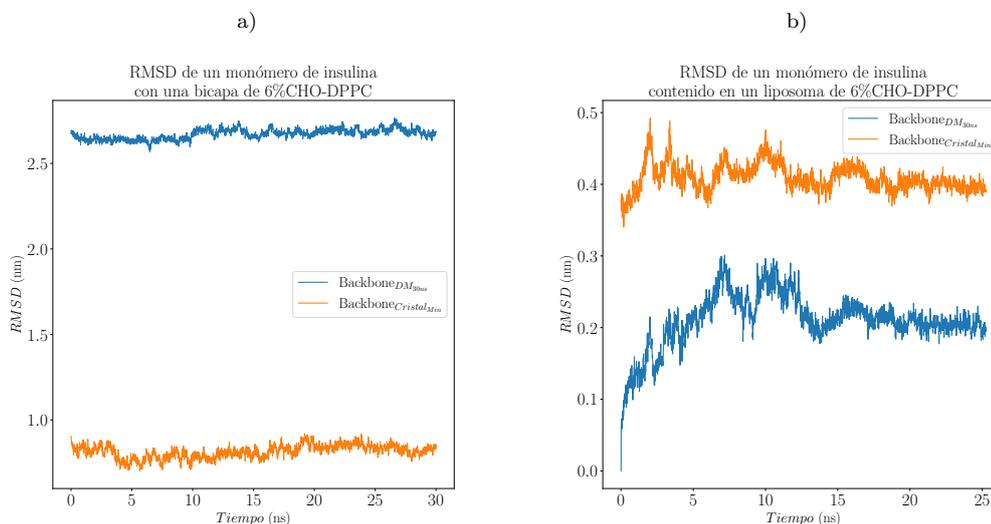


Figura 4.30: Gráficos de RMSD del monómero de insulina respecto a su estructura inicial (cristalográfica) con la estructura final después de la simulación de 30 nanosegundos, a) bicapa y b) liposoma a 6 % CHO-DPPC

4.3 Parámetros estructurales del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas

En la figura 4.30 muestra el gráfico de RMSD para un monómero de insulina en una bicapa y un liposoma de concentraciones de 6 %CHO-DPPC. Se muestra una diferencia de 1.5 nanómetros en el caso de la bicapa con la estructura de referencia. Por otro lado, el RMSD obtenido del monómero de insulina en un liposoma se observa una diferencia de 0.25 nanómetros de la estructura de referencia con respecto a la configuración final de la simulación de 30 nanosegundos, indicando mayor estabilidad de la proteína al estar dentro de una vesícula de fosfolípidos con colesterol, de acuerdo con el artículo [Aier et al., 2016], cuanto menores sean las desviaciones en relación con la conformación de una proteína en el transcurso de una simulación, será más estable la estructura de misma.

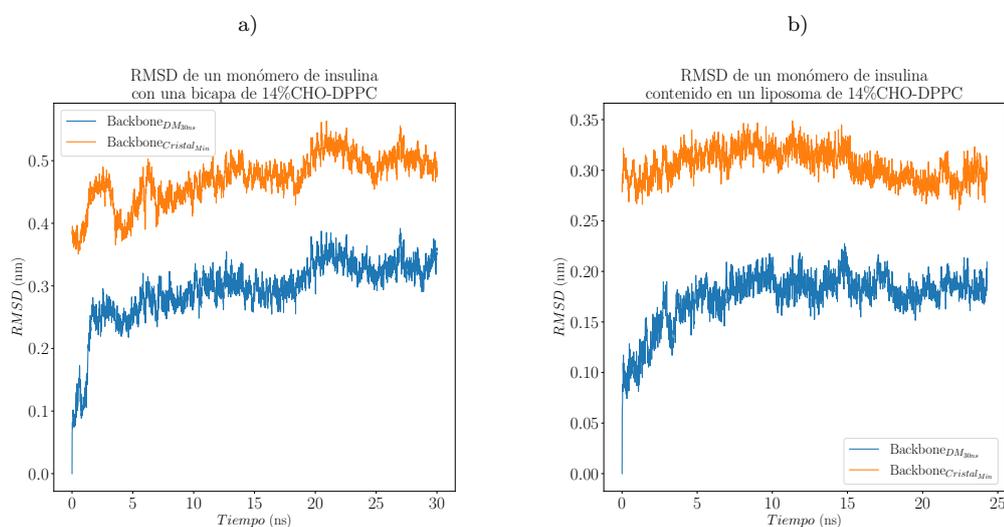


Figura 4.31: Gráficos de RMSD del monómero de insulina respecto a su estructura inicial (cristalográfica) con la estructura final después de la simulación de 30 nanosegundos, a) bicapa y b) liposoma a 14 % CHO-DPPC

De forma análoga se observa en la figura 4.31 los RMSD del backbone del monómero de insulina en una bicapa y un liposoma a concentraciones a 14 %CHO-DPPC. Ambas gráficas presentan una diferencia de 0.2 nanómetros con respecto a la estructura de referencia.

4.3 Parámetros estructurales del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas

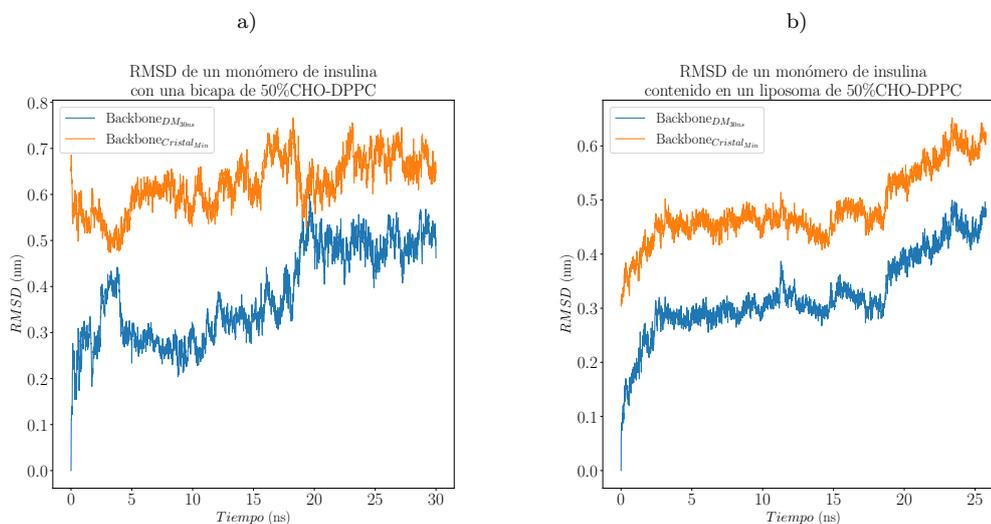


Figura 4.32: Gráficos de RMSD del monómero de insulina respecto a su estructura inicial (cristalográfica) con la estructura final después de la simulación de 30 nanosegundos, a) bicapa y b) liposoma a 50 % CHO-DPPC

Finalmente, en la figura 4.32 tenemos los gráficos del RMSD del esqueleto del monómero de insulina en la bicapa y liposoma a 50 % CHO-DPPC. Del sistema de la bicapa con el monómero se observa una diferencia de 0.3 nanómetros en los primeros 15 nanosegundos de la estructura minimizada con respecto a la estructura obtenida de la simulación de 30 nanosegundos, pero a partir de los 20 nanosegundos se observa una diferencia de 0.15 nanómetros. Para el liposoma en estas mismas concentraciones de colesterol y DPPC, hay una diferencia de igualmente 0.15 nanómetros, lo cual indica mayor estabilidad del monómero de insulina al estar contenido en un liposoma, o estar en un sistema con una bicapa de a concentración de 50 % CHO-DPPC.

4.3.2. Fluctuación cuadrática media (RMSF)

La Fluctuación Cuadrática Media (RMSF, por sus siglas en inglés) es una herramienta fundamental para estudiar la variabilidad de los residuos en una proteína a lo largo de una trayectoria de simulación de dinámica molecular (MD). Proporciona una descripción de cómo fluctúa cada residuo o dominio en la estructura proteica. La representación gráfica del RMSF, expresado en nanómetros (nm), en función del número de residuos, permite visualizar esta fluctuación. El cálculo del RMSF de una proteína implica medir la desviación entre la posición de la partícula i y su posición de referencia en un instante dado, donde T representa el tiempo y r_i^{ref} denota la posición de referencia de la partícula i , como se muestra en la ecuación 4.18, que de igual manera

4.3 Parámetros estructurales del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas

fue analizado el esqueleto (N, C_α, C) del monómero de insulina como fue realizado con los calculos del RMSD.

$$RMSF_i = \left[\frac{1}{T} |r_i(t_j - r_i^{ref})|^2 \right]^{1/2} \quad (4.18)$$

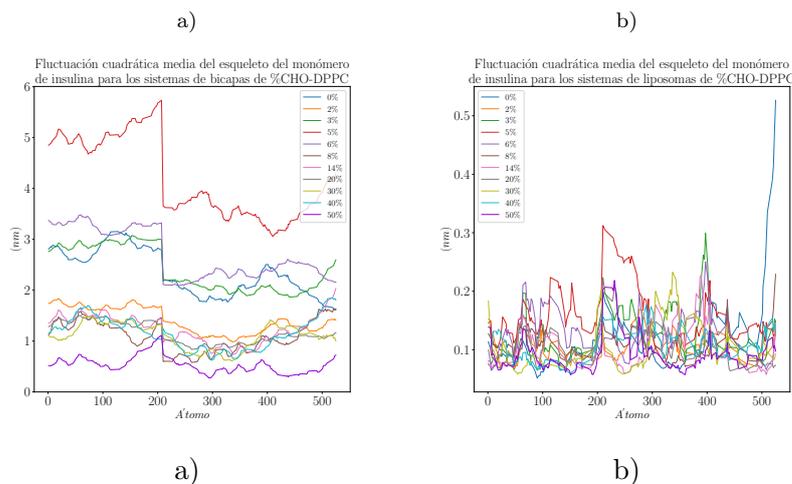


Figura 4.33: Gráficos de RMSF de los atomos C_α calculados de los ultimos 10 nanosegundos. Las líneas representan al monómero de insulina en su sistema a) bicapa y b) liposoma a 6 % CHO-DPPC

En la figura 4.33a), se presenta un gráfico comparativo del RMSF para sistemas de bicapas con diferentes concentraciones de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC). Se observa una desviación significativa en el monómero de insulina en los sistemas con 5, 6, 3 y 0 % de CHO-DPPC, lo que sugiere la presencia de curvas largas (bends), hélices complejas (coils) y distancias alargadas entre carbonos α , lo que se conoce como 'breaks' [Singh et al., 2020, Gorelov et al., 2023]. Se ha propuesto que estas características estructurales podrían estar relacionadas con una mayor flexibilidad y desestabilización del monómero de insulina en estos sistemas. Sin embargo, se requieren análisis adicionales de estructura secundaria para confirmar esta hipótesis.

Por otro lado, los sistemas con 2, 8, 14, 20, 30 y 40 % de CHO-DPPC mantuvieron fluctuaciones similares pero con patrones distintos. El sistema con menos fluctuaciones correspondió al de la bicapa con 50 % de CHO-DPPC. Todos los sistemas mostraron un pico en el átomo 200, que parece estar relacionado con el aminoácido asparagina (ASN); estos resultados se obtuvieron con una simulación de 30 ns utilizando el software GROMACS y el método RMSF por átomo.

En la figura 4.33, se presentan también las fluctuaciones del esqueleto del monómero de insulina en diferentes sistemas de liposomas con distintos porcentajes de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC). Todos los sistemas, excepto el que contiene 5 % de CHO-

DPPC, mantuvieron fluctuaciones en un rango de 0.5 a 0.2 nm. El sistema con 5% de CHO-DPPC presentó una desviación significativa, con valores de fluctuación que alcanzaron los 0.3 nm.

Por otro lado, se observa que los sistemas de liposomas con 40 y 50% de CHO-DPPC presentan fluctuaciones sustancialmente más bajas que los demás sistemas. Estos resultados sugieren que estas concentraciones de CHO-DPPC podrían ayudar a reducir las variaciones en la estructura del monómero de insulina. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para comprender en detalle los mecanismos moleculares subyacentes a estas observaciones.

4.3.3. Coeficiente de difusión

Se puede determinar el desplazamiento cuadrático medio (MSD) de los átomos utilizando un conjunto de posiciones iniciales, lo que ofrece una forma directa de calcular el coeficiente de difusión D (o de autodifusión [Bizzarri and Cannistraro, 2002]) utilizando la relación de Einstein, expresada en la ecuación 4.19.

$$D = \frac{1}{2d} \lim_{\Delta t \rightarrow \infty} \frac{\langle |\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0)|^2 \rangle}{\Delta t} = \frac{1}{2d} \lim_{\Delta t \rightarrow \infty} \frac{\langle \Delta r^2 \rangle}{\Delta t} \quad (4.19)$$

En donde $\mathbf{r}_i(t)$ y $\mathbf{r}_i(0)$ son los vectores de posición de la molécula i en el tiempo t , y en el tiempo $t = 0$, respectivamente [Bizzarri and Cannistraro, 2002]. Gromacs [Abraham et al., 2015], calcula la constante de difusión mediante mínimos cuadrados ajustando una línea recta ($D * t + c$) a través del $MSD(t)$. Los valores obtenidos de la constante de difusión para el monómero de insulina de los diferentes sistemas se presenta en la tabla 4.5.

4.3 Parámetros estructurales del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas

Coeficiente de difusión (D) del monómero de insulina (cm^2/s)		
%CHO-DPPC	D (cm^2/s) en bicapa	D (cm^2/s) en liposoma
0	0.1625×10^{-5}	0.0919×10^{-5}
2	0.2351×10^{-5}	0.005506×10^{-5}
3	0.1150×10^{-5}	0.00658×10^{-5}
5	0.2539×10^{-5}	0.0245×10^{-5}
6	0.1334×10^{-5}	0.0111×10^{-5}
8	0.2048×10^{-5}	0.0659×10^{-5}
14	0.0526×10^{-5}	0.0368×10^{-5}
20	0.1586×10^{-5}	0.0097×10^{-5}
30	0.4887×10^{-5}	0.1387×10^{-5}
40	0.2140×10^{-5}	0.096×10^{-5}
50	0.1018×10^{-5}	0.0934×10^{-5}

Tabla 4.5: Coeficiente de difusión del monómero de insulina para los sistemas de bicapa y liposoma de acuerdo a su concentración de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC)

Al comparar los valores de los coeficientes de difusión del monómero de insulina obtenidos en la simulación con los valores reportados experimentalmente en la referencia [Patil et al., 2017], se observa que los valores simulados son comparables a los experimentales. Esto indica que la velocidad de difusión del monómero de insulina en el modelo de agua SPC es similar a la observada experimentalmente, lo que valida los resultados de la simulación y respalda la comprensión del proceso de difusión del monómero de insulina.

4.3.4. Radio de giro

El radio de giro (R_g) es una propiedad física importante de las proteínas que proporciona información sobre su grado de compactación en su estructura plegada [Singh et al., 2020]. Un R_g idealmente bajo sugiere un estado de plegamiento globular para proteínas de tamaño similar, lo que significa que la proteína se encuentra en una conformación compacta y bien definida. En contraste, un valor de R_g relativamente alto indica una conformación más expandida con mayor número de bucles y vueltas, lo que sugiere que la proteína puede estar menos plegada o tener una estructura más abierta. El cálculo del R_g se realiza a partir de las coordenadas atómicas de la proteína, como se muestra en la ecuación 4.8.

En este estudio, se calcularon los valores promedio del R_g para el monómero de insulina en diferentes sistemas de bicapas con distintos porcentajes de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC) mediante simulaciones de dinámica molecular (MD) de 30 nanosegundos. Los valores promedio del R_g obtenidos de los 30 nanosegundos de simulación se presentan en la tabla 4.6, y unos dos gráficos representativos en la figura 4.34.

4.3 Parámetros estructurales del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas

Radio de giro R_g del monómero de insulina (nm)		
%CHO-DPPC	R_g (nm) en bica- pa	R_g (nm) en lipo- soma
0	2.11016	1.0499
2	1.0580	1.1415
3	2.4710	1.1572
5	2.305	1.0733
6	1.222	1.123
8	1.114	1.118
14	1.084	1.1662
20	1.055	1.0332
30	1.053	1.0683
40	1.0683	1.1888
50	1.095	1.2866

Tabla 4.6: Radio de giro del monómero de insulina para los sistemas de bicapa y liposoma de acuerdo a su concentración de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC) calculadas de acuerdo a la ecuación 4.8

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.6 y en dos gráficos representativos en la figura 4.34. En la tabla, se observan valores de R_g que van desde 1.5 nm hasta 1.8 nm, lo que sugiere que el monómero de insulina adopta una conformación globular en todos los sistemas estudiados. Sin embargo, se observa una ligera tendencia a un aumento del R_g con el aumento de la concentración de CHO-DPPC en los sistemas de liposomas, lo que podría indicar una mayor expansión de la estructura de la proteína en presencia de colesterol.

Los gráficos de la figura 4.34 muestran la evolución del R_g a lo largo de la simulación para dos sistemas representativos de liposomas: uno con 2% de CHO-DPPC y otro con 40% de CHO-DPPC. Se observa que el R_g alcanza un valor estable después de un tiempo de simulación relativamente corto, lo que indica que las proteínas alcanzan rápidamente un estado de plegamiento estable en estas condiciones.

4.3 Parámetros estructurales del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas

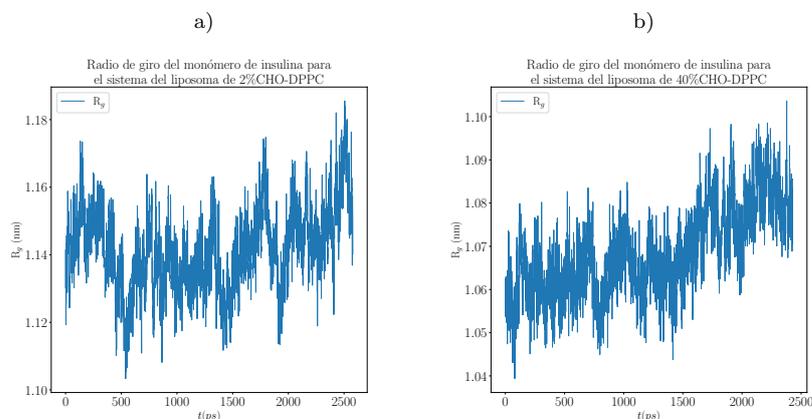


Figura 4.34: Gráficos de radio de giro del monómero de insulina en un sistema de liposoma a diferentes concentraciones de %CHO-DPPC a) 2 %CHO-DPPC y b) 40 % CHO-DPPC

Las proteínas globulares de clase C, caracterizadas por una alta proporción de hélices α y cadenas β plegadas (α - β), suelen presentar valores de R_g relativamente bajos. De acuerdo con el estudio de Lobanov et al. [Lobanov et al., 2008], las proteínas globulares de clase C exhiben un R_g promedio de 1.56 nm.

En este estudio, se observó que el R_g del monómero de insulina en bicapas con diferentes concentraciones de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC) oscila entre 1.05 nm y 2 nm, lo que lo clasifica como una proteína globular de clase C. Sin embargo, se observó una tendencia a la disminución del R_g a medida que aumenta la concentración de CHO-DPPC en los sistemas de bicapas, lo que sugiere un mayor empaquetamiento de la proteína en presencia de colesterol. Este efecto podría estar relacionado con lo observado anteriormente que el colesterol ejerce que los sistemas tengan un menor volumen, esto debido a la interacción con las colas hidrofóbicas del fosfolípido, lo que favorece una conformación más compacta.

Por otro lado, en el caso de los liposomas, el R_g del monómero de insulina se encuentra entre 1.03 y 1.18 nm, valores consistentes con los reportados para otras proteínas globulares de clase C. Esto sugiere que la presencia de colesterol en la membrana no afecta significativamente la compactación general del monómero de insulina en este tipo de sistema.

En conjunto, los resultados de este estudio sugieren que el R_g del monómero de insulina es sensible a la composición de la membrana, presentando una compactación más marcada en bicapas con mayor concentración de CHO-DPPC.

4.3.5. Puentes de Hidrógeno

En 1936, cuando apenas se empezaba a comprender la estructura de las proteínas globulares, Pauling y Mirsky concluyeron que los enlaces de hidrógeno eran esenciales para mantener la forma única y definida de las cadenas de aminoácidos. Sugirieron que cada enlace de hidrógeno contribuiría significativamente a la estabilidad de esta estructura, con aproximadamente 5 kcal/mol de energía [Pace et al., 2014].

Quince años después, el grupo de Pauling utilizó sus ideas sobre los enlaces de hidrógeno, junto con restricciones derivadas de estudios de compuestos modelo, para descubrir dos estructuras proteicas clave: la hélice α y la hoja β plegada. Al describir la hélice α , observaron que los enlaces de hidrógeno entre el nitrógeno del grupo amino y el oxígeno del grupo carbonilo proporcionaban aproximadamente 8 kcal/mol de energía, asegurando así la estabilidad de esta estructura. Posteriormente, en el artículo que describía la hoja β plegada, llegaron a entender mejor que, en un ambiente acuoso, la contribución de los enlaces de hidrógeno a la estabilidad de las proteínas era menor de lo que se había pensado inicialmente. Aproximadamente 2 kcal/mol era la diferencia en energía entre los enlaces de hidrógeno formados entre los grupos amino y carbonilo de la proteína y aquellos formados con moléculas de agua [Pace et al., 2014].

A pesar de estos avances, todavía persisten incertidumbres sobre el papel exacto que juegan los enlaces de hidrógeno en la estabilidad de las proteínas incluso sesenta años después de estos descubrimientos [Pace et al., 2014]. Según las referencias [Kabsch and Sander, 1983, Gorelov et al., 2023], se acepta generalmente que un enlace de hidrógeno existe entre dos residuos de aminoácidos si la energía de este enlace no supera los -0.5 kcal/mol , y que un enlace de hidrógeno óptimo tiene una energía de enlace de -3 kcal/mol . Un donante de enlace es un grupo que posee una carga parcial negativa (δ^-) y un aceptor de enlace es un grupo que tiene una deficiencia de electrones y una carga parcial positiva (δ^+), lo cual se ejemplifica en la figura 4.35 para dos aminoácidos. Los enlaces de hidrógeno entre todos los posibles donadores (D) y aceptores (A) pueden ser calculados para determinar su existencia. GROMACS [Abraham et al., 2015] emplea un criterio geométrico, el cual se muestra en la ecuación 4.20.

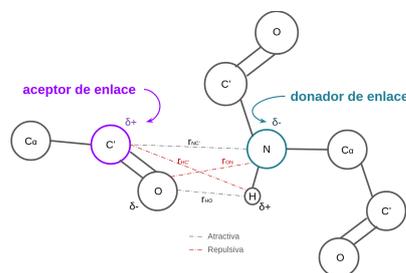


Figura 4.35: Representación de la formación de un puente de hidrógeno

4.3 Parámetros estructurales del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas

$$\begin{aligned} r &\leq r_{HB} = 0.35 \text{ nm} \\ \alpha &\leq \alpha_{HB} = 30^\circ \end{aligned} \quad (4.20)$$

El valor de $r_{HB} = 0.35 \text{ nm}$ corresponde al primer mínimo de la función de distribución radial (RDF) del modelo del agua SPC, mientras que el ángulo α refleja la distribución del ángulo donante-aceptor de hidrógeno en todos los enlaces de hidrógeno.

En la figura 4.36 se presentan dos gráficos que muestran los puentes de hidrógeno intramoleculares del monómero de insulina en los sistemas de bicapa y liposoma con un 40 % de CHO-DPPC a lo largo del tiempo. Se observa un promedio de 26 puentes de hidrógeno intramoleculares en la bicapa de 40 % CHO-DPPC y un promedio de 24 en el liposoma de la misma concentración, según se muestra en la tabla 4.7. Los valores más altos se encuentran en la bicapa de 50 % y el liposoma de 0 % CHO-DPPC, mientras que los valores más bajos se registran en los liposomas con concentraciones de 14 % y 30 % de CHO-DPPC. Estas discrepancias sugieren posibles interferencias estructurales, ya que la cantidad de enlaces intramoleculares es menor de lo esperado (se esperaba un máximo de 5005), lo que podría justificar las diferencias observadas en los RMSD y RMSF.

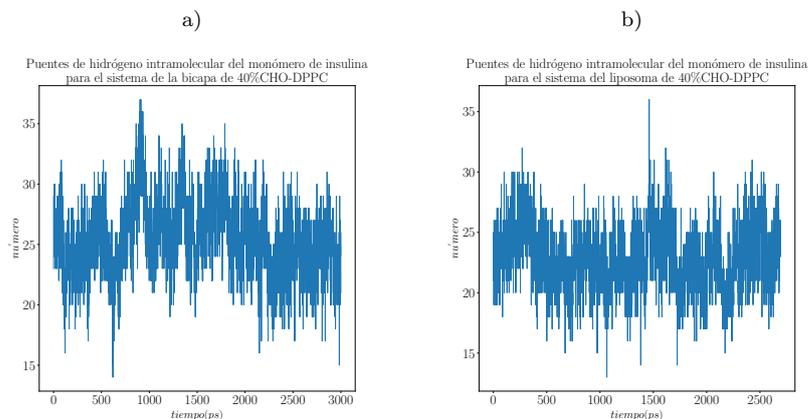


Figura 4.36: Gráficos de puentes de hidrógeno intramolecular del monómero de insulina en su sistema a) bicapa y b) liposoma a 40 % CHO-DPPC

En la figura 4.36 se presentan dos gráficos que muestran la evolución del número de puentes de hidrógeno intramoleculares del monómero de insulina en los sistemas de bicapa y liposoma con un 40 % de CHO-DPPC a lo largo de la simulación de 30 nanosegundos. Los datos de la tabla 4.7 indican un promedio de 26 puentes de hidrógeno intramoleculares en la bicapa de 40 % CHO-DPPC y un promedio de 24 en el liposoma de la misma concentración.

4.3 Parámetros estructurales del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas

Puentes de Hidrógeno intramoleculares		
%CHO-DPPC	Bicapa	Liposoma
0	24	34
2	28	28
3	27	22
5	31	20
6	30	26
8	30	26
14	29	17
20	26	23
30	27	29
40	26	24
50	31	29

Tabla 4.7: Puentes de hidrógeno intramoleculares del monómero de insulina para los sistemas de bicapa y liposoma de acuerdo a su concentración de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC) calculadas de acuerdo al criterio del software Gromacs y la ecuación 4.20

Es importante destacar que el número máximo de puentes de hidrógeno intramoleculares que se podrían formar en la estructura del monómero de insulina es de 5005, correspondientes a un enlace entre cada par de residuos de aminoácidos con capacidad para formar puentes de hidrógeno (la cual posee 71 donadores y 141 aceptores). Sin embargo, los valores promedio observados en este estudio son significativamente menores, lo que sugiere que la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares está influenciada por factores estructurales.

En este sentido, se observa que los valores más altos de puentes de hidrógeno intramoleculares se encuentran en la bicapa de 50 % y el liposoma de 0 % CHO-DPPC, mientras que los valores más bajos se registran en los liposomas con concentraciones de 14 % y 20 % de CHO-DPPC. Estas discrepancias sugieren que la presencia de colesterol en la membrana podría afectar la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares del monómero de insulina.

Los mecanismos moleculares subyacentes a esta observación podrían estar relacionados con la interacción del fosfolípido o del agua con las regiones hidrofílicas del monómero de insulina (dado que el colesterol se encuentra orientado junto a las colas hidrofóbicas del fosfolípido); lo que podría alterar la conformación de la proteína y limitar la disponibilidad de residuos para la formación de puentes de hidrógeno.

Además, es importante considerar que las diferencias en la cantidad de puentes de hidrógeno intramoleculares podrían estar relacionadas con las diferencias observadas en los RMSD y RMSF. Un menor número de puentes de hidrógeno intramoleculares podría indicar una menor estabilidad estructural y una mayor flexibilidad de la pro-

teína, lo que se reflejaría en valores más altos de RMSD y RMSF, además del valor obtenido en los radios de giro calculados.

4.3.6. Contactos

Los enlaces no covalentes son interacciones débiles pero críticas que mantienen unidas a las moléculas y desempeñan un papel fundamental en la determinación de la estabilidad tanto de las proteínas como de sus ligandos. Entre los tipos de enlaces no covalentes más importantes en este contexto se encuentran los enlaces de hidrógeno, las interacciones electrostáticas, las fuerzas de van der Waals y las interacciones hidrofóbicas.

Los enlaces de hidrógeno son particularmente importantes para el plegamiento de las proteínas, ya que proporcionan una fuerza estabilizadora que dirige la formación de la estructura tridimensional correcta. Estos enlaces se forman entre un átomo de hidrógeno unido a un átomo electronegativo (como oxígeno o nitrógeno) y otro átomo electronegativo. La atracción electrostática entre estos átomos crea una red de enlaces de hidrógeno que mantiene unida la estructura proteica.

Contactos del monómero de insulina				
Sistema	Bicapa		Liposoma	
%CHO-DPPC	Proteína-DPPC	Proteína-Agua	Proteína-DPPC	Proteína-Agua
0	36	20715	2239	7039
2	0	18587	5489	7795
3	0	17303	5980	8429
5	3531	9648	5398	7808
6	2952	12833	4887	8768
8	3273	10258	4532	9687
14	2225	13878	5759	9500
20	0	17823	19998	9764
30	0	18126	6325	8161
40	0	17234	4702	10422
50	0	18209	19998	12479

Tabla 4.8: Número de contactos del fosfolípido (DPPC) y las moléculas de agua con el monómero de insulina para los sistemas de bicapa y liposoma, reportados de acuerdo a su concentración de colesterol-fosfolípido (%CHO-DPPC)

La tabla 4.8 muestra el número de contactos entre el monómero de insulina y el DPPC en bicapas con diferentes concentraciones de CHO-DPPC. Se observa que en las concentraciones de 2, 3, y de 20 a 50% CHO-DPPC, el número de contactos proteína-DPPC es relativamente bajo y no presenta un patrón definido, lo que sugiere que la

interacción entre la proteína y el lípido es aleatoria en estas concentraciones.

Esta observación concuerda con los resultados del análisis de deformaciones estructurales (análisis de RMSD, RMSF), que indican que a bajas concentraciones de CHO-DPPC en bicapas, la interacción entre la proteína y el lípido no es favorable desde el punto de vista energético y provoca deformaciones estructurales en el péptido.

Por otro lado, en las concentraciones de 5, 6, 8, y 14% CHO-DPPC, se observa un mayor número de contactos proteína-DPPC, lo que sugiere que la interacción entre la proteína y el lípido es más específica y favorable en estas concentraciones.

Es importante destacar que el número de contactos proteína-DPPC está inversamente relacionado con el número de contactos proteína-agua. En los sistemas donde hay más contactos proteína-DPPC, hay menos contactos proteína-agua, lo que sugiere que la presencia del lípido induce a la proteína a formar menos interacciones con las moléculas de agua circundantes en los sistemas de bicapas. Los resultados de este estudio sugieren una posible relación entre el número de contactos y la fluctuación cuadrática media (RMSF) observada en los sistemas de liposomas. El sistema de 50% CHO-DPPC, que exhibe el mayor número de contactos tanto con el DPPC como con el agua del sistema, podría estar experimentando una mayor estabilidad estructural en comparación con otros sistemas de liposomas. Esto se debe a que un mayor número de contactos podría estabilizar la estructura proteica y reducir su flexibilidad, lo que se reflejaría en un menor valor de RMSF.

Por otro lado, el sistema de liposoma de 40% CHO-DPPC, que presenta un número considerablemente menor de contactos con el DPPC pero aún así una cantidad significativa de contactos con el agua, podría estar experimentando una estabilidad estructural intermedia. Es importante destacar que la hipótesis planteada en este texto requiere de mayor investigación para ser confirmada. Se podrían realizar simulaciones computacionales con diferentes sistemas de membrana y analizar la correlación entre el número de contactos y la RMSF en todos los casos. Además, es importante considerar otros factores que podrían influir en la RMSF, como la composición de la membrana, la presencia de otras biomoléculas y las condiciones de temperatura y presión.

4.3.7. Estructura secundaria

La estructura secundaria es un parámetro esencial que proporciona información sobre la distribución temporal de las características estructurales en una proteína. Ayuda a comprender la estabilidad de cada dominio y es fundamental en estudios relacionados con mutaciones y desarrollo de proteínas. Su análisis puede explicar cómo se desarrolla un dominio específico y cómo se mantiene estable a lo largo de una simulación [Singh et al., 2020].

Como fue visto en el capítulo 2, en el apartado del monómero de insulina, ver 2.14, la estructura secundaria está bien estudiada para ella. Gromacs tiene una función que se llama *DSSP* [Abraham et al., 2015], la cual sirve para determinar la estructura secundaria de una proteína; en su mayoría la estabilidad de las estructuras secundarias depende de puentes de hidrógeno intramoleculares, por lo cual podemos imaginar que la

4.3 Parámetros estructurales del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas

estabilidad de la proteína no fue tanta debido a la cantidad de puentes de hidrógeno reportados en la tabla 4.7, además de correlacionar la estabilidad de la estructura con su número de contactos con el fosfolípido DPPC y las moléculas de agua de acuerdo con la tabla 4.8. Aún así, es necesario conocer la proporción de estructuras secundarias presentes para confirmar la estabilidad de la proteína. A continuación, en la figura 4.37 observamos los resultados del número relativo de estructura secundaria del monómero de insulina en sus sistemas de bicapa y liposoma de 6%CHO-DPPC.

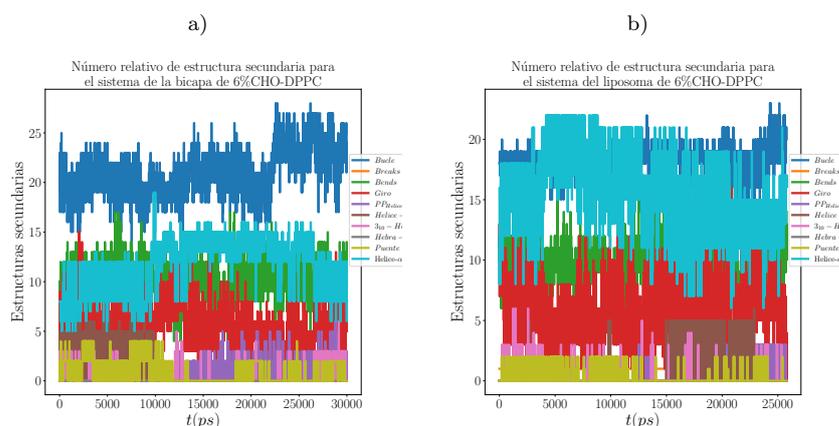


Figura 4.37: Gráficos de DSSP de los átomos C_{α} calculados sobre los 30 nanosegundos de simulación. Las líneas representan al monómero de insulina en su sistema a) bicapa y b) liposoma a 6% CHO-DPPC

En la figura 4.37, se presentan los resultados del análisis DSSP (Dictionary of Protein Secondary Structure) para la estructura secundaria del monómero de insulina en bicapas y liposomas con 6% de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC). El análisis DSSP asigna a cada residuo de aminoácido en la proteína un número relativo que indica su tipo de estructura secundaria predominante.

En la bicapa, se observa que los residuos con números relativos entre 15 y 25 forman un bucle estable durante toda la simulación de 30 nanosegundos. Estos bucles son regiones flexibles de la proteína que no adoptan una estructura secundaria regular. Los residuos con números relativos entre 5 y 12 adoptan inicialmente una estructura de hélice α , pero se deforman hacia giros a lo largo de la simulación. Las hélices α son elementos estructurales rígidos formados por giros de la cadena polipeptídica, mientras que los giros son regiones cortas de hélice que permiten cambios conformacionales en la proteína. Los residuos con números relativos entre 3 y 5 tienden a formar inicialmente hélices π , pero también se deforman hacia giros después de los 10 nanosegundos. Las hélices π son un tipo menos común de hélice que se encuentra en algunas proteínas. Los residuos con números relativos entre 1 y 4 muestran patrones de enlace similares a los de una lámina beta plegada (representada en verde en la figura 4.37). Las láminas β son estructuras secundarias planas formadas por hebras antiparalelas de la cadena

polipeptídica. Sin embargo, en este caso, las láminas β plegadas se deforman hacia hélices de poliprolina y giros que forman hélices 3_{10} . Las hélices de poliprolina son un tipo especial de hélice α que se encuentra en algunas proteínas ricas en prolina, mientras que las hélices 3_{10} son otro tipo de hélice menos común.

Estos resultados sugieren que el monómero de insulina no mantiene una estructura secundaria completamente estable en bicapas con 6% de CHO-DPPC. Las hélices α , las láminas β plegadas y otros elementos estructurales se deforman y cambian a lo largo de la simulación, lo que indica que la proteína es flexible y adaptable en este entorno. En los sistemas de liposomas a la misma concentración de colesterol-fosfolípido, se observa en la figura 4.37 que los residuos con números relativos entre 7 y 18 forman inicialmente hélices α , algunas de las cuales se deforman hacia bucles a lo largo de la simulación. Los bucles son regiones flexibles de la proteína que no adoptan una estructura secundaria regular. Los residuos con números relativos entre 3 y 8 adoptan inicialmente una estructura de giro, que son regiones cortas de hélice que permiten cambios conformacionales en la proteína. Los residuos con números relativos entre 0 y 2 muestran patrones de enlace similares a los de una lámina β plegada. Sin embargo, en este caso, las láminas β plegadas se deforman hacia giros que forman hélices π después de los 15 nanosegundos. Estos resultados sugieren que el monómero de insulina presenta una estructura secundaria más estable en liposomas con 6% de CHO-DPPC en comparación con bicapas con la misma concentración de colesterol. Las hélices α y las láminas β plegadas, que son elementos estructurales rígidos, son más prevalentes en el liposoma, lo que indica una mayor estabilidad estructural de la proteína en este entorno.

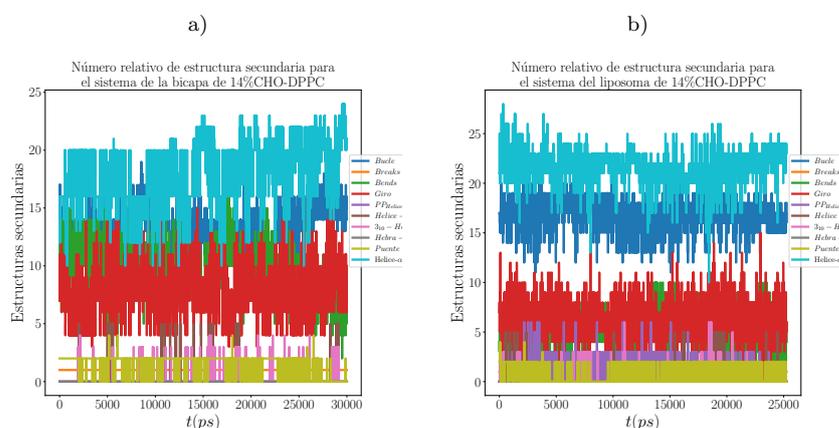


Figura 4.38: Gráficos de DSSP de los átomos C_{α} calculados sobre los 30 nanosegundos de simulación. Las líneas representan al monómero de insulina en su sistema a) bicapa y b) liposoma a 14% CHO-DPPC

En la figura 4.38, se presentan los resultados del análisis DSSP para la estructura secundaria del monómero de insulina en una bicapa con 14% de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC). Los residuos con números relativos entre 10 y 24 forman hélices α re-

lativamente estables durante toda la simulación. La estabilidad de las hélices alfa en este caso sugiere que la proteína es menos flexible en la bicapa de 14 % CHO-DPPC en comparación con bicapas con menor concentración de colesterol. También se observa una menor proporción de bucles y giros en la región de hélices α , lo que confirma la menor flexibilidad de la proteína. Los bucles son regiones flexibles de la proteína que no adoptan una estructura secundaria regular, mientras que los giros son regiones cortas de hélice que permiten cambios conformacionales en la proteína. Los enlaces característicos de las láminas β plegadas en los residuos 1 y 2 mantienen una mayor estabilidad a lo largo del tiempo de simulación, con mínima deformación hacia giros que originan hélices-3₁₀. La estabilidad de las láminas beta plegadas en este caso sugiere que estos elementos estructurales también contribuyen a la rigidez de la proteína en la bicapa de 14 % CHO-DPPC. En la figura 4.38, se presentan los resultados del análisis DSSP para la estructura secundaria del monómero de insulina en liposomas con 14 % de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC). Los residuos con números relativos entre 20 y 25 adoptan una configuración de hélice α . La presencia de hélices α en esta región sugiere que la proteína mantiene cierta rigidez en el interior del liposoma. Los residuos con números relativos entre 14 y 19 forman bucles, lo que sugiere que la proteína también tiene cierta flexibilidad en el interior del liposoma. Se identifican estructuras estables de giros en los residuos de 4 a 12, lo que sugiere cambios en su estructura local en el interior del liposoma. También se observa la formación de un patrón de enlace característico de las láminas β plegadas, lo que proporciona bandas estables a lo largo de la simulación. Las diferencias en la estructura secundaria del monómero de insulina en el liposoma de 14 % CHO-DPPC en comparación con la bicapa de 14 % CHO-DPPC sugieren que el entorno de la proteína puede influir en su estabilidad estructural y flexibilidad. La curvatura del liposoma y las interacciones con el entorno lipídico circundante pueden jugar un papel en estos cambios.

4.3 Parámetros estructurales del monómero de insulina para las bicapas y los liposomas

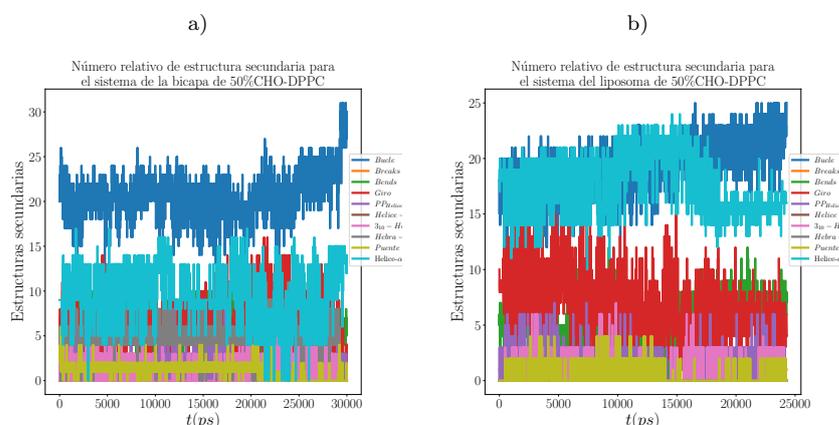


Figura 4.39: Gráficos de DSSP de los átomos C_{α} calculados sobre los 30 nanosegundos de simulación. Las líneas representan al monómero de insulina en su sistema a) bicapa y b) liposoma a 50 % CHO-DPPC

En la figura 4.39, se presentan los resultados del análisis DSSP para la estructura secundaria del monómero de insulina en bicapas y liposomas con 50 % de colesterol-fosfolípido (CHO-DPPC). Los residuos con números relativos entre 5 y 15 forman hélices α , lo que sugiere que la proteína mantiene cierta rigidez en esos residuos. Entre los residuos 15 y 25 se observan bucles, lo que sugiere que la proteína también tiene cierta flexibilidad en la bicapa de 50 % CHO-DPPC. De igual forma, se identifican hebras β estables en gris durante toda la simulación, originadas a partir del residuo 5. Los patrones de enlace característicos de las láminas β en los dos primeros residuos, lo que indica la presencia de puentes beta. El residuo 3 muestra una estructura de hélice 3_{10} , mientras que el residuo 4 adopta una conformación de π -hélice. Por otro lado, en el contexto de estar contenido en un liposoma, se observan hélices α entre los residuos 14 y 22, que se transforman gradualmente en bucles a partir de los 10 nanosegundos. Los residuos de 5 a 11 exhiben giros estables durante la simulación, y se mantienen los patrones de enlace característicos, llamados puentes β desde los primeros dos residuos. Además, entre los residuos 3 y 4 se identifican estructuras de hélice 3_{10} y poliprolina.

Conclusiones

A lo largo de esta investigación, hemos logrado obtener un entendimiento más profundo de los procesos de autoensamblaje de los lípidos y la interacción con el colesterol, lo cual es fundamental para el diseño efectivo de liposomas. Las simulaciones computacionales detalladas revelaron cómo la concentración de colesterol afecta la estructura y estabilidad de los liposomas, así como la encapsulación de insulina. Observamos una mayor estabilidad de la insulina dentro de los liposomas en comparación con las bicapas de fosfolípidos y colesterol. Además, identificamos interacciones específicas entre los residuos de aminoácidos de la insulina y los grupos polares del fosfolípido, destacando la influencia del colesterol en estas interacciones. Estableciendo a los liposomas con un 40 % y 50 % de colesterol mostraron perfiles de densidad y orden molecular óptimos, junto con una menor variabilidad en la configuración de la insulina, lo que sugiere su prometedor potencial como sistemas de administración de fármacos.

Bibliografía

- [Abraham et al., 2015] Abraham, M., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J., Hess, B., and Lindahl, E. (2015). Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1:19–25. 23, 30, 35, 52, 54, 71, 75, 79, 83
- [Aier et al., 2016] Aier, I., Varadwaj, P., and Raj, U. (2016). Structural insights into conformational stability of both wild-type and mutant ezh2 receptor. *Scientific reports*, 6(1):34984. 72
- [Akutsu, 2020] Akutsu, H. (2020). Structure and dynamics of phospholipids in membranes elucidated by combined use of nmr and vibrational spectroscopies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1862(9):183352. 50
- [Allen and Tildesley, 2017] Allen, M. and Tildesley, D. (2017). *Computer simulation of liquids*. Oxford University Press. 19, 21, 22, 27, 28
- [Almgren et al., 2000] Almgren, M., Edwards, K., and Karlsson, G. (2000). Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 174(1-2):3–21. 1, 18
- [Anandrao and Kandekar, 2022] Anandrao, T. and Kandekar, V. (2022). A comprehensive review on liposomes: A novel drug delivery system. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 11(7):933–946. 1, 16
- [Bangham et al., 1965] Bangham, A., Standish, M., and Watkins, J. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1):238–IN27. 1
- [Benson, 2005] Benson, H. (2005). Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Current drug delivery*, 2(1):23–33. 16
- [Berger et al., 1997] Berger, O., Edholm, O., and Jähnig, F. (1997). Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophysical journal*, 72(5):2002–2013. 2, 36, 38, 50

-
- [Bizerra and Silva, 2016] Bizerra, A. and Silva, V. (2016). Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. *Revista Saúde e Meio Ambiente*, 3(2):1–12. 16
- [Bizzarri and Cannistraro, 2002] Bizzarri, A. R. and Cannistraro, S. (2002). Molecular dynamics of water at the protein- solvent interface. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(26):6617–6633. 75
- [Bozzuto and Molinari, 2015] Bozzuto, G. and Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International journal of nanomedicine*, 10:975. 1, 16
- [Brown et al., 2014] Brown, T., LeMay, H., Bursten, B., and C., M. (2014). *Chemistry the central science 13th Edition*. Prentice Hall. 5, 6, 7, 8, 9
- [Caster et al., 2017] Caster, J., Patel, A., Zhang, T., and Wang, A. (2017). Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 9(1):e1416. 2
- [Cedillo-Cruz et al., 2021] Cedillo-Cruz, E., Garcia-Ramos, D., and Dominguez, H. (2021). Lead and mercury removal from aqueous solution using sodium dodecyl sulfate micelles: A molecular dynamics study. *Chemical Physics Letters*, 767:138340. 55
- [Chang, 1992] Chang, R. (1992). *Physical chemistry for the biosciences*. University Science Books. 5, 6, 7, 8, 9
- [Chapman et al., 1969] Chapman, D., Owens, N., Phillips, M., and Walker, D. (1969). Mixed monolayers of phospholipids and cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 183(3):458–465. 51
- [Chiari-Andréo et al., 2019] Chiari-Andréo, B., de Almeida-Cincotto, M., Oshiro, J., Taniguchi, C., Chiavacci, L., and Isaac, V. (2019). *Nanoparticles for cosmetic use and its application*. William Andrew Publishing. 16
- [Cox and Lehninger, 2009] Cox, N. and Lehninger, D. (2009). *Lehninger princípios de bioquímica. En Lehninger princípios de bioquímica*. alpha-omega. 11, 12, 13
- [Cruz-Valcárcel, 2008] Cruz-Valcárcel, C. (2008). *Simulación mediante métodos híbridos clásico-cuánticos de la relajación vibracional de moléculas en disolución*. Universidad de Murcia. 30
- [Daudt et al., 2013] Daudt, R., Emanuelli, J., Kulkamp-Guerreiro, I., Pohlmann, A., and Guterres, S. (2013). A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. *Ciência e Cultura*, 65(3):28–31. 16
- [deLeeuw et al., 1980] deLeeuw, S., Perram, J., and Smith, E. (1980). Simulation of electrostatic systems in periodic boundary conditions. i. lattice sums and dielectric constants. *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences*, 373(1752):27–56. 27

-
- [Dua et al., 2012] Dua, J., Rana, A., and Bhandari, A. (2012). Liposome: methods of preparation and applications. *J Pharm Stud Res*, 3(2):14–20. 16
- [Egberts et al., 1994] Egberts, E., Marrink, S., and Berendsen, H. (1994). Molecular dynamics simulation of a phospholipid membrane. *European biophysics journal*, 22(1):423–436. 42
- [Eisermann et al., 2023] Eisermann, J., Wright, J., Wilton-Ely, J., Hirst, J., and Roessler, M. (2023). Using light scattering to assess how phospholipid–protein interactions affect complex i functionality in liposomes. *RSC Chemical Biology*. 18
- [Esposito et al., 2016] Esposito, E., Mariani, P., Drechsler, M., and Cortesi, R. (2016). Structural studies of lipid-based nanosystems for drug delivery: X-ray diffraction (xrd) and cryogenic transmission electron microscopy (cryo-tem). *In Handbook of nanoparticles*, pages 861–889. 18
- [Esposito et al., 2015] Esposito, E., Ravani, L., Drechsler, M., Mariani, P., Contado, C., Ruokolainen, J., and Cortesi, R. (2015). Cannabinoid antagonist in nanostructured lipid carriers (nlcs): design, characterization and in vivo study. *Materials Science and Engineering: C*, 48:328–336. 18
- [Florence and Attwood, 2015] Florence, A. and Attwood, D. (2015). *Physicochemical principles of pharmacy: In manufacture, formulation and clinical use*. Pharmaceutical press. 15
- [Franks, 1976] Franks, N. (1976). Structural analysis of hydrated egg lecithin and cholesterol bilayers i. x-ray diffraction. *Journal of molecular biology*, pages 345–358. 43
- [Frenkel et al., 1996] Frenkel, D., Smit, B., and Ratner, M. (1996). *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications (Vol. 2)*. San Diego: Academic press. 29
- [Ganem-Rondero et al., 2019] Ganem-Rondero, A., Nava-Arzaluz, M. G., and Piñón-Segundo, E. (2019). Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems. *Nanoparticles in Pharmacotherapy*, pages 311–390. 16
- [Gorelov et al., 2023] Gorelov, S., Titov, A., Tolicheva, O., Konevega, A., and Shvetsov, A. (2023). Dssp in gromacs: tool for defining secondary structures of proteins in trajectories. *bioRxiv*, pages 2023–08. 74, 79
- [Haile, 1992] Haile, J. (1992). *Molecular dynamics simulation: elementary methods*. John Wiley and Sons, Inc. 29
- [Hassan et al., 2014] Hassan, B. M., Raja, S. D., Ponnusamy, K., Naidu, S., Gulshan, W., Mohtashim, L., A, K. M. K., and U., K. A. (2014). Insight into the effect of inhibitor resistant s130g mutant on physico-chemical properties of shv type beta-lactamase: A molecular dynamics study. *PLOS ONE*, 9(12):1–19. 31

-
- [HofsaB et al., 2003] HofsaB, C., Lindahl, E., and Edholm, O. (2003). Molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers with cholesterol. *Biophysical journal*, 84(4):2192–2206. 44, 45, 48
- [Huang and Wang, 2006] Huang, Y. and Wang, C. (2006). Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers. *Journal of controlled release*, 113(1):9–14. 1
- [Huheey et al., 1997] Huheey, J., Keiter, E., and Keiter, R. (1997). *Química inorgánica. Principios de estructura y reactividad*. Alfaomega. 5, 6
- [Iwanaga et al., 1997] Iwanaga, K., Ono, S., Narioka, K., Morimoto, K., Kakemi, M., Yamashita, S., and Oku, N. (1997). Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes: Improvement of stability of insulin in gi tract. *International journal of pharmaceutics*, 157(1):73–80. 1
- [Jain et al., 2007] Jain, A., Chalasani, K., Khar, R., Ahmed, F., and Diwan, P. (2007). Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery. *Journal of drug targeting*, 15(6):417–427. 2
- [Jambeck et al., 2014] Jambeck, J., Eriksson, E., Laaksonen, A., Lyubartsev, A., and L.A., E. (2014). Molecular dynamics studies of liposomes as carriers for photosensitizing drugs: development, validation, and simulations with a coarse-grained model. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(1):5–13. 2
- [Jirgensons et al., 2013] Jirgensons, B., Straumanis, and E.A., M. (2013). *A short text-book of colloid chemistry*. Elsevier. 15
- [Kabsch and Sander, 1983] Kabsch, W. and Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 22(12):2577–2637. 79
- [Kamali and Kharazmi, 2011] Kamali, R. and Kharazmi, A. (2011). Molecular dynamics simulation of surface roughness effects on nanoscale flows. *International Journal of Thermal Sciences*, 50(3):226–232. 28
- [Koolman and Röhm, 2004] Koolman, J. and Röhm, K. H. (2004). *Bioquímica: texto y atlas*. Médica Panamericana. 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
- [Koubi et al., 2000] Koubi, L., Tarek, M., Klein, M. L., and D., S. (2000). Distribution of halothane in a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer from molecular dynamics calculations. *Biophysical journal*, 78(2):800–811. 2
- [Kufareva and Abagyan, 2011] Kufareva, I. and Abagyan, R. (2011). *Methods of protein structure comparison. In Homology modeling*. Humana Press. 71
- [Kulkarni et al., 2011] Kulkarni, P., Baron, P., and Willeke, K. (2011). *Aerosol measurement: principles, techniques, and applications*. John Wiley and Sons. 17, 18
-

-
- [Lasic, 1992] Lasic, D. (1992). Liposomes. *American Scientist*, 80(1):20–31. 1
- [Le-Deygen et al., 2022] Le-Deygen, I., Safronova, A., Mamaeva, P., Skuredina, A., and Kudryashova, E. (2022). Cholesterol significantly affects the interactions between pirfenidone and dppc liposomes: Spectroscopic studies. *Biophysica*, 2(1):79–88. 66
- [LeBard et al., 2012] LeBard, D., Levine, B., DeVane, R., Shinoda, W., and Klein, M. (2012). Premicelles and monomer exchange in aqueous surfactant solutions above and below the critical micelle concentration. *Chemical Physics Letters*, 522:38–42. 31, 55
- [Lebecque et al., 2017] Lebecque, S., Crowet, J., Nasir, M., Deleu, M., and Lins, L. (2017). Molecular dynamics study of micelles properties according to their size. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 72(6):15. 31
- [Levine et al., 2011] Levine, B., Stone, J., and Kohlmeyer, A. (2011). Fast analysis of molecular dynamics trajectories with graphics processing units—radial distribution function histogramming. *Journal of computational physics*, 230(9):3556–3569. 30
- [Levine, 2011] Levine, R. (2011). *Quantum mechanics of molecular rate processes*. Courier Corporation. 30
- [Lobanov et al., 2008] Lobanov, M. Y., Bogatyreva, N. S., and Galzitskaya, O. V. (2008). Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Molecular Biology*, 1(42):623–628. 78
- [Malde et al., 2011] Malde, A. K., Zuo, L., Breeze, M., Stroet, M., Poger, D., Nair, P., and Mark, A. (2011). An automated force field topology builder (atb) and repository: version 1.0. *Journal of chemical theory and computation*, 7(12):4026–4037. 36, 38
- [Malinovsky, 2022] Malinovsky, A. V. (2022). Lehninger’s scheme and conclusions need to be defined more exactly. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 48(1):76–84. 10, 11, 14
- [Martínez et al., 2009] Martínez, L., Andrade, R., Birgin, E. G., and Martínez, J. M. (2009). Packmol: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 30(13):2157–2164. xiv, 36, 37
- [McMurry and Drašar, 2011] McMurry, J. and Drašar, P. (2011). *Organic Chemistry*. Chemické listy. 6, 7, 8
- [Metropolis et al., 1953] Metropolis, N., Rosenbluth, A., Rosenbluth, M., Teller, A., and Teller, E. (1953). Equation of state calculations by fast computing machines. *The journal of chemical physics*, 21(6):1087–1092. 19
- [Milner, 1971] Milner, R. (1971). *An algebraic definition of simulation between programs*. Stanford University. 19
-

-
- [Nagle, 1993] Nagle, J. (1993). Area/lipid of bilayers from nmr. *Biophysical journal*, 64(5):1476–1481. 50
- [Nejabat et al., 2022] Nejabat, M., Kalani, M., Nejabat, M., and Hadizadeh, F. (2022). Molecular dynamic and in vitro evaluation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles as an insulin delivery system at two different ph values. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(20):10153–10161. 2, 71
- [Pace et al., 2014] Pace, C. N., Fu, H., Lee Fryar, K., Landua, J., Trevino, S. R., Schell, D., Thurlkill, R. L., Imura, S., Scholtz, J. M., Gajiwala, K., et al. (2014). Contribution of hydrogen bonds to protein stability. *Protein Science*, 23(5):652–661. 79
- [Partington, 1964] Partington, J. R. (1964). *A history of Chemistry*. Palgrave. 15
- [Patil et al., 2017] Patil, S. M., Keire, D. A., and Chen, K. (2017). Comparison of nmr and dynamic light scattering for measuring diffusion coefficients of formulated insulin: implications for particle size distribution measurements in drug products. *The AAPS journal*, 19:1760–1766. 76
- [Pautot et al., 2003] Pautot, S., Frisken, B., Cheng, J., Xie, X., and Weitz, D. (2003). Spontaneous formation of lipid structures at oil/water/lipid interfaces. *Langmuir*, 19(24):10281–10287. 16
- [Pietzyk and Henschke, 2000] Pietzyk, B. and Henschke, K. (2000). Degradation of phosphatidylcholine in liposomes containing carboplatin in dependence on composition and storage conditions. *International journal of pharmaceutics*, 196(2):215–218. 16
- [Pinkwart et al., 2019] Pinkwart, K., Schneider, F., Lukoseviciute, M., Sauka-Spengler, T., Lyman, E., Eggeling, C., and Sezgin, E. (2019). Nanoscale dynamics of cholesterol in the cell membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 294(34):12599–12609. 11
- [Resnick et al., 2007] Resnick, R., Halliday, D., and Krane, K. (2007). *Física Vol. 2*. Grupo Editorial Patria. 31, 32
- [Reyes and Plancarte, 2008] Reyes, J. A. and Plancarte, A. A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de educación bioquímica*, 27(1):9–18. 15
- [Risselada and Marrink, 2009] Risselada, H. and Marrink, S. (2009). Curvature effects on lipid packing and dynamics in liposomes revealed by coarse grained molecular dynamics simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(12):2056–2067. 2
- [Ritter et al., 2016] Ritter, E., Yordanova, D., Gerlach, T., Smirnova, I., and Jakobtorweihen, S. (2016). Molecular dynamics simulations of various micelles to predict micelle water partition equilibria with cosmomic: influence of micelle size and structure. *Fluid Phase Equilibria*, 422:43–55. 31
-

-
- [Satoh, 2010] Satoh, A. (2010). *Introduction to practice of molecular simulation: molecular dynamics, Monte Carlo, Brownian dynamics, Lattice Boltzmann and dissipative particle dynamics*. Elsevier. 24
- [Schindler and Seelig, 1975] Schindler, H. and Seelig, J. (1975). Deuterium order parameters in relation to thermodynamic properties of a phospholipid bilayer. statistical mechanical interpretation. *Biochemistry*, 14(11):2283–2287. 45
- [Seelig, 1977] Seelig, J. (1977). Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. *Quarterly reviews of biophysics*, 10(3):353–418. 46
- [Seelig and Waespe-Sarcevic, 1978] Seelig, J. and Waespe-Sarcevic, N. (1978). Molecular order in cis and trans unsaturated phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 17(16):3310–3315. 48
- [Senior and Judith, 1987] Senior and Judith, H. (1987). Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 3(2):123–193. 17, 18
- [Shah et al., 2020] Shah, S., Dhawan, V., Holm, R., Nagarsenker, M. S., and Perrie, Y. (2020). Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 154-155:102–122. 1
- [Sharma et al., 2009] Sharma, V., Shukla, R., Saxena, N., Parmar, D., Das, M., and Dhawan, A. (2009). Dna damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology letters*, 185(3):211–218. 26
- [Singh et al., 2020] Singh, D. B. et al. (2020). *Computer-aided drug design*. Springer. 74, 76, 83
- [Singh and et. al, 2021] Singh, H. S. and et. al (2021). Challenges in the physical characterization of lipid nanoparticles. *Pharmaceutics*, 13(4):549. 18
- [Sinko and Singh, 2011] Sinko, P. and Singh, Y. (2011). *Martin’s Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences (6th ed)*. Lippincott Williams and Wilkins. 15, 18
- [Smith and Van Gunsteren, 1993] Smith, P. and Van Gunsteren, W. (1993). The viscosity of spc and spc/e water at 277 and 300 k. *Chemical physics letters*, 215(4):315–318. 35, 38
- [Smith, 1989] Smith, W. (1989). The minimum image convention in non-cubic md cells. *CCP5 Information Quarterly for Computer Simulation of Condensed Phases*, 30(35). 28
- [Spangler, 1990] Spangler, R. (1990). Insulin administration via liposomes. *Diabetes care*, 13(9):911–922. 1
-

-
- [Szoka and Papahadjopoulos, 1981] Szoka, F. and Papahadjopoulos, D. (1981). Liposomes: preparation and characterization. liposomes: From physical structure to therapeutic applications. *Elsevier/North-Holland Biomedical Press*, page 51–82. 1, 18
- [Takahashi et al., 2011] Takahashi, K., Narumi, T., and Yasuoka, K. (2011). A combination of the tree-code and ips method to simulate large scale systems by molecular dynamics. *The Journal of chemical physics*, 135(17):174108. 30
- [Tang et al., 2014] Tang, X., Koenig, P., and Larson, R. (2014). Molecular dynamics simulations of sodium dodecyl sulfate micelles in water the effect of the force field. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(14):3864–3880. 31
- [Trabalzini et al., 2022] Trabalzini, L., Ercoli, J., Trezza, A., Schiavo, I., Macrì, G., Moglia, A., and Finetti, F. (2022). Pharmacological and in silico analysis of oat avenanthramides as egfr inhibitors: Effects on egf-induced lung cancer cell growth and migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15):8534. 67
- [Turkenburg et al., 2018] Turkenburg, M., Whittingham, J., Dodson, G., Dodson, E., Xiao, B., and Bentley, G. (2018). Insulin 1zni. *NCBI*. 36, 38, 71
- [Vermeer et al., 2007] Vermeer, L. S., De Groot, B. L., Réat, V., Milon, A., and Czaplinski, J. (2007). Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers: computation from molecular dynamics simulations and comparison with 2 h nmr experiments. *European Biophysics Journal*, 36(1):919–931. 44, 51
- [Wu et al., 2014] Wu, W., Owino, J., Al-Ostaz, A., and Cai, L. (2014). Applying periodic boundary conditions in finite element analysis. In *SIMULIA community conference, Providence*, pages 707–719. 27
- [Young, 2013] Young, H. D. (2013). *Sears y Zemansky Física universitaria*. Pearson. 19, 31
- [Yveline and et al, 2007] Yveline, H. and et al (2007). Rapid determination of p k a values of 20 amino acids by cze with uv and capacitively coupled contactless conductivity detections. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389:1869–1878. 12
- [Zhang et al., 2021] Zhang, Y., Xiong, G., Ali, Y., Boehm, B., Huang, Y., and Venktraman, S. (2021). Layer-by-layer coated nanoliposomes for oral delivery of insulin. *Nanoscale*, 13(2):776–789. 2