



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOFÍSICA

**ESTABILIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPORTAMIENTO DE
LOS LIPOPLEJOS ANIÓNICOS MEDIANTE LAS FUERZAS DE
MARTINI**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

BIOFÍSICA

AUTORA: VICTORIA ALEJANDRA CEVALLOS LUZURIAGA

DIRECTOR: Dr. RICHARD WILLIAMS PACHACAMA CHOCA MSc.

Riobamba – Ecuador

2022

© 2022, Victoria Alejandra Cevallos Luzuriaga

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho del Autor.

Yo, VICTORIA ALEJANDRA CEVALLOS LUZURIAGA, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citadas y referenciadas.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 18 de marzo de 2022






Victoria Alejandra Cevallos Luzuriaga

055001409-6

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOFÍSICA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; Tipo Proyecto de Investigación, **ESTABILIZACIÓN MOLECULAR DEL COMPORTAMIENTO DE LOS LIPOPLEJOS ANIÓNICOS MEDIANTE LAS FUERZAS DE MARTINI**, realizado por la señorita: **VICTORIA ALEJANDRA CEVALLOS LUZURIAGA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
<p>Biof. Dalinda Ileana Quingatuña Cali MsC. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</p>	 <p>Firmado electrónicamente por: DALINDA ILEANA QUINGATUÑA CALI</p>	<p>2022-03-18</p>
<p>Dr. Richard Willians Pachacama Choca MsC. DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</p>	 <p>RICHARD WILLIANS PACHACAMA CHOCA PACHACAMA CHOCA</p>	<p>2022-03-18</p>
<p>Mat. Luis Marcelo Cortez Bonilla PhD. MIEMBRO DEL TRIBUNAL</p>	 <p>LUIS MARCELO CORTEZ BONILLA</p>	<p>2022-03-18</p>

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado a Dios, porque sé que siempre ha estado a mi lado a pesar de las adversidades. A mis padres Aída Victoria y Francisco Alejandro que me han brindado su apoyo durante este largo camino y se han esforzado por darme lo mejor. A mi hijo Samuel Nicolás por alegrar cada uno de mis días con sus locuras y por ser quien me impulsa a lograr cada uno de mis objetivos, a mis hermanas Paulina y Evelyn por escucharme y compartir conmigo algunos desvelos llenos de carcajadas. A mis abuelitos Fabiola y José por ser mis segundos padres, por recibirme con alegría en su hogar y por sus sabios consejos. A los miembros de mi familia que han estado presentes más que en los buenos, en los malos momentos. Finalmente, a mis amistades, a quienes me han demostrado ser verdaderos y han estado ahí para brindarme su apoyo. A uds todo esto.

Victoria

AGRADECIMIENTO

La vida no te pone “pruebas difíciles de superar”, te presenta situaciones necesarias -aunque muchas desagradables y dolorosas-, para poder “desbloquear” nuevos aprendizajes que te servirán como herramientas para enfrentar otros retos.

-Alan Reyes

Debo admitir que algunos de los sucesos a lo largo de mi vida han difíciles y dolorosos, pero me han dejado su enseñanza, por lo que le agradeceré infinitamente a Dios porque ha sido quien ha guiado mis pasos, mi vida y la de mi familia, he podido palpar en carne propia su inmenso amor y misericordia. Gracias por todas las bendiciones que he recibido y sobre todo por jamás abandonarme. A mis padres, por enseñarme a luchar por mis sueños, por ayudarme a entender cada suceso de mi vida y sobre todo por estar a mi lado brindándome su amor. A mis hermanas, que conmigo somos las tres Marías, porque han sido quienes me han matado de iras, me han sacado una carcajada, me han escuchado cada locura y hemos pasado muchas aventuras. No tengo palabras para agradecer a todos quienes han estado y están en mi vida apoyándome en las buenas, en las malas y en las peores. Sobre todo, en las peores, en estos últimos años que han sido difíciles, gracias porque con una palabra de aliento, un abrazo o solo preguntándome si estoy bien y escuchándome, me han ayudado mucho. La vida me ha dejado una gran lección y es que, si te caes, te levantas y sigues para adelante, pero es sí, no es una opción rendirse.

De manera especial, quiero agradecer a la Biof. Dalinda Quingatuña MsC. por brindarme su apoyo, conocimiento, tiempo, paciencia, perseverancia y algo que valoro mucho, su amistad y calidad humana. Al Dr. Richard Pachacama y al Mat. Marcelo Cortez por su tiempo y ayuda, porque de una u otra buscaron las maneras para que este trabajo de investigación salga adelante. Muchas gracias a todos los docentes que han contribuido en pro de mis conocimientos durante la carrera y han ayudado a mi formación personal y profesional. Por último, agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, la poli, mi poli, por abrirme las puertas y permitir el desarrollo de mis capacidades intelectuales.

Victoria

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	2
1.1. Antecedentes	2
1.2. Planteamiento del problema.....	5
1.3. Justificación	6
1.4. Objetivos	7
1.4.1. Objetivo General	7
1.4.2. Objetivos Específicos	7
1.5. Marco Teórico	8
1.5.1. Membranas Biológicas.....	8
1.5.1.1. Membranas Lipídicas.....	10
1.5.1.2. Lípidos.....	12
1.5.1.3. Fosfolípidos.....	16
1.5.1.4. Lipoplejos.....	20
1.5.2. Ácido Desoxirribonucleico (ADN).....	23
1.5.3. Física Computacional	25
1.5.3.1. Dinámica Molecular (DM)	25
1.5.4. Softwares	26
1.5.4.1. GROMACS.....	27
1.5.4.2. GNUPLOT	29
1.5.4.3. Visión Dinámica Molecular (VDM).....	30
1.5.4.4. Modelo de Grano Grueso (Dimensión).....	31

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	36
2.1.	Tipo y diseño de investigación	36
2.2.	Simulación con Grano Grueso	36
2.3.	Construcción del modelo ideal del sistema en grano grueso	37
2.3.1.	<i>Condiciones iniciales</i>	38
2.3.2.	<i>Preparación del ADN</i>	38
2.3.3.	<i>Creación de la bicapa lipídica de ADN</i>	39
2.3.4.	<i>Centrado y solvatación del sistema</i>	39
2.3.5.	<i>Preparación de los archivos de topología</i>	40
2.3.6.	<i>Minimización y Equilibrio de la Energía</i>	40
2.4.	Modelación Molecular	41
2.4.1.	<i>Sitios de interacción</i>	41
2.4.2.	<i>Interacciones enlazantes</i>	41
2.4.3.	<i>Interacciones no enlazantes</i>	42
2.4.3.1.	<i>Sumas de Ewald</i>	43
2.4.4.	<i>Doble Capa Eléctrica</i>	44
2.4.4.1.	<i>Modelos de la Doble Capa Eléctrica</i>	44
2.4.4.2.	<i>Ecuación de Poisson-Boltzmann</i>	45
2.4.4.3.	<i>Modelo de Gouy – Chapman</i>	45
2.4.4.4.	<i>Modelo de Stern – Grahame</i>	46
2.4.5.	<i>Modelo Primitivo de la Doble Capa Eléctrica</i>	47
2.4.6.	<i>Sobrecarga del Sistema</i>	48
2.5.	Parámetros del sistema	48
2.6.	Cambio de variables del sistema	49

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
3.1.	Construcción del modelo ideal del sistema en grano grueso	50
3.1.1.	<i>Construcción de la Bicapa + ADN + H₂O</i>	54
3.1.2.	<i>Sistema inicial: Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + H₂O</i>	55

3.1.3.	<i>Sistema 2: Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sin Sal (Sin NaCl + H₂O)</i>	58
3.1.4.	<i>Sistema 3: Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H₂O</i>	61
3.2.	Valores de los resultados obtenidos de los diferentes sistemas	65
CONCLUSIONES		70
RECOMENDACIONES		72
GLOSARIO		
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Clasificación de los lípidos de acuerdo con su composición química.....	14
Tabla 2-1: Fosfolípidos más frecuentes en las membranas celulares.....	18
Tabla 3-2: Cambio del tamaño de caja, valores de distancia y concentración para los diferentes sistemas.	49
Tabla 4-3: Grosor de la caja, valores de distancia y concentración para la construcción de la bicapa.	54
Tabla 5-3: Cambio del tamaño de caja, valores de distancia y concentración para el sistema inicial	55
Tabla 6-3: Cambio del tamaño de caja, valores de distancia y concentración para el sistema 2	58
Tabla 7-3: Cambio del tamaño de caja, valores de distancia y concentración para el sistema 3	61
Tabla 8-3: Comparación de los valores obtenidos en cada sistema	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Transfección de grandes lipoplejos.....	5
Figura 2-1: Componentes principales de una membrana biológica.....	9
Figura 3-1: Vista molecular de la membrana celular.....	9
Figura 4-1: Vista transversal de la estructura formada por fosfolípidos en solución acuosa.....	12
Figura 5-1: Diagrama de cómo se asocian varias clases de proteínas con la bicapa lipídica.	14
Figura 6-1: Principales lípidos presentes en las membranas celulares.	15
Figura 7-1: Esquema de un fosfolípido.....	16
Figura 8-1: Esquema de la estructura de un fosfolípido. Los monómeros de fosfolípidos se ensamblan de forma no covalente en la estructura de bicapa, que constituye la base de todas las membranas celulares.	17
Figura 9-1: La fosfatidilcolina, un fosfoglicérido típico.....	18
Figura 10-1: Primera figura: Esquema de un fosfolípido en una membrana. Segunda figura: La estructura de bicapa de las biomembranas.	19
Figura 11-1: Mecanismo de formación de los lipoplejos.....	21
Figura 12-1: Esquema de los grupos fosfato, el azúcar y la base nitrogenada, los cuales en este caso corresponden a la adenina. Los carbonos que contiene el azúcar están enumerados según el orden que propuso Alexander Todd.....	23
Figura 13-1: Molécula de ADN, la doble hélice del ADN.	24
Figura 14-1: Visión práctica del campo de fuerza de Martini.	35
Figura 15-2: Plano interior y plano exterior de Helmholtz.....	46
Figura 16-2: Representación esquemática de las partículas que forman la doble capa eléctrica.....	47

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráf. 1-2: Construcción del modelo ideal del sistema en CG. a) Vista frontal y b) Vista superior .	38
Gráf. 2-3: Visualización en VMD del ADN de 24 pares de bases del paquete descargado de Martini (24bp.pdb)	50
Gráf. 3-3: Eliminación mediante VMD de las moléculas de iones y agua del ADN (24bp.pdb)	51
Gráf. 4-3: Rotación mediante GROMACS de las 2 cadenas de 24 nucleótidos	52
Gráf. 5-3: Creación de la caja -x 12 -y 12 -z 20 nm.....	52
Gráf. 6-2: Visualización del ADN más agua	54
Gráf. 7-2: Creación de bicapa con ADN y agua. a) Vista en un plano XYZ+ b) Vista de rotación.	55
Gráf. 9-3: Simulación del sistema inicial: Bicapa + Lípido (DOPS) + ADN	58
Gráf. 11-3: Simulación del sistema 3: Lípido (DOPS) + ADN + Sin Sal (Sin NaCl). a) Antes de darle los parámetros de simulación. b) Después de darle los parámetros de simulación	61
Gráf. 12-3: Resultados de energías, presión y temperatura del sistema 2 total y de cada caja con los átomos de interacción.....	63
Gráf. 13-3: Video de la simulación del sistema 2: Lípido (DOPS) + ADN + Sal (NaCl)	64
Gráf. 14-3: Gráfico de Temperatura VS Presión de los sistemas 1, 2 y 3, correspondientes a 1) Bicapa +ADN + H ₂ O a una distancia -dm: 0 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47 (mol/l) y cargas de BICAPA: -450, ADN: -4, H: +1, O: -2 (C/m ²); 2) Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sin Sal (Sin NaCl + H ₂ O) a una distancia de -dm: 15 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47 (mol/l) y cargas de BICAPA: -450, DOPS: +, ADN: -4, H: +1, O: -2, Na: 0, Cl: 0 (C/m ²) y 3) Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H ₂ O a una distancia de -dm: 3.5 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47, -salt: 0.15 (mol/l) y cargas BICAPA: -450, DOPS: +, ADN: -4, H: +1, O: -2, Na: +1, Cl: -1 (C/m ²)	66
Gráf. 15-3: Gráfico de Energía total VS Tiempo de los sistemas 1, 2 y 3, correspondientes a 1) Bicapa +ADN + H ₂ O a una distancia -dm: 0 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47 (mol/l) y cargas de BICAPA: -450, ADN: -4, H: +1, O: -2 (C/m ²); 2) Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sin Sal (Sin NaCl + H ₂ O) a una distancia de -dm: 15 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47 (mol/l) y cargas de BICAPA: -450, DOPS: +, ADN: -4, H: +1, O: -2, Na: 0, Cl: 0 (C/m ²) y 3) Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H ₂ O a una distancia de -dm: 3.5 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47, -salt: 0.15 (mol/l) y cargas BICAPA: -450, DOPS: +, ADN: -4, H: +1, O: -2, Na: +1, Cl: -1 (C/m ²).....	68

Gráf. 16-3: Gráfico de Fuerza VS Distancia de los sistemas 1, 2 y 3, correspondientes a 1) Bicapa +ADN + H₂O a una distancia -dm: 0 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47 (mol/l) y cargas de BICAPA: -450, ADN: -4, H: +1, O: -2 (C/m²); 2) Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sin Sal (Sin NaCl + H₂O) a una distancia de -dm: 15 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47 (mol/l) y cargas de BICAPA: -450, DOPS: +, ADN: -4, H: +1, O: -2, Na: 0, Cl: 0 (C/m²) y 3) Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H₂O a una distancia de -dm: 3.5 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47, -salt: 0.15 (mol/l) y cargas BICAPA: -450, DOPS: +, ADN: -4, H: +1, O: -2, Na: +1, Cl: -1 (C/m²)..... 69

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: CÓDIGOS EN GNUPLOT PARA LA REPRESENTACIÓN DE LA GRÁFICA
ENERGÍA VS TIEMPO

ANEXO B: CÓDIGOS EN GNUPLOT PARA LA REPRESENTACIÓN DE LA GRÁFICA
TEMPERATURA VS PRESIÓN

ANEXO C: CÓDIGOS EN GNUPLOT PARA LA REPRESENTACIÓN DE LA GRÁFICA
FUERZA VS DISTANCIA

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

$4\pi\epsilon_0$	Constante de Coulomb
ADN / DNA	Ácido Desoxirribonucleico / deoxyribonucleic acid
A, G, C, T	Adenina, guanina, citosina, timina
ADA	Adenosina desaminasa
ARN	Ácido Ribonucleico
BOTTOM-UP	De abajo hacia arriba
C, H, O, N, P, S	Carbono, Hidrógeno, Oxígeno, Nitrógeno, Fósforo, Azufre
CG	Croarse-Grained / Grano Grueso
CHEMS	Hemisuccinato de colesterilo
Chol	Colesterol
DM / MD	Dinámica Molecular / Molecular Dynamic
DMRIE-C	bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxiethylamonio
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOPS	1,2- dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina de sodio
DOSPA	(+)-N,N-dimetil-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-Pentahidrocloruro de 2,3-bis(dioleiloxi)-1-propaniminio
DOSPER	lipofectamina, 1,3-di-oleoiloxi-2-(6-carboxispermil)-propilamida
DOTAP	N-[1-(2,3-dioleoiloxi)]- N,N,N-trimetilamonio propano metilsulfato
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio cloruro
DRM	Membranas resistentes al detergente
dsADN / dsDNA	ADN de doble cadena
FABP	Fatty acid binding protein
fs	Femtosegundos
GROMACS	GROningen MACHine for Chemical Simulations
K_{bond}	Fuerza constante de enlace
LJ	Potencial de Lennard-Jones
ms	Milisegundos
NVV	Non viral vectors / Vectores no virales
PC-BP	Phosphatidylcholine binding protein
PEI	complejos de polietilenimina
P, N, C, Q	Polar, no polar, apolar, con carga
q_i y q_j	Cargas de los átomos

QSAR	Quantitative Structure Activity Relations
r	Distancia entre los átomos
$R_{\text{bond}} = \sigma$	Distancia de equilibrio entre los átomos
$V_{\text{angle}}(\mathbf{R})$	Potencial armónico débil del ángulo
$V_{\text{bond}}(\mathbf{R})$	Potencial armónico débil de enlace
TM	Transmembrana
TOP-DOWN	De arriba hacia abajo
VMD	Visual Molecular Dynamics
μs	Microsegundos

RESUMEN

Este trabajo de titulación buscó estudiar y estabilizar de manera molecular el comportamiento del lipoplejo aniónico. La simulación molecular se realizó con grano grueso (CG) de Martini ayudado de *Visual Molecular Dynamics* (VMD) y *GROningen MAchine for Chemical Simulations* (GROMACS). Se construyó una caja de 120x120x200 Ångstroms, esta contenía el cilindro representando al ácido desoxirribonucleico (ADN) y el plano dando lugar a la membrana con el lípido 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina de sodio (DOPS), estos estaban expuestos en un modelo primitivo 1:1. La constante dieléctrica del sistema fue de 15, la presión de 1 bar y su temperatura de 303 K; debido a que el ADN, el lípido DOPS, la membrana y los iones de sal (NaCl) están cargados, surgen fenómenos de correlación de carga y tamaño, es decir, interaccionan entre sí por efecto de sus cargas. En la configuración inicial se practicó la solvatación, minimización y equilibrio de la energía, posteriormente se agregó y cambió valores en las variables para la obtención de los diferentes sistemas. Los valores de distancia fueron de 0, 15 y 3.5 nm en los sistemas 1, 2 y 3 respectivamente. Se concluyó que la adición de NaCl en uno de ellos, logró estabilizarlo en un cierto punto y para contrarrestar las interacciones electrostáticas se empleó el formalismo de las sumas de Ewald. Este resultado también se debe al modelo de la doble capa eléctrica porque la densidad de carga superficial aumentó y se produjo la inversión de cargas o sobrecarga del sistema. Con esto, los cationes y aniones cambiaron su comportamiento, haciendo que estos fuesen atraídos y dieran origen a las interacciones electrostáticas. El valor de energía total del sistema fue $-5.62030e+05$ kJ/mol, en tu tiempo de 1040.577 s. Se recomienda ampliar la investigación con un sistema más grade para el estudio de la lipoflexión del ADN.

Palabras clave: <BIOFÍSICA>, <ESTABILIZACIÓN MOLECULAR>, <COMPORTAMIENTO>, <LIPOPLEJOS ANIÓNICOS>, <MARTINI>, <ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)> <DOBLE CAPA ELÉCTRICA>.

LEONARDO
FABIO
MEDINA
NUSTE

Firmado digitalmente por
LEONARDO FABIO MEDINA NUSTE
Nombre de reconocimiento (DN):
c=EC, o=BANCO CENTRAL DEL
ECUADOR, ou=ENTIDAD DE
CERTIFICACION DE INFORMACION-
EIBICE, l=QUITO,
serialNumber=0000621485,
cn=LEONARDO FABIO MEDINA
NUSTE
Fecha: 2022.06.27 11:00:56 -05'00'



1182-DBRA-UTP-2022

ABSTRACT

This degree work aimed to study and stabilise the molecular behaviour of the anionic lipoplex. The molecular simulation was performed with Martini coarse-grained (CG) aided by Visual Molecular Dynamics (VMD) and GRONingen MACHine for Chemical Simulations (GROMACS). A box of 120x120x200 Angstroms was constructed, containing the cylinder representing the deoxyribonucleic acid (DNA) and the plane giving rise to the membrane with the lipid 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine sodium (DOPS), these were exposed in a primitive 1:1 model. The dielectric constant of the system was 15, the pressure 1 bar and its temperature 303 K; because DNA, DOPS lipid, membrane and salt ions (NaCl) are charged, charge-size correlation phenomena arise, i.e. they interact with each other by the effect of their charges. In the initial configuration, solvation, minimisation, and energy balance were practised, then values were added and changed in the variables to obtain the different systems. The distance values were 0, 15 and 3.5 nm in systems 1, 2 and 3 respectively. It was concluded that the addition of NaCl in one of them, managed to stabilise it at a certain point and to counteract the electrostatic interactions, the formalism of Ewald sums was used. This result is also due to the electric double layer model because the surface charge density increased, and the system became overcharged. With this, the cations and anions changed their behaviour, causing them to be attracted and giving rise to electrostatic interactions. The total energy value of the system was $-5.62030e+05$ kJ/mol, in your time of 1040.577 s. It is recommended to extend the investigation with a larger system for the study of DNA lipoflexion.

KEYWORDS: <BIOPHYSICS>, <MOLECULAR STABILIZATION>, <BEHAVIOUR>, <ANIONIC LIPOPLEXES>, <MARTINI>, <DEOXYRIBONUCLEIC ACID (DNA)>, <ELECTRICAL DOUBLE LAYER>.



Dra. Carmita Eulalia Rojas Castro. Mgs.
0602890469

1182-DBRA-UTP-2022

INTRODUCCIÓN

La determinación empírica de las estructuras e interacciones de la interfaz es complicada debido a la escala molecular requerida, para lo cual se han aplicado y se aplican diferentes métodos computacionales, como simulaciones de grano grueso, dependiendo del tamaño de la molécula y el tiempo de simulación, mesoscópico o atómico en el ensamblaje del surfactante en la interfase. Los cálculos son predicciones de las propiedades de los materiales, por lo que al elegir un modelo de simulación es importante tener en cuenta los objetivos y la escala del proyecto, además de las aplicaciones analógicas más comunes.

Hoy en día las simulaciones han tomado un gran impacto en el mundo de la ciencia dado que es una herramienta accesible, económica y su grado de factibilidad es alto, sobre todo en la investigación. Se ha realizado un estudio previo de una bicapa de fosfolípidos con ADN usando grano grueso, ahora con esta investigación se realizará un tratamiento a priori con CG del ADN, un lípido y la bicapa lipídica para poder entender el comportamiento de los sistemas moleculares ya que tiene grandes aplicaciones en el ámbito de la medicina. Este trabajo se divide en tres capítulos.

El capítulo I describe con gran relevancia el contexto del trabajo, así como los fundamentos teóricos y la literatura bibliográfica utilizada para comprender el sistema objeto de estudio. El capítulo II reitera la metodología utilizada para resolver el sistema que incluye plano, cilindro y el medio a partir de modelos físicos, destacando la doble capa eléctrica. El capítulo III analiza los resultados obtenidos tras realizar la simulación de los diferentes sistemas visualizados en VMD, con los valores de topología en GROMACS y gráficas GNUPLOT.

Una vez que se tiene los resultados de la simulación se da respuesta a los objetivos planteados con las conclusiones respectivas de la investigación, así como las recomendaciones para futuros trabajos en el mundo de la física computacional, la bibliografía y los anexos en donde se puede observar los scripts de las gráficas obtenidas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes

Según la tesis doctoral “*Nuevas estrategias de compactación y transfección de DN-RNA en terapia génica*” realizada por (Martínez, 2017), menciona que la terapia génica surgió en 1970 cuando se desarrolló el cultivo de líneas celulares de mamíferos y nació la idea de introducir en él ácido desoxirribonucleico (ADN) exógeno de forma permanente, estable, funcional y hereditaria, para proporcionar nuevas funciones genéticas. Sin embargo, el escaso desarrollo de la biología molecular y las controversias en torno a los principios éticos de la investigación impidieron en su momento obtener resultados significativos. Esto solo ha sucedido con el desarrollo de vectores retrovirales de primera generación y el avance de los principios legales relacionados.

Bajo el mismo concepto, (Martínez, 2017) destaca que a principios de 1990, se realizaron los primeros ensayos clínicos utilizando vectores retrovirales para administrar copias del gen de la adenosina desaminasa (ADA) en células T en un paciente con deficiencia de ADA. Desde entonces, la terapia génica ha experimentado un gran auge que se ha traducido en la mejora de la capacidad inmunitaria de un grupo de niños franceses con inmunodeficiencia combinada grave. Algunos de estos niños acababan desarrollando leucemia porque, al introducir ADN a través de retrovirus, es capaz de integrarse en las células oncogénicas y activarlas. “Fue entonces cuando se la empezó a considerar como una terapia de futuro con incalculables aplicaciones, siempre que pudieran eliminarse o reducirse los efectos secundarios” (Martínez, 2017, p. 18).

Por otro lado, en abril de 2020 se publicó un artículo denominado “*A molecular view on the escape of lipoplexed DNA from the endosome*” por (Bruininks, Souza y Marrink, 2019) en el cual se plantea que el uso de vectores no virales para la terapia génica in vivo puede aumentar significativamente la seguridad y reducir los costos de preparación. “El uso de complejos de ADN / liposomas catiónicos (lipoplejos) para entregar material genético tiene un enfoque prometedor como vectores no virales” (Bruininks et al., [2020], p. 1). En esta investigación se utilizaron simulaciones de dinámica molecular de grano grueso para conocer el mecanismo molecular y a su vez comprobar si es posible una transferencia eficiente de los lipoplejos al ADN.

(Bruininks, Souza y Marrink, 2019) pudieron simular con éxito la transfección mediada por lipoplejo de ADN de doble cadena (dsADN) sobre un modelo de membrana endosómica y observaron dos vías de fusión profundamente diferentes. La liberación del dsADN por descompresión rápida de la fase HII

ocurre cuando el dsADN se encuentra perpendicular a la membrana normal, mientras que se observa una liberación de dsADN similar a la eyección o de descompresión lenta cuando el dsADN está orientado en paralelo a la bicapa normal. Las transiciones entre estos estados también son posibles a lo largo de toda la ruta de fusión. Curiosamente, los resultados obtenidos para el pequeño lipoplejo indican que la transfección del primer fragmento de dsDNA desencadena la liberación de una cantidad sustancial, si no todo, del material genético restante, probablemente causado por una mayor desestabilización del lipoplejo una vez que se libera la carga.

(Huang y Li, 1997) en su trabajo *“Liposomal gene delivery: A complex package”* nos dice que teniendo en cuenta que la composición lipídica de la membrana endosómica no se puede controlar, las diferencias entre las formulaciones de lipoplejo parecen ser más interesantes desde el punto de vista del diseño racional. Sin embargo, la composición de la bicapa de la membrana endosómica varía según la especie y el tipo de célula, por lo que comprender las interacciones entre el lipoplejo y el endosoma es de igual importancia. Entonces, se encuentra que “la eficiencia de la transfección es sensible a cambios menores tanto en la composición del lipoplejo como en la de la membrana endosómica, lo que está en línea con los experimentos” (Huang y Li, 1997, p. 10). La mayor cantidad de transfección se observó en el DOTAP: DOPE lipoplejo. No se observó ninguna transfección en el complejo DPTAP: DOPE, y DLiTAP: DOPE mostró una fusogenicidad intermedia (Bruininks, Souza y Marrink, 2019, p. 10).

En los trabajos de (Eastman et al., 1997) titulado *“Biophysical characterization of cationic lipid: DNA complexes”* y de (Ma et al., 2007b) denominado *“Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery”*, detallan que interesantemente las mismas modificaciones del tipo de lípidos, por ejemplo, la presencia de colas poliinsaturadas, pueden tener efectos tanto estabilizadores como desestabilizadores en la eficiencia de la fusión, lo que dificulta las predicciones racionales de los vehículos de reparto óptimo. Además, nuestros resultados apuntan a un importante papel del tamaño del lipoplejo, siendo el lipoplejo más grande menos fusógeno. Esto lo atribuimos a un aumento de la estabilidad del lipoplejo que causa una mezcla lipídica más lenta del lipoplejo y de la membrana objetivo. Además, el tamaño y la forma del lipoplejo afectan la forma en que el complejo se orienta e interactúa con la membrana endosómica (curva). En este estudio se exploró el efecto de la variación de las colas de lípidos, manteniendo constantes muchos otros parámetros del lipoplejo. “En el futuro se podría investigar el papel de los grupos de cabezas de lípidos y las proporciones de carga, que se sabe que afectan a la transfección” (Ma et al., 2007a; Eastman, 1997). Además, la relación ADN/lípido y el tamaño de los fragmentos de ADN podrían influir de manera importante. Sería interesante ver hasta qué punto el cambio de esos parámetros altera las vías de fusión y la cinética observadas. Para proporcionar una mayor comprensión del proceso, es necesario que “los

mecanismos observados se fundan en un tipo de descripción continua” (Hamm y Kozlov, 2000; May y Ben-Shaul, 2004) de la que se puedan extraer más directamente las fuerzas motrices energéticas que compiten entre sí.

Las predicciones in-silico que realizaron (Bruininks, Souza y Marrink, 2019) necesitaban validación experimental, aunque resolver las vías de fusión a nivel molecular sigue siendo muy difícil. El sistema resuelto en el tiempo en combinación con la microscopía de fluorescencia de una sola molécula podría utilizarse para sondear la orientación relativa del lipoplejo y el material genético incrustado durante el proceso de transfección. Además, podrían utilizarse ensayos de fuga para comprobar si el material endosómico se escapa o no de manera concomitante, por ejemplo, a través de la formación de poros transitorios.

Aunque el proceso de fusión del lipoplejo que se describió no implica tales poros transitorios, se observó que la presencia de canales abiertos en el lipoplejo (Figura 1-1) implica que el material endosómico puede transfectarse junto con el dsADN aunque la fusión en sí no tenga fugas. Además, pudieron observar vías de fusión con fugas en estudios de simulación anteriores entre las membranas lipídicas, y parecieron ser altamente dependientes tanto de la composición lipídica como de las condiciones de estrés local (Markvoort y Marrink, 2011). Por lo tanto, parece plausible que tales poros transitorios puedan también formarse durante la fusión del lipoplejo.

Finalmente, demostraron que hoy en día es posible realizar simulaciones informáticas detalladas de la fusión entre un lipoplejo y las membranas endosómicas modelo, lo que abre el camino a estudios sistemáticos utilizando las formulaciones de lipoplejo más avanzadas disponibles en la actualidad (Barrán-Berdón et al., 2014; Al-Dulaymi et al., 2019; Severino et al., 2015; Leite Nascimento et al., 2016). Además, “las vías de fusión observadas podrían tener una importancia genérica para la absorción de nanopartículas de complejidad lipídica en las células después de la endocitosis” (Bruininks et al., 2020).

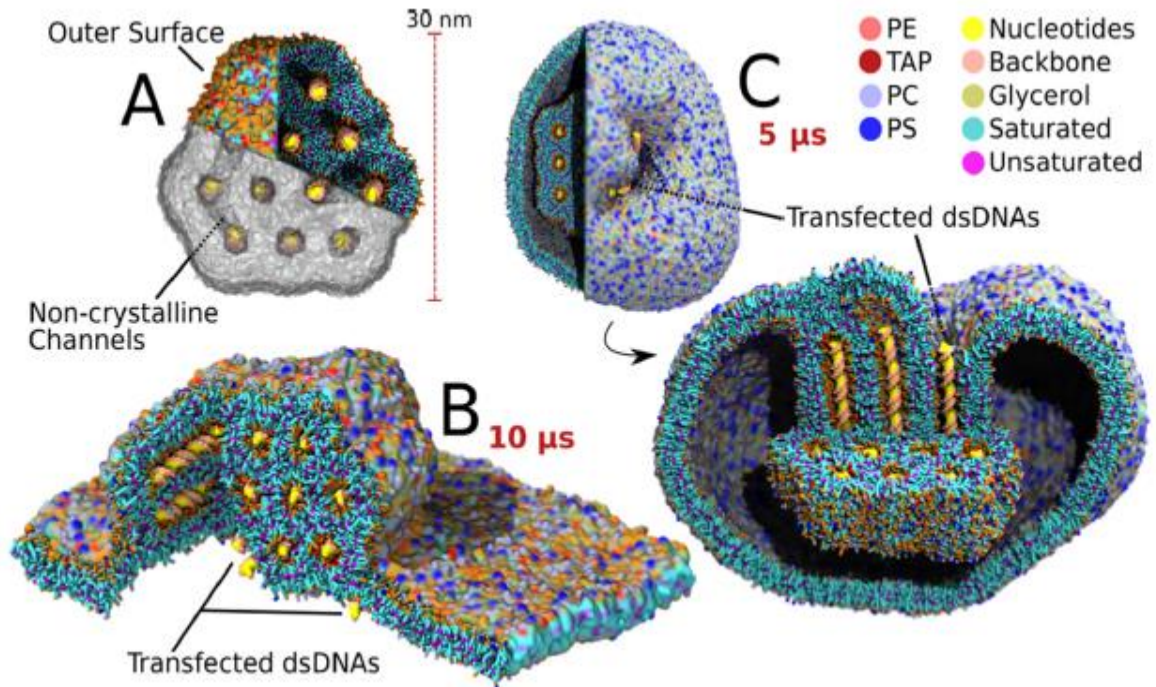


Figura 1-1: Transfección de grandes lipoplejos¹.

Fuente: (Bruininks et al., 2020).

1.2. Planteamiento del problema

Se puede definir a la terapia génica como la transferencia de genes a células específicas, produciendo un efecto terapéutico y pudiendo dar lugar a la corrección de un defecto genético; podría decirse también que es un conjunto de técnicas con las que se pueden mover las secuencias de ADN o ácido ribonucleico (ARN) al interior de células diana, buscando modular la expresión de ciertas proteínas que están alteradas y revertir el trastorno biológico producido. Existen ensayos clínicos que fueron realizados a principio de los 90, la primera terapia aprobada y empleada fue en Europa en el 2012. Este concepto existe desde hace algún tiempo atrás, el problema sigue siendo entrar en las células adecuadas, sin ser tóxico para el resto del cuerpo. Muchos organismos han desarrollado medidas estrictas para bloquear la captación del ADN de su entorno y así poder evitar una inestabilidad genética.

¹ El lipoplejo grande (A) mostró la misma estructura estable de HII que el pequeño lipoplejo con dsDNA dentro de los canales acuosos. También hay pequeños canales de conexión adicionales, como se indica. La transfección se realizó encima de un parche bicapa de modelo endosómico grande (B) y desde dentro de una vesícula endosómica modelo (C). A diferencia del pequeño lipoplejo, la fusión no se produjo espontáneamente y tuvo que iniciarse utilizando un potencial de sesgo en uno de los canales. Tras la liberación del potencial de polarización, el dsADN del interior del canal extraído y todo el dsADN conectado a través de canales de conexión, se transfirió (3 fragmentos de ADN transfectados tanto en el sistema laminar como en el vesicular al extraer el mismo canal inicial).

El uso de virus como vectores no virales puede conducir a una fuerte respuesta inmunológica, ya que el ADN desnudo se degrada rápidamente debido a las exonucleasas, en tanto que, los virus como vectores pueden conllevar a una respuesta inmunológica fuerte, por esa razón se están desarrollando nuevos vectores no virales. La mayoría de ellos se utilizan en lípidos catiónicos o polímeros para la complejión del ADN cargado negativamente y ocultando el material genético de la degradación. Estos vectores lipídicos catiónicos han demostrado buenos resultados favoreciendo a la interacción electrostática espontánea entre las cargas negativas de los fosfolípidos y el ADN, sin embargo, no son favorables para la transfección y presentan niveles altos de citotoxicidad.

Por esta razón, en este trabajo se pretende utilizar vectores lipídicos aniónicos que son lipoplejos biocompatibles y presentan bajos niveles de toxicidad, pero debido a su carga impide que se asocie con el ADN, el objeto de estudio de esta investigación es tratar de estabilizar estos lipoplejos aniónicos. Las simulaciones de dinámica molecular (DM) constituyen una herramienta alternativa para estudiar los procesos moleculares en detalle atómico o casi atómico. En particular, los modelos de grano grueso (CG) como el de Martini han demostrado ser populares porque cambian algunos de los detalles atómicos por una aceleración computacional y permiten la simulación directa de la fusión de la membrana. El modelo de Martini se emplea para investigar el mecanismo molecular subyacente a la transferencia eficiente de ADN de los lipoplejos. El trabajo es modelar el lipoplejo aniónico utilizando una membrana biológica en un medio acuoso y mediante las fuerzas de Martini, ver su comportamiento y estabilizarlo.

1.3. Justificación

En los últimos años hubo un auge en las investigaciones de la terapia génica, generalmente usada para el tratamiento de enfermedades de gran incidencia, para que esta se pueda llevar a cabo se requiere de vectores capaces de encapsular el material genético y entregarlo en el núcleo celular. La información genética se encuentra codificada en el plásmido y el principal requisito para el uso terapéutico es su entrega en los compartimentos celulares superando barreras tanto extra como intracelulares, sin embargo, es muy poco probable debido a que los ácidos nucleicos sufren una degradación enzimática rápida. Es por esta razón que es necesario el uso de vehículos de entrega, a los que también se los llama vectores, los cuales pueden transportar ácidos nucleicos hasta el sitio de acción.

Los vectores no virales son los métodos de introducción del material genético en las células con la síntesis de una molécula determinada, pero no se basan en virus. Últimamente los avances a nivel técnico, de herramientas y conocimiento de los vectores no virales han incrementado viéndose un

futuro prometedor en la terapia génica como transportador de ADN. En la bibliografía los vectores no virales presentan dos ventajas, no desencadenan una respuesta inmunológica en específico y son mucho más baratos que los vectores virales. Estudios recientes han demostrado que la formación de complejos entre liposomas aniónicos y ADN aparece como una alternativa a los liposomas catiónicos debido a su baja toxicidad y son componentes de la membrana biológica.

Sin embargo, estos vectores aniónicos tienen limitaciones porque la repulsión electrostática entre los liposomas aniónicos y el ADN requiere de agentes mediadores para que se atraigan entre sí y formen complejos. Los cationes multivalentes han sido usados para la formación de lipoplejos aniónicos y entre ellos los cationes divalentes son los más comunes. En este trabajo se pretende aportar información acerca del proceso de formación de los complejos, así como de sus propiedades de estabilidad mediante las fuerzas de Martini ya que se lo usa para simular la fusión entre lipoplejos y la membrana.

Para la realización de esta investigación se requiere de conocimientos en biofísica celular, molecular y física computacional, los cuales se han visto a lo largo de la carrera, siendo viable el tema propuesto. Los recursos económicos que se necesitan no son muy grandes debido a que se cuenta con los ordenadores y las fuentes de poder de la ESPOCH, además los softwares para la obtención de resultados están libres en internet. Cabe destacar que para esta investigación se cuenta con el apoyo de Physics Research Group y con los equipos necesarios, ya que este estudio es de vital importancia por el impacto que puede tener como base teórica para posteriores trabajos experimentales en vectores lipídicos aniónicos usados en terapia génica.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Estabilizar de manera molecular el comportamiento de los lipoplejos aniónicos mediante las fuerzas de Martini.

1.4.2. Objetivos específicos

- ❖ Construir el sistema del lipoplejo aniónico usando grano grueso de Martini.
- ❖ Simular el sistema variando algunos parámetros para poder observar el comportamiento de los lipoplejos aniónicos.

- ❖ Estudiar y comparar los resultados obtenidos con los cambios realizados en los diferentes parámetros para la estabilización del lipoplejo.
- ❖ Determinar los parámetros que le permiten al lipoplejo estar más estable.

1.5. Marco teórico

1.5.1. Membranas biológicas

Las membranas biológicas son los componentes primordiales de todos los organismos (Philip L Yeagle, 2005, p. 27), son estructuras esencialmente formadas por una bicapa de fosfolípido con proteínas incorporadas, las cuales están presentes en las células biológicas, así como en los diferentes organelos (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, 2000). Los principales componentes de las membranas biológicas son las proteínas y los lípidos, los hidratos de carbono (representan un 10 % del peso de la membrana plasmática) están unidos de forma covalente a las proteínas o a los lípidos (Philip L Yeagle, 2005).

Los estudios basados en la microscopía electrónica y el análisis de la composición química de las membranas biológicas, así como los estudios de propiedades físicas como la permeabilidad y la difusión de moléculas de proteínas y lípidos en las membranas, han llevado al desarrollo de los denominados modelos de mosaico fluido. Este modelo fue desarrollado por (Singer y Nicolson, 1972), es el método más aceptado para describir biopelículas. La estructura básica de las membranas es una bicapa lipídica, en la que las moléculas individuales pueden moverse como en un líquido bidimensional. Una bicapa lipídica es una mezcla de varias clases de moléculas, incluidos fosfolípidos y glicolípidos, así como otras moléculas pequeñas como el colesterol. *“Embedding of Membrane Proteins in Lipid Bilayers”* (Balbuena, Maldonado-Arce y Zapata, 2010).

Tomando el trabajo de (Martínez-Balbuena, Maldonado-Arce y Hernández-Zapata, 2010) la estructura de las membranas biológicas es posible porque los fosfolípidos pertenecen a una clase específica de moléculas, llamadas "anfifílicas", a las que también pertenecen los tensioactivos. Este nombre se debe a que una parte de la molécula (la cabeza polar) es soluble en agua, mientras que la otra parte (la cola hidrófoba) es insoluble en dicho disolvente. Cuando estas moléculas se disuelven en agua, los restos hidrófobos tienden a agruparse para evitar el contacto con el disolvente en el que son insolubles, lo que da como resultado una estructura bicapa (recordando que el entorno celular es esencialmente agua). Las proteínas que pueden intercalarse en la bicapa descrita anteriormente tienen segmentos hidrofóbicos que ya no son solubles en agua, que se unen al centro hidrofóbico de la membrana.

La estructura de la bicapa lipídica se muestra en la Figura 2-1, y la fórmula molecular de uno de los fosfolípidos más conocidos de la familia de la fosfatidilcolina. Utilizando diversas técnicas

experimentales, como la dispersión de radiación y la microscopía electrónica, se puede determinar el espesor de una membrana compuesta por moléculas anfifílicas con valores alrededor de 50 Å. “Dicho espesor experimental coincide bastante bien con lo esperado a partir de la longitud de las moléculas que forman las membranas” (Balbuena, Maldonado-Arce y Zapata, 2010).

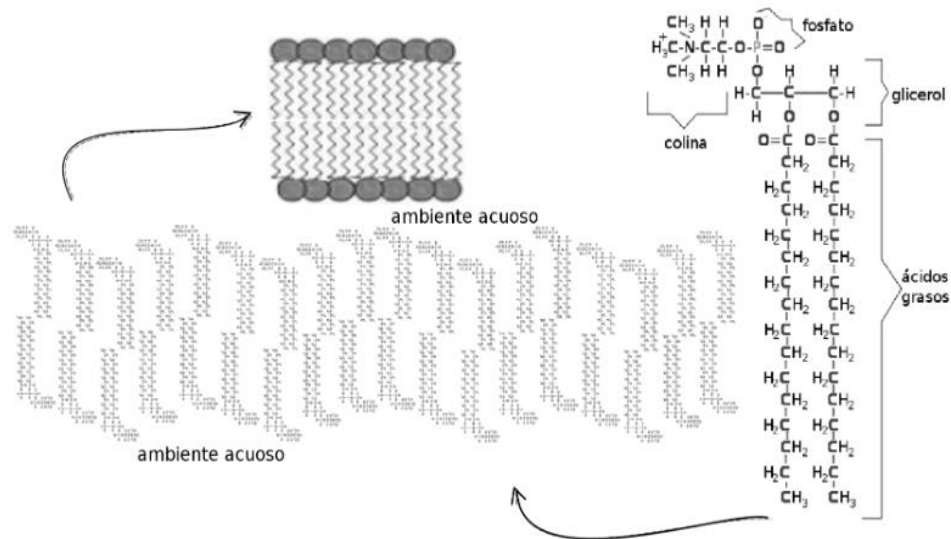


Figura 2-1: Componentes principales de una membrana biológica.²

Fuente: (Martínez-Balbuena, Maldonado-Arce y Hernández-Zapata, 2010).

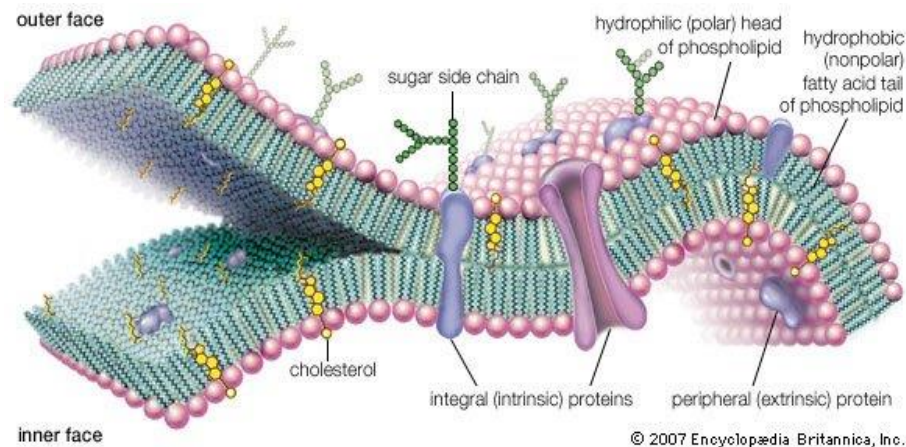


Figura 3-1: Vista molecular de la membrana celular.³

Fuente: (Britannica, 2007).

² Uno de los componentes principales de la membrana biológica es una matriz lipídica, en la cual, las colas hidrofóbicas de las moléculas de fosfolípido evitan el contacto con el agua. En la figura también se muestra la molécula de uno de los fosfolípidos más comunes de la familia de la fosfatidilcolina.

³ Las proteínas intrínsecas penetran y se unen fuertemente a la bicapa lipídica, formada en gran parte por fosfolípidos y colesterol y que suele tener un grosor de entre 4 y 10 nanómetros (nm; 1 nm = 10⁻⁹ metros). Las proteínas extrínsecas están ligeramente unidas a las superficies hidrofílicas (polares), que están orientadas al medio acuoso tanto dentro como fuera de la célula. Algunas proteínas intrínsecas presentan cadenas laterales de azúcar en la superficie exterior de la célula.

1.5.1.1. Membranas Lipídicas

En todo el mundo biológico, una película hidrofóbica de 30 Å suele delimitar los entornos que sirven de margen entre la vida y la muerte para las células individuales. Los descubrimientos bioquímicos y biofísicos han proporcionado un modelo detallado de la composición y estructura de las membranas, que incluye niveles de organización dinámica tanto en la bicapa lipídica (asimetría lipídica) como en la dimensión lateral (dominios lipídicos) de las membranas. ¿Cómo aplican las células las enzimas anabólicas y catabólicas, las translocasas y los transportadores, además del comportamiento intrínseco de fase física de los lípidos y sus interacciones con las proteínas de la membrana, para crear las composiciones únicas y las múltiples funcionalidades de sus membranas individuales? (Pena, 1986, pp. 31-47).

Aunque ahora entendemos las funciones específicas de numerosos lípidos, la definición completa de la utilidad del repertorio de lípidos eucariotas sigue siendo difícil de alcanzar. Los lípidos cumplen tres funciones generales. En primer lugar, debido a su estado relativamente reducido, los lípidos se utilizan para el almacenamiento de energía, principalmente como triacilglicerol y ésteres de esterilo, en las gotas de lípidos. Éstas funcionan principalmente como depósitos anhidros para el almacenamiento eficiente de las reservas calóricas y como almacenes de componentes de ácidos grasos y esteroides que son necesarios para la biogénesis de las membranas.

En segundo lugar, la matriz de las membranas celulares está formada por lípidos polares, que constan de una parte hidrofóbica y otra hidrofílica. La propensión de las partes hidrofóbicas a auto asociarse (impulsadas entrópicamente por el agua), y la tendencia de las partes hidrofílicas a interactuar con el medio acuoso y entre sí, es la base física de la formación espontánea de las membranas. Este principio fundamental de los lípidos anfipáticos es una propiedad fisión y fusión, características que son esenciales para la división celular, la reproducción biológica y el tráfico de membranas intracelulares (Pena, 1986, pp. 31-47). Los lípidos también permiten que determinadas proteínas de las membranas se agreguen y que otras se dispersen.

Por último, los lípidos pueden actuar como primeros y segundos mensajeros en los procesos de transducción de señales y reconocimiento molecular. La degradación de los lípidos anfipáticos permite que se produzcan fenómenos de señalización bipartita, que pueden ser transmitidos dentro de una membrana por las porciones hidrofóbicas de la molécula y también propagados a través del citosol por las porciones solubles (polares) de la molécula. Además, algunos lípidos funcionan para definir dominios de membrana, que reclutan proteínas del citosol que posteriormente organizan complejos secundarios de señalización o efectores.

Los avances en biofísica, química y genética han atraído una atención renovada sobre las funciones biológicas de la gran variedad de lípidos de las membranas. Una propiedad de los lípidos que ha fascinado a los científicos es su comportamiento de fase. En las células, los lípidos pueden adoptar varias fases fluidas y sólidas, que se caracterizan por una disposición espacial y una libertad de movimiento diferentes de cada lípido con respecto a sus vecinos. Los enfoques biofísicos han definido los principios de la coexistencia de dos fases fluidas (con características físicas diferentes dentro de un mismo plano de la membrana) que están delimitadas por un límite de fase, y las consecuencias en la organización de la membrana (Evered y Collins, 2009, pp. 15-17).

Los avances en la espectrometría de masas han catalizado un desarrollo precipitado en el análisis holístico y de alta sensibilidad (y alto rendimiento) de los lípidos, dando la bienvenida a los lípidos al reino de la genómica y la proteómica. La identificación de nuevos genes relacionados con las enfermedades ha revelado la implicación de proteínas relacionadas con los lípidos, como enzimas (hidrolasas lisosomales), transportadores (transportadores de cassette de unión a ATP) o transportadores de unión a lípidos.

Hace algunos años sugirió que en las membranas biológicas hay micro dominios secretados lateralmente llamados balsas que difieren en la composición de lípidos y proteínas del resto de la membrana. Se cree que estos micro dominios son ricos en esfingolípidos y colesterol y tienen un ordenamiento de lípidos más alto que la membrana circundante. A pesar de los muchos esfuerzos por dilucidar la naturaleza y función de las balsas, todavía existe un intenso debate sobre su naturaleza y características, y las funciones que desempeñan los lípidos y las proteínas de la bicapa siguen sin entenderse por completo (Evered y Collins, 2009, pp. 15-17).

La sensibilidad a la solubilización con detergente de las membranas solubles en detergente (DSM), está estrechamente relacionada con la composición lipídica original de la membrana (principalmente el contenido relativo de esfingomiélin y colesterol) y su ordenación lipídica. Mientras que las membranas resistentes al detergente (DRM) son ricas en esfingomiélin y colesterol, además tiene un orden de lípidos más alto que la membrana original. Cuentan con conexiones estrechas entre el citoesqueleto y las vesículas de lípidos insolubles.

La interacción de la proteína GAP-43 (que según se informa pertenece a balsas neuronales y está involucrada en el crecimiento neuronal) con sistemas de membrana modelo se ha destacado por la relevancia de las interacciones proteína-lípido. Usando ensayos de interacción GAP-43 con sistemas modelo de membrana, se observa que las interacciones de proteínas con bicapas lipídicas dependen de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, y se detectó que los pares GAP-43 tienen una fuerte afinidad por la interacción en comparación con los sistemas lipídicos desordenados. Además, el sistema lipídico secuenciado es mayor sistema de fluidos (Sanchez Gonzalez, 2006, p. 41).

Aunque los estudios de las membranas pueden beneficiarse ahora de los análisis detallados a gran escala de las especies moleculares de los lípidos, en la actualidad hay una escasez de datos en relación con puntos clave, entre ellos: el análisis completo de la composición de los lípidos para cada órgano, las composiciones de los lípidos de cada folio de la bicapa, el acoplamiento de los comportamientos de fase de los dos folios y la influencia de las proteínas en los comportamientos de fase de los lípidos. Para superar las barreras técnicas y conceptuales a las que se enfrenta este campo, es necesario un enfoque multidisciplinario en el que colaboren bioquímicos, biólogos celulares, físicos y tecnólogos de la información (Sanchez Gonzalez, 2006, p. 41).

Estos avances pondrán de manifiesto los principios básicos de funcionamiento de las células y los tejidos, pero también permitirán comprender mejor la patogenicidad de las enfermedades. Existen importantes enfermedades humanas, como la aterosclerosis, enfermedades infecciosas, Alzheimer y el cáncer, las cuales tienen un componente lipídico en su epidemiología. La comprensión molecular de la contribución de los lípidos al proceso de la enfermedad permitirá el desarrollo de nuevos enfoques para la prevención, el diagnóstico y la cura.

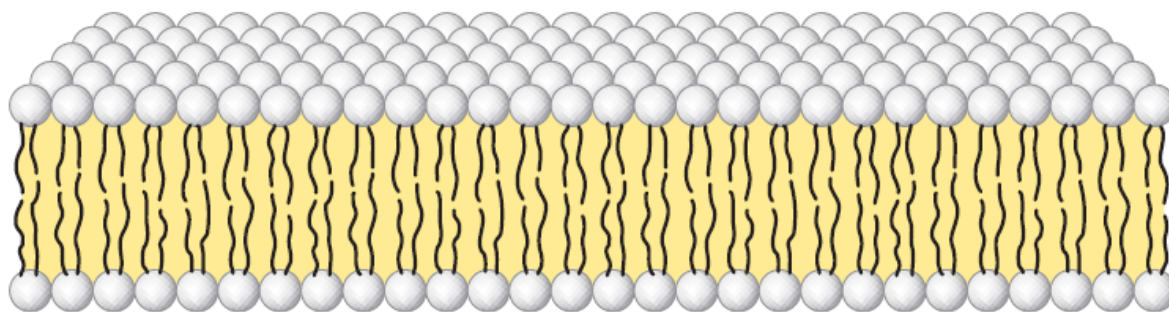


Figura 4-1: Vista transversal de la estructura formada por fosfolípidos en solución acuosa.⁴
Fuente: (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, 2000).

1.5.1.2. Lípidos

(Sanchez Gonzalez, 2006, p. 38) en el libro *Biología celular y molecular* nos dice que los lípidos son un grupo de biomoléculas orgánicas con propiedades químicas heterogéneas, insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos no polares como cloroformo, éter, benceno y xileno. Se descubrió que eran componentes estructurales y de almacenamiento de energía. Su distribución es común en células y organismos, y realizan funciones esenciales. En su estructura encontramos largas cadenas de

⁴ Las esferas blancas representan las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos, y las líneas negras onduladas (en las regiones amarillas) representan las colas hidrofóbicas. Se muestra una lámina de fosfolípidos de dos moléculas de espesor, o bicapa, la unidad estructural básica de las biomembranas.

hidrocarburos lineales o cíclicos que confieren a la molécula hidrofobicidad y afinidad por disolventes orgánicos no polares. Tienen pesos moleculares bajos y no forman macromoléculas como carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos.

También, como moléculas pequeñas, son una buena fuente de energía. Debido a la baja solubilidad en agua, los lípidos no circulan libremente, sino que se unen a varias proteínas, como los quilomicrones en la sangre, que tienen un peso molecular (MW) de 10⁶ a 10¹⁰ Daltons (a una concentración de 2% de proteína y alrededor del 90% de glicéridos). En las células, los lípidos circulantes se unen a transportadores específicos como la proteína de unión de la fosfatidilcolina (PC-BP: *phosphatidylcholine binding protein*), (FABP: *fatty acid binding protein*) que es la proteína de transporte de los ácidos grasos, etc.

Para otras biomoléculas resulta fácil establecer una definición desde el punto de vista químico, en el caso de los lípidos es un poco más difícil, ya que constituyen un grupo de sustancias químicamente muy heterogéneo y no se caracteriza como otras biomoléculas, por la posesión de un determinado conjunto de grupos funcionales. Por esto, resulta mucho más conveniente identificarlos sobre la base de una de sus propiedades físicas: su mayor o menor solubilidad en distintos tipos de disolventes. Dicho esto, se considera que los lípidos son un grupo de biomoléculas que se caracterizan por ser poco o nada solubles en agua y, por el contrario, muy solubles en disolventes orgánicos no polares.

Aunque químicamente son heterogéneos, todos presentan un denominador común estructural: la totalidad, o al menos una parte significativa, de su molécula es de naturaleza hidrocarbonada, y por lo tanto apolar. Esta característica estructural común es responsable de su insolubilidad en agua y de su solubilidad en solventes no polares. “Los lípidos desempeñan en las células vivas una gran variedad de funciones, entre las que destacan las de carácter energético y estructural” (Nelson y Cox, [2005]).

Los lípidos son moléculas naturales de plantas o animales que son solubles en disolventes orgánicos no polares. Las moléculas lipídicas contienen una gran porción de hidrocarburos y no muchos grupos funcionales polares, lo que explica su comportamiento de solubilidad. Los lípidos se pueden clasificar en:

Lípidos que son ésteres o amidas de ácidos grasos

- Ceras son ésteres de ácido carboxílico donde ambos grupos R son de cadena de hidrocarburos recta y larga, realiza funciones de protección externa.
- Triacilglicerol son triésteres de ácido carboxílico de glicerol y son una fuente importante de energía bioquímica.

- Glicerofosfolípidos son trímeros de gliceroles que contienen diésteres de fosfato cargados, los cuales ayudan a controlar el flujo de moléculas dentro y fuera de las células.
- Esfingomielinas son amidas derivadas de un aminoalcohol, también contienen grupos diéster de fosfato cargados. Son esenciales para la estructura de las membranas celulares.
- Glicolípidos son las amidas derivadas de la esfingosina que contienen grupos de carbohidratos polares. En la superficie celular, se conectan con mensajeros intracelulares, lípidos que no son ésteres ni amidas.
- Esteroides, realizan diversas funciones como las hormonas y contribuyen a la estructura de las membranas celulares.
- Eicosanoides son ácidos carboxílicos que son un tipo especial de mensajeros químicos intracelulares.

Tabla 1-1: Clasificación de los lípidos de acuerdo con su composición química

Lípidos simples que contienen C, H, O	Lípidos complejos que contienen C, H, O, N, P, S
Esteroides Ácidos grasos Eicosanoides Glicéridos Céridos Terpenos	Esfingolípidos Fosfolípidos

Fuente: (Sanchez Gonzalez, 2006, p. 39).

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria., 2021.

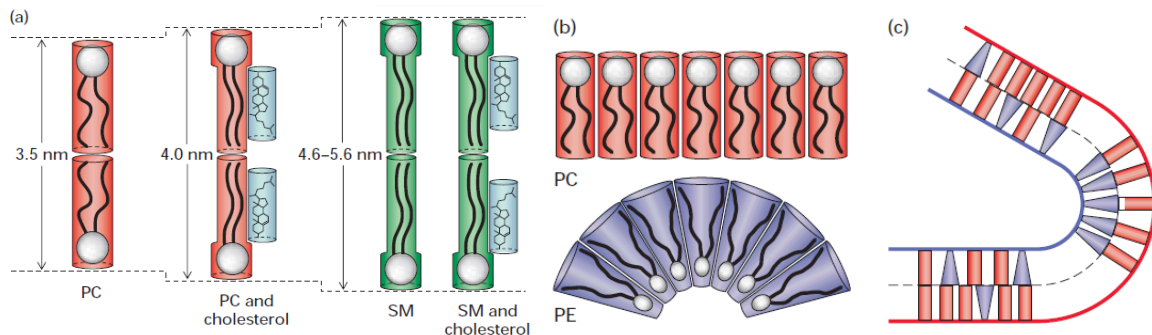


Figura 5-1: Diagrama de cómo se asocian varias clases de proteínas con la bicapa lipídica.⁵

Fuente: (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, 2000).

⁵ Las proteínas integrales (transmembrana) abarcan la bicapa. Las proteínas ancladas a los lípidos están unidas a una hoja por una larga cadena de hidrocarburos unida covalentemente. Las proteínas periféricas se asocian a la membrana principalmente mediante interacciones específicas no covalentes con las proteínas integrales o los lípidos de la membrana. Más lejos de la membrana están las proteínas asociadas a la membrana, como el citoesqueleto, la matriz extracelular en las células y la pared celular en las células vegetales y bacterianas (no representado). Las cadenas de carbohidratos están a muchas proteínas extracelulares y a los dominios a los dominios exoplásmicos de muchas proteínas transmembrana.

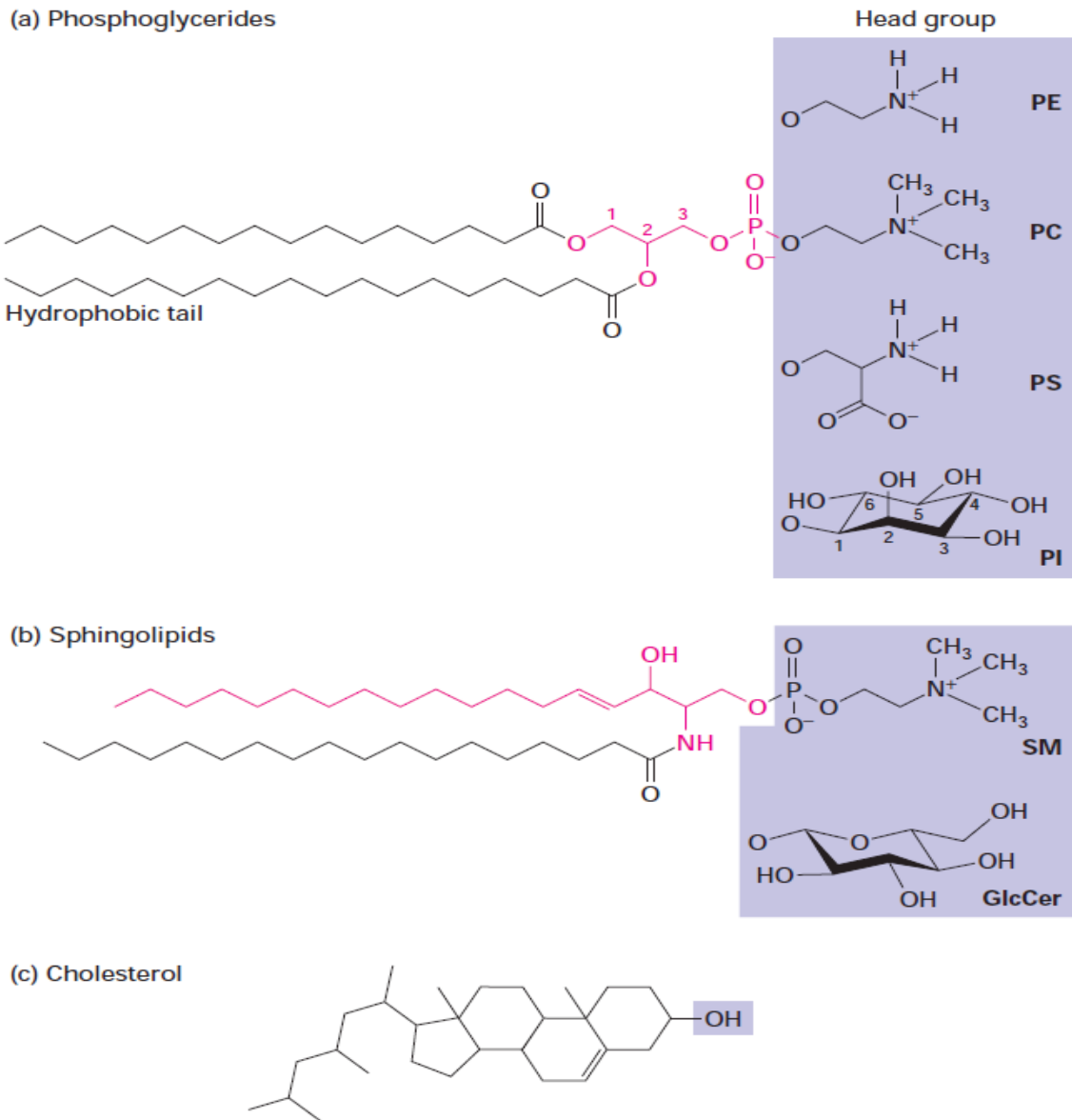


Figura 6-1: Principales lípidos presentes en las membranas celulares.⁶

Fuente: (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, 2000).

⁶ Existen tres clases de lípidos de membrana. (a) La mayoría de los fosfoglicéridos son derivados del glicerol 3-fosfato (rojo) que contienen dos cadenas de acilo graso esterificadas, que constituyen la "cola" hidrofóbica y un "grupo de cabeza" polar esterificado al fosfato. Los ácidos grasos pueden variar en longitud y ser saturados (sin dobles enlaces) o insaturados (uno, dos o tres dobles enlaces). En la fosfatidilcolina (PC), el grupo de cabeza es la colina. También se muestran las moléculas unidas al grupo fosfato en otros tres fosfoglicéridos comunes: fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) y fosfatidylinositol (PI). (b) Los esfingolípidos son derivados de la esfingosina (rojo), un aminoalcohol con una larga cadena de hidrocarburos. Varias cadenas de acilo graso están conectadas a la esfingosina por un enlace amida. Las esfingomielinas (SM), que contienen un grupo de cabeza de fosfocolina, son fosfolípidos. Otros esfingolípidos son glicolípidos en los que un único residuo de azúcar u oligosacárido ramificado está unido a la columna vertebral de la esfingosina. Por ejemplo, el glicolípidio simple glucosilcerebrósido (GlcCer) tiene un grupo principal de glucosa. (c) Al igual que otros lípidos de membrana, el colesterol esteroide es anfipático. Su único grupo hidroxilo equivale al grupo principal polar de otros lípidos; el anillo conjugado y la corta cadena de hidrocarburos forman la cola hidrofóbica.

1.5.1.3. Fosfolípidos

En el libro de *Biología celular y molecular* de (Sanchez Gonzalez, 2006, p. 41), nos dice que los fosfolípidos o fosfoglicéridos consisten en una molécula de glicerol unida a dos ácidos grasos y a un radical fosfato (ácido fosfatídico), que a su vez está unido mediante un enlace éster a un aminoalcohol como la etanolamina, la colina o la serina (también un aminoácido), o un polialcohol como es el glicerol o el inositol (Figura 6-1). Los fosfolípidos están en el grupo de los lípidos saponificables complejos, estos son lípidos que poseen en su composición un ácido graso cuya estructura molecular además de C, H y O, tienen N, P, S o un glúcido.

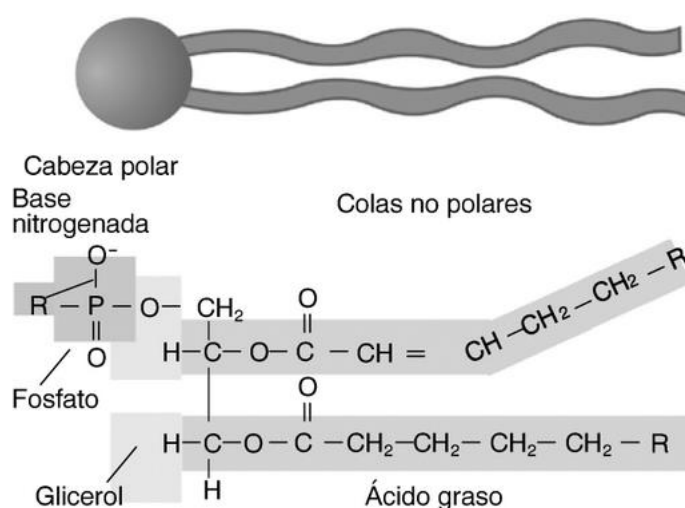


Figura 7-1: Esquema de un fosfolípido.⁷

Fuente: (Sanchez Gonzalez, 2006, p. 41).

Son las principales moléculas constitutivas de la doble capa lipídica de la membrana plasmática; por lo que se los denomina Lípidos de Membrana y también son moléculas anfipáticas, dentro de estos se encuentran: los fosfolípidos y los esfingolípidos. “Un fosfolípido está compuesto de un glicerol unido a dos ácidos grasos y a un radical fosfato que se enlaza a una base orgánica, son moléculas anfipáticas debido al doble carácter que presentan estas moléculas, ya que por un lado son hidrofílicas y por otro son hidrofóbicas” (Nelson y Cox, [2005]).

De las cuatro clases principales de moléculas que sirven como bloques de construcción para las células (azúcares, ácidos, proteínas, fosfolípidos), los fosfolípidos son los más complejos estructuralmente. Los fosfoglicéridos son los fosfolípidos más comunes; se componen de dos grupos de ácidos grasos

⁷ Su estructura química se compone de una molécula de glicerol unida a dos ácidos grasos y a un radical fosfato, que a su vez se enlaza mediante una unión éster con un aminoalcohol, como la etanolamina, la colina o la serina.

y un grupo de cabeza polar unido a un esqueleto de glicerol. La longitud y el grado de saturación de las colas del ácido graso pueden variar entre diferentes fosfolípidos. La función principal de los fosfolípidos es formar la bicapa lipídica que es característica de todas las membranas celulares. Las bicapas de fosfolípidos son selectivamente permeables a los solutos.

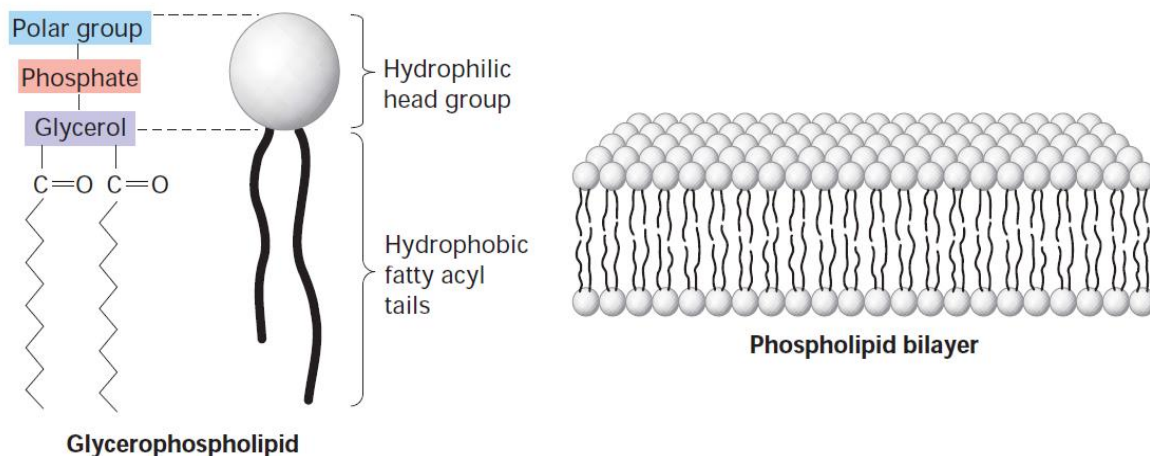


Figura 8-1: Esquema de la estructura de un fosfolípido. Los monómeros de fosfolípidos se ensamblan de forma no covalente en la estructura de bicapa, que constituye la base de todas las membranas celulares.

Fuente: (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, 2000, p. 37).

Los fosfolípidos también adquieren su diversidad estructural a través de la ramificación y la modificación química. La ramificación es tan importante para los fosfolípidos que todos los fosfolípidos están ramificados (de ahí la complejidad), y los fosfolípidos usan un tipo especial de sustancia química no vista en ninguna otra clase de bloques de construcción celular (insaturación de hidrocarburos); aquí es donde surge la mayor parte de la variación estructural.

A diferencia de los oligo/polisacáridos, los ácidos nucleicos y las proteínas, los fosfolípidos no son polímeros de estructura simple y, como resultado, son considerablemente menos diversos. De estas cuatro clases principales de moléculas, los fosfolípidos son, con mucho, los más pequeños en tamaño. El peso molecular de la mayoría de los fosfolípidos es menos de 1000 daltons, mientras que la mayoría del ADN y las proteínas tienen al menos 10 a 20 veces este tamaño (Sanchez Gonzalez, 2006).

Se estima que las células eucariotas contienen ~1000 lípidos diferentes (aproximadamente una décima parte del número de genes y proteínas diferentes), incluidos solo unos 20 diferentes fosfolípidos. La razón de este número relativamente pequeño es que los fosfolípidos realizan muchas menos funciones únicas que los otros bloques de construcción celulares. “Esto no significa que estas funciones son menos importantes: los fosfolípidos son ingredientes absolutamente esenciales en cualquier membrana celular” (Nelson y Cox, [2005]).

Tabla 2-1: Fosfolípidos más frecuentes en las membranas celulares

Membranas Eucariotas	Membranas Procariotas
Fosfatidilcolina	Fosfatidiletanolamina
Fosfatidiletanolamina	Fosfatidilglicerol
Fosfatidilserina	Cardiolipina
Fosfatidilinositol	Glucolípidos #
Cardiolipina	Glucosfosfolípidos #
Esfingomielina*	

* En lugar de glicerol presenta D-4-esfingenina. # Bacterias Gram positivas

Fuente: (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, 2000).

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria, 2021.

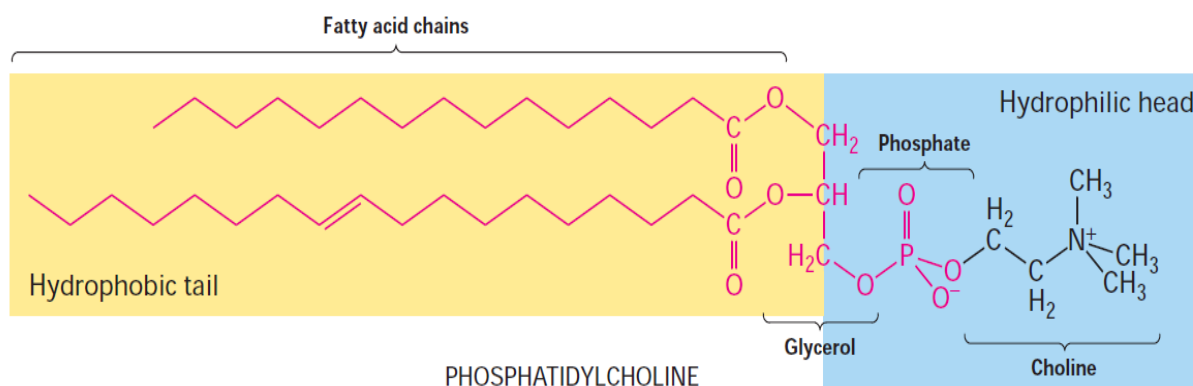


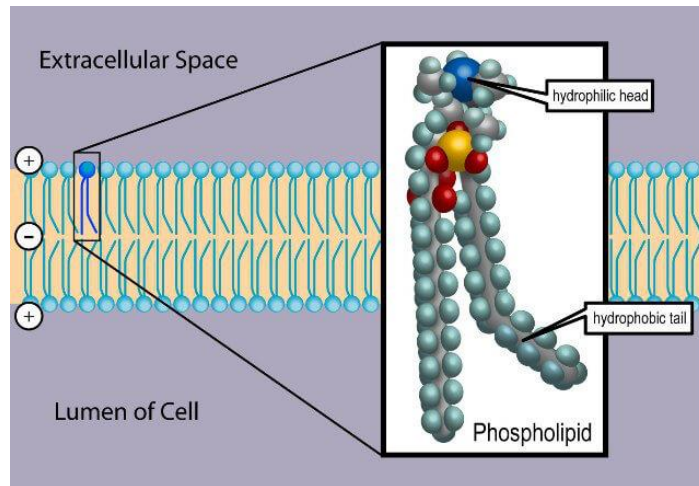
Figura 9-1: La fosfatidilcolina, un fosfoglicérido típico.⁸

Fuente: (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, 2000, p. 44).

(Sanchez Gonzalez, 2006, p. 41) menciona que los ácidos grasos dan hidrofobicidad a estas moléculas, mientras que las bases orgánicas y los ácidos fosfóricos son muy hidrofílicos, por lo que estas moléculas también son anfipáticas. La naturaleza anfipática de estas moléculas lipídicas y su forma les da una cierta configuración (micelas) en presencia de agua, ya que los extremos hidrófilos solubles en agua giran hacia afuera, interactuando con el agua circundante.

Los extremos hidrofóbicos están orientados en dirección opuesta. La membrana celular es una bicapa lipídica, es decir, 2 capas de fosfolípidos con el extremo hidrofóbico de la molécula hacia el centro (colas) y el extremo hidrofílico hacia el exterior (cabezas). Los fosfolípidos tienen funciones estructurales como componentes de la biomembrana y mensajeros intracelulares, como la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina, el fosfatidilinositol, etc. El más común está compuesto por glicerol esterificado con ácidos grasos y grupos fosfato.

⁸ Todos los fosfoglicéridos son anfipáticos, ya que tienen una cola hidrofóbica (amarilla) y una cabeza hidrofílica (azul) en la que el glicerol está unido mediante un grupo fosfato a un alcohol. Cualquiera de las cadenas laterales de los ácidos grasos de un fosfoglicérido, o ambas, pueden estar saturadas o insaturadas. En el ácido fosfatídico (rojo), el fosfolípido más sencillo fosfolípido más simple, el fosfato no está unido a un alcohol.



(a) Membrane bilayer

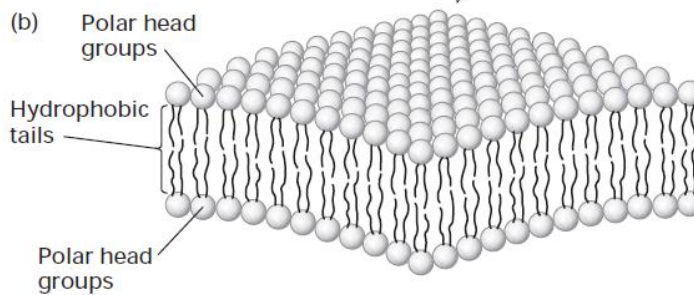
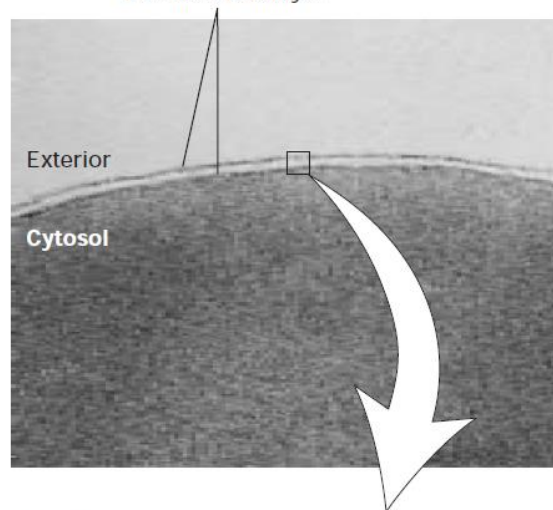


Figura 10-1: Primera figura: Esquema de un fosfolípido en una membrana. Segunda figura: La estructura de bicapa de las biomembranas.⁹

Fuente: (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, 2000, p. 148).

⁹ (a) Micrografía electrónica de una sección fina de una membrana de eritrocito teñida con tetróxido de osmio. El aspecto característico de "vía férrea" de la membrana indica la presencia de dos capas polares, lo que concuerda con la estructura de bicapa de las membranas fosfolípídicas. (b) Interpretación esquemática de la bicapa de fosfolípidos en la que los grupos polares se orientan hacia el exterior para proteger las colas de acilo graso hidrofóbicas del agua. El efecto hidrofóbico y las interacciones de Van der Waals entre las colas de acilo graso impulsan el ensamblaje de la bicapa.

1.5.1.4. Lipoplejos

Los lipoplejos son aquellos complejos que forman los liposomas de manera espontánea con el ADN. Estos se producen a través de una simple interacción entre los ácidos nucleicos y diferentes lípidos. Tres tipos de lípidos generalmente se seleccionan para completar el material genético: el aniónico, por ejemplo, hemisuccinato de colesterilo (CHEMS), neutro; p. ej., 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) y colesterol (Chol) y catiónico, p. ej., N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio cloruro (DOTMA) o lipofectina, N-[1-(2,3-dioleiloxi)]- N,N,N-trimetilamonio propano metilsulfato (DOTAP), (+)-N,N-dimetil-N-[2-(esperminacarboxamido)etil]-Pentahidrocloruro de 2,3-bis(dioleiloxi)-1-propaniminio (DOSPA) o lipofectamina, 1,3-di-oleoiloxi-2-(6-carboxispermil)-propilamida (DOSPER) y oligofectamina lípidos (Amir Al-Ahmed, 2014).

La carga final del lipoplejo, probablemente es uno de los factores más importantes que afectan la estabilidad de los lipoplejos y la eficiencia de transfección depende de la relación entre el vector lipídico con diferente carga y las moléculas de ácido nucleico. Además de su carga y composición, el tamaño y la morfología de los lipoplejos también afectan enormemente su actividad de transfección. Los lipoplejos entran en las células a través de dos mecanismos principales, en la mayoría de los casos por endocitosis y un bajo porcentaje de los casos por fusión directa con la membrana celular (Arbuthnot, 2015).

Las vías de captación de los lipoplejos dependen del tipo de lípido utilizado y el tipo de material genético que se entregue. Como ejemplo, se ha demostrado que se produce la captación de lipoplejos DOTAP/DNA a través de la endocitosis mediada por clatrina. Además, la absorción de ADN plasmídico unido a otro lípido catiónico, el bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE-C), se produce a través de la vía de la caveolina. Para los siRNA sintéticos, se informó un mecanismo diferente. Se informó que el 95% de los lipoplejos de siRNA entran a las células por endocitosis, la entrega de siRNA funcional ocurre a través de vías simples que involucran la fusión de los lipoplejos de siRNA y la membrana plasmática. “Estos resultados se basan en el hecho de que cuando se inhibe la captación mediada por clatrina, caveolina o macro pinocitosis, hay caída de la proteína” (Rafael et al., [2015]).

Según (Arbuthnot, 2015) los vectores no virales (NVV) derivados de lípidos ahora se usan ampliamente y fueron las primeras especies en ser descritas. En un estudio de 1980, Farley y sus colegas demostraron que era posible introducir ADN viral SV40 en células de riñón cultivadas. Este estudio describe el uso de fosfatidilserina en la formación de vesículas con un diámetro promedio de 0,4 μm . El uso de estas partículas para entregar ADN a las células puede iniciar la replicación de SV40. Otra observación importante es que el ADN de la envoltura es resistente a la degradación de la ADNasa.

Este descubrimiento fundamental condujo al desarrollo de los lipoplejos NV, que posteriormente acuñaron el término "esteatosis" para describir la transfección de los transportadores de lípidos.



Figura 11-1: Mecanismo de formación de los lipoplejos.

Fuente: (Ana Isabel Torres Suárez [2019]).

➤ Lipoplejos catiónicos

El estudio de los lipoplejos catiónicos como sistema portador de genes fue iniciado a fines de la década de los 80 por Felgner y col. El mecanismo de interacción del ADN con los liposomas catiónicos determina sus aplicaciones clínicas y biológicas. Este proceso de formación del complejo, formado por liposomas catiónicos y ADN, se debe fundamentalmente a la atracción electrostática entre cargas opuestas de los dos componentes. La morfología óptima de los lipoplejos catiónicos depende de la elasticidad y carga superficial de la membrana o bicapa liposómica, “la cual está relacionada a su vez con la naturaleza de su carga, concentración y composición lipídica (mezcla de lípidos catiónicos y zwitteriónicos), el pH, temperatura, y la fuerza iónica del medio” (Universidad de Granada; 2019).

Los lipoplejos a base de lípidos catiónicos, son elementos más estables, “para su preparación se requieren compuestos que presenten, por un extremo, un grupo extremadamente polar y por el otro una pareja de ácidos grasos (por ejemplo, colesterol)” (Fructuoso et al., [2018]). Cuando se hidratan, estos compuestos catiónicos pueden formar complejos con esta molécula polianiónica para formar vesículas de doble membrana, los grupos polares se encuentran en el exterior y el interior y se unen al ADN. La posterior mezcla de estas estructuras coloidales con ADN permite la formación de un complejo denominado lipoplejo, con el que se consigue condensar, compactar y proteger el material génico.

La estructura del complejo lipídico facilita la fusión de las dos estructuras cuando el liposoma está en contacto con la célula y el contenido del liposoma se descarga directamente en el citoplasma. Entre los vectores no virales, los complejos lipídicos son las alternativas más prometedoras en la terapia

génica. Han logrado cuatro objetivos muy importantes como transportistas: “protección de la degradación por DNAsas y condensación del ADN; mediar en la adhesión celular al superar la polaridad generalmente negativa de la mayoría de las superficies celulares; y facilitar la localización intracitoplasmática de la molécula de ADN (Fructuoso et al., [2018])”. Sin embargo, los defectos en la formación de complejos lipídicos y la exposición a los ácidos nucleicos pueden conducir a la agregación, lo que conduce a una baja eficiencia de transfección.

“Los lipoplejos a base de lípidos catiónicos poseen mecanismos de disrupción endosomal que facilitan la liberación del ADN en el citosol tras la endocitosis (Fructuoso et al., [2018])”. Otros autores han concluido que “tanto la línea celular como el tipo de polímero y formulación utilizada, influyen en la expresión génica del vector administrado (Delgado et al., [2012])”. En cuanto a la toxicidad de los complejos de polietilenimina (PEI), intervienen varios parámetros como el peso molecular y el grado de ramificación del polímero, así como el tamaño y la carga superficial de la formulación. Se ha llevado a cabo experimentos que muestran que estos complejos son altamente tóxicos.

➤ Lipoplejos aniónicos

Los liposomas aniónicos que forman complejos con el ADN se denominan lipoplejos aniónicos. Estos complejos representan los vehículos de transfección no víricos más utilizados en terapia génica. El estudio de los lipoplejos aniónicos como sistema transportador de genes se inició a fines de la década de los 80 por Felgner y col. Los lipoplejos aniónicos, que son componentes naturales de las membranas de las células eucariotas, han sido estudiados debido a que presentan alta eficiencia en la transfección y baja toxicidad, por lo que surgió su formación y estudio como una alternativa a los lipoplejos catiónicos.

“Son componentes naturales de la membrana de las células eucariotas; la formación de complejos con el ADN surge como una alternativa a la formación de los lipoplejos catiónicos, principalmente por su baja toxicidad y alta eficacia de transfección, sin embargo, su uso es aún muy escaso” (Rodríguez, C., 2013). Las aplicaciones de los lipoplejos aniónicos son limitadas porque se requieren mediadores para que se atraigan y formen complejos, uno de los mediadores son los cationes multivalentes como el Ca^{2+} por su baja toxicidad. La formación de lipoplejos tanto aniónicos como catiónicos y su uso en modalidades terapéuticas o clínicas depende fundamentalmente de la caracterización de dichos complejos y su reacción con el ADN.

1.5.2. Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

Los ácidos nucleicos son los portadores de la información genética celular y existen dos tipos de ácidos nucleicos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). “Como resultado de la síntesis de muchos datos publicados, Watson y Crick propusieron que el ADN nativo consiste en dos cadenas antiparalelas dispuestas en forma de doble hélice dextrógira” (Illana, 2014). Su diferencia química consiste en la existencia de desoxirribosa o ribosa, respectivamente, ambos son azúcares son de cinco carbonos, aunque el primero tiene un oxígeno menos en el carbono 2 de la estructura cíclica de estos compuestos.

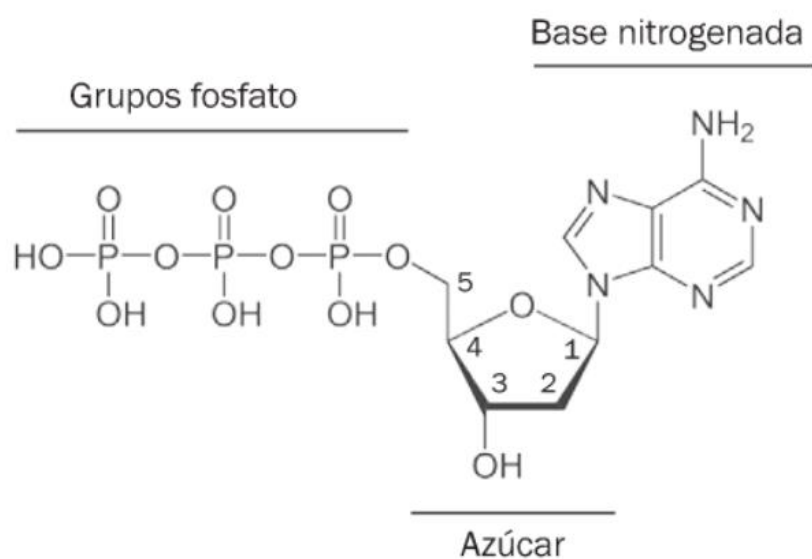


Figura 12-1: Esquema de los grupos fosfato, el azúcar y la base nitrogenada, los cuales en este caso corresponden a la adenina. Los carbonos que contiene el azúcar están enumerados según el orden que propuso Alexander Todd.

Fuente: (Gallardo y Van Wely, 2019, p. 31).

El ADN es el constituyente de los genes y por ello, es el portador de la información genética. Con la replicación del ADN durante el proceso celular los caracteres genéticos se transmiten a las células descendientes creando cadenas de ADN estructurales que son complementarias a la estructura original, esto puede producir cadenas de ADN duplicadas en células hijas, similares a las parentales de la célula original. “Algunos virus utilizan ARN como material genético, aunque no es lo habitual y en estos casos el ARN forma una única cadena” (Illana, 2014).

Una molécula de ADN es un polímero formado por enlaces covalentes de miles de desoxinucleótidos, este desoxinucleótido es conocido como la unidad estructural del ADN, contiene un grupo fosfato,

una pentosa o azúcar de 5 carbonos y una base nitrogenada. “El ADN posee 4 bases nitrogenadas: adenina (A) y guanina (G), las cuales se derivan de la purina, y citosina (C) y timina (T), que se derivan de la pirimidina” (Illana, 2014). Los pares de bases son complementarios A=T y G=C y se forman mediante los enlaces de puentes de hidrógeno dentro de la hélice, además están apiladas perpendicularmente al eje mayor de la doble hélice, separados por 3,4 °A y con 10,5 pares de bases por vuelta.

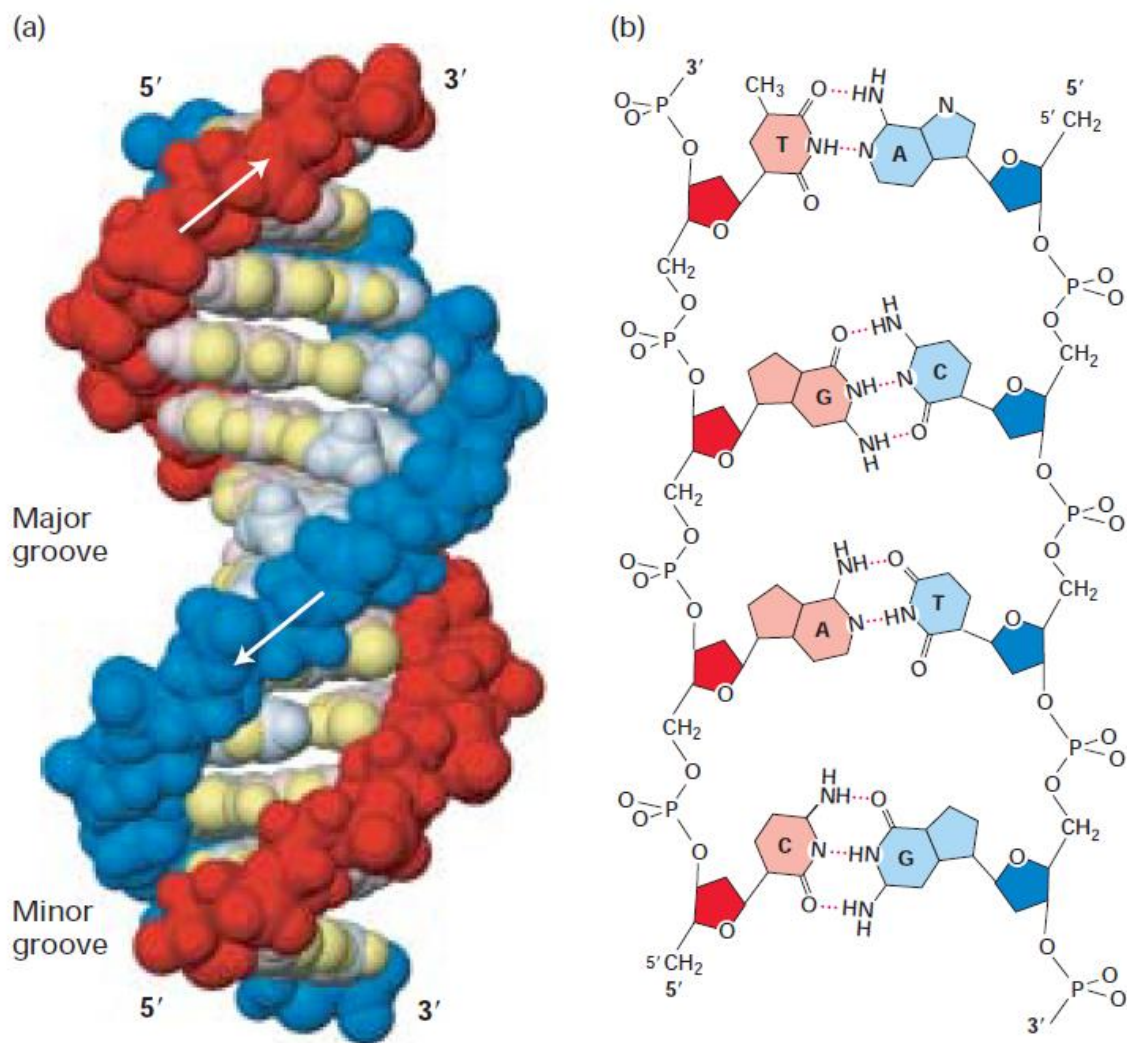


Figura 13-1: Molécula de ADN, la doble hélice del ADN.¹⁰

Fuente: (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, 2000, p. 104).

¹⁰ (a) Modelo de llenado de espacio del ADN B, la forma más común de ADN en las células. Las bases (tonos claros) se proyectan hacia el interior desde las columnas vertebrales de azúcar-fosfato (rojo oscuro y azul) de cada hebra, pero sus bordes son accesibles a través de surcos mayores y menores. Las flechas indican la dirección 5'n3' de cada cadena. Los enlaces de hidrógeno entre las bases están en el centro de la estructura. Los surcos mayor y menor están bordeados por potenciales donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno (resaltados en amarillo). (b) Estructura química de la doble hélice del ADN. Este esquema ampliado muestra las dos columnas vertebrales de azúcar-fosfato y el enlace de hidrógeno entre los pares de bases Watson-Crick, AT y GC.

1.5.3. Física Computacional

La Física Computacional es una modalidad de investigación en la Física que se añade al método científico tradicional, basado en la realización de experimentos. La enorme potencia computacional de que se dispone hoy en día nos permite simular, mediante cálculos en un ordenador, el comportamiento de diversos tipos de sistemas físicos, lo que nos permite estudiarlos sin necesidad de realizar experimentos reales, muy costosos y complicados, a veces sencillamente imposibles de realizar en la práctica, sino solamente experimentos virtuales.

1.5.3.1. Dinámica Molecular (DM)

Para hablar de visión molecular, debe ser referenciado el término de Dinámica Molecular (DM) o *Molecular Dynamic* (MD), que es un tipo de simulación computacional molecular la cual permite el análisis del comportamiento o el desarrollo de un sistema, este puede ser físico, químico o biológico, a través del tiempo y calcular mediante las ecuaciones de movimiento de Newton las fuerzas entre los átomos que lo conforman. En el nivel de operación, es un método para crear la trayectoria de un sistema formado de N partículas obtenidas a partir de integración numérica directa de las ecuaciones de movimiento de Newton, con las especificaciones de un potencial de interacción interatómico con adecuadas condiciones iniciales y de frontera.

DM es una manera de modelar y simular a nivel atomístico un sistema de estudio, el cual puede constituirse por partículas atómicas. Mediante DM, diferentes propiedades fisicoquímicas del sistema como la energía libre, entropía, solubilidad, viscosidad, presión y temperatura de cambio de fase se pueden calcular. En sistemas biológicos, permite medir la fuerza de interacción entre posibles fármacos y sus dianas biomoleculares o receptores, incluso describir el comportamiento de una proteína y moléculas complejas bajo ciertas condiciones. Las ecuaciones de movimiento no describen un sistema a nivel cuántico (lo cual requeriría una capacidad de cálculo extremadamente grande), “este tipo de estudios han mostrado buena correlación con resultados experimentales, y se pueden realizar con equipos de cómputo ciertamente convencionales, pero que cumplan ciertas especificaciones técnicas” (Andrade, 2018).

1.5.4. Softwares

El entorno de la información está cambiando, formas vertiginosas, no sólo en el mundo científico, afecta a todos los órdenes de la vida y por lo tanto también en el campo de la ciencia e investigación. La nueva tecnología puede facilitar la implementación poner en práctica ideas de vanguardia, teniendo en cuenta que con ello la enseñanza es la misma que antes, pero de una manera diferente, más eficiente. La tecnología es un enfoque sistemático para diseñar, implementar y evaluar todos los procesos de aprendizaje y enseñanza basados en el estudio del aprendizaje y la comunicación humana, combinando recursos humanos y materiales, de acuerdo con objetivos específicos, para un aprendizaje más eficaz llevando a la reflexión sobre la importancia.

El uso de la tecnología en todos los campos del desarrollo social, incluyendo el campo de la investigación, no puede en ningún concepto mantenerse al margen del progreso de los tiempos. Los últimos años del siglo XX y los años transcurridos del siglo XXI han mostrado una explosión de interés a nivel mundial por el uso de las tecnologías de la información y la comunicación (TIC) en la enseñanza de las ciencias de precisión. Proporcionar información estructurada a investigadores y usuarios simulando fenómenos y brindando un contexto trabajo más o menos ambientalmente sensible, posibilidades interactivas más o menos ricas, pero todas comparten características básicas: son materiales preparados con fines de investigación, utilizando software como soporte para facilitar y acelerar las investigaciones pertinentes.

En el campo de la física se han desarrollado herramientas tecnológicas que sirven para simular procesos físicos, algunos de estos son utilizados para uso didáctico y otros para facilitar procesos de investigación. Estas herramientas tienen el nombre genérico de applets o miniaplicaciones. Algunos de ellos permiten la manipulación de parámetros para analizar los posibles resultados del proceso que se está estudiando. Las herramientas posibilitan diferentes dimensiones de estudio: ecuaciones, gráficos, diagramas, construcción de tablas entre otros. Dichas herramientas han facilitado el avance de la Física que es una ciencia experimental y por ello requiere de forma imprescindible realizar en laboratorio estudios reales, en este aspecto las herramientas tecnológicas aportan mucho.

El software diseñado para la física amplía la capacidad de cálculo y las posibilidades gráficas y esto amplía el espectro de estudio de los fenómenos físicos. “Algunas de las aplicaciones que ya se encuentran en fase avanzada son: acelerómetro (inercial y no inercial), inclinómetro, termómetro (temperatura ambiental), barómetro, higrómetro, altímetro, luxómetro, gaussímetro, sonómetro, sonoscopio, generador de señales, espectrómetro, video tracker, regresión lineal, regresión cuadrática” (Andrade, 2018). Adicionalmente ya existe un software especializado en adquisición de datos, gráficos y análisis con aplicaciones más amplias.

1.5.4.1. GROMACS

“Gromacs (*GRO*ningen *M*achine for *C*hemical *S*imulations) es un paquete computacional creado para su uso en Dinámica Molecular (DM)” (Samaniego Andrade, 2015). En principio fue desarrollado para simular sistemas bioquímicos conformados por moléculas como: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que presentan gran cantidad de interacciones enlazantes complicadas, pero debido a que este programa es sumamente rápido para el cálculo de interacciones no enlazantes, que generalmente son las que predominan en las simulaciones, su uso también se popularizó en la investigación de materiales como los polímeros.

Está diseñado principalmente para moléculas bioquímicas como las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos, que tienen muchas y complicadas interacciones enlazadas, pero como GROMACS es extremadamente rápido en el cálculo de las interacciones no enlazadas (que suelen dominar las simulaciones), muchos grupos lo utilizan también para la investigación de sistemas no biológicos, por ejemplo, los polímeros. Soporta todos los algoritmos habituales que se esperan de una implementación moderna de dinámica molecular, (consulte la referencia en línea o el manual para más detalles), pero también hay bastantes características tomadas de (Baez-Castillo, 2013) que lo hacen destacar de la competencia:

- Fácil de usar, con topologías y archivos de parámetros escritos en formato de texto claro. Hay muchas comprobaciones de consistencia, y se emiten mensajes de error claros cuando algo está mal. Como se utiliza un preprocesador C, puedes tener partes condicionales en tus topologías e incluir otros archivos. Incluso puede comprimir la mayoría de los archivos y GROMACS los canalizará automáticamente a través de gzip al leerlos.
- No hay lenguaje de scripting, todos los programas utilizan una interfaz simple con opciones de línea de comandos para los archivos de entrada y salida. Siempre se puede obtener ayuda sobre las opciones utilizando la opción -h, o utilizar los extensos manuales proporcionados gratuitamente en formato electrónico o en papel.
- Este software ayuda al modelado molecular, el cual es el proceso general de describir sistemas químicos complejos en términos de un modelo atómico realista, con el objetivo de comprender y predecir propiedades macroscópicas basadas en conocimientos detallados a escala atómica. A menudo, el modelado molecular se utiliza para diseñar nuevos materiales, para los cuales se requiere la predicción precisa de la física y GROMACS ofrece propiedades de sistemas realistas, como también propiedades físicas macroscópicas que pueden distinguir equilibrio estático, como

la constante de unión de un inhibidor a una enzima, la energía potencial promedio de un sistema, o la función de distribución radial de un líquido.

- Adicionalmente, en esta herramienta se pueden estudiar las propiedades dinámicas o de no equilibrio, como la viscosidad de un líquido, los procesos de difusión en las membranas, la dinámica de los cambios de fase cinética de reacción, o la dinámica de los defectos en los cristales.
- La elección de la técnica depende de la pregunta planteada y sobre la viabilidad del método para producir resultados fiables en el estado actual del arte. Idealmente, la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo (relativista) describe las propiedades de sistemas moleculares con alta precisión, pero cualquier cosa más compleja que el estado de equilibrio de pocos átomos no puede manejarse en este nivel ab initio.

Por lo tanto, las aproximaciones son necesarias; a sistemas complejos y a procesos de interés. En cierto punto el enfoque ab initio debe ser aumentado o reemplazado por parametrización empírica del modelo utilizado. Donde las simulaciones basadas en principios físicos de interacciones atómicas todavía fallan debido a la complejidad del sistema, el modelado molecular se basa completamente en una similitud de análisis de datos estructurales y químicos conocidos. Los métodos QSAR (*Quantitative Structure Activity Relations*) y muchas predicciones de estructuras de proteínas basadas en la homología pertenecen a esta última categoría.

La dinámica molecular (DM) ha ampliado enormemente el alcance de la química y de otros campos al proporcionar una resolución espacial y temporal que no está disponible en los experimentos. Las simulaciones se han vuelto más precisas con mejores campos de fuerza, muestrean fácilmente los movimientos moleculares en la escala de microsegundos (μs), y las técnicas de ensamblaje hacen posible el estudio de procesos a escala de milisegundos (ms), como el plegado de proteínas. Un usuario típico de DM elige una configuración molecular inicial, describe las interacciones atómicas y la física del modelo, ejecuta una simulación y realiza observaciones a partir de la trayectoria.

Estas simulaciones evalúan los millones de interacciones de las partículas durante miles de millones de pasos de tiempo, lo que puede requerir cantidades extraordinarias de hardware computacional y tiempo: la calidad científica del resultado suele ser proporcional a la cantidad de muestreo. El objetivo de GROMACS es proporcionar el mayor rendimiento y eficiencia absolutos posibles en cualquier hardware, de modo que tanto el rendimiento máximo alcanzable como el del mundo real sean elevados, para aprovechar al máximo los escasos recursos. El paquete funciona con rapidez en todas las arquitecturas presentes en la lista de superordenadores Top500, así como en sistemas integrados y ordenadores portátiles de uso corriente.

A diferencia de muchos otros retos computacionales, las aplicaciones en MD suelen tener un tamaño de problema intrínsecamente fijo. Cuando se estudia un sistema de proteínas con 30.000 átomos, no es relevante que un virus compuesto por 10 millones de átomos escale mejor. Por lo tanto, un rendimiento de escalado débil no suele ser una preocupación primordial. Sin embargo, es muy importante reducir la cantidad de tiempo de computación por unidad de simulación mediante la optimización, o mejorando el escalado fuerte. Esto mejora el "tiempo hasta la solución", y también la eficiencia, medida como la ciencia realizada por cantidad de hardware o energía consumida. Aunque algunas aplicaciones necesitan largas trayectorias individuales, también hay muchas preguntas científicas que pueden responderse utilizando varias trayectorias, y para éstas la eficiencia global será mayor ejecutando simulaciones independientes en paralelo.

El fuerte escalado de la MD es un reto de ingeniería de software muy difícil que requiere la sincronización de las fases de cálculo, coordinación y comunicación hasta 100 μ s para cientos de miles de núcleos. Los avances del hardware han sido impresionantes, pero la reingeniería del software para utilizar las nuevas capacidades ha sido muy desafiante, e incluso nos obliga a reconsiderar algunos de los conceptos más fundamentales de la DM, incluyendo las listas de vecinos utilizadas para rastrear las interacciones espaciales.

Admite simulaciones con Verlet de salto, Verlet de velocidad, dinámica browniana y estocástica, así como cálculos que hacen la minimización de la energía, el análisis de modo normal y el recocido simulado. Posee varias técnicas disponibles para regular la temperatura y/o la presión. Tanto SHAKE como P-LINCS están disponibles para hacer cumplir las restricciones holonómicas, y este último puede combinarse con sitios de interacción virtual para eliminar suficientes grados de libertad rápidos para permitir pasos de tiempo de 5 fs (femtosegundos). Todos los campos de fuerza de mecánica molecular pueden ser ampliamente utilizados.

1.5.4.2. GNUPLOT

GNUPLOT es un programa que se utiliza para representar gráficamente funciones y superficies, todas ellas definidas por sus expresiones analíticas y un conjunto de datos o puntos en un plano o espacio. Le permite dibujar el contorno de una función, usar diferentes sistemas de coordenadas y manipular archivos de datos con diferentes estructuras. También te permite ver gráficos en la pantalla de la computadora, imprimirlos en una impresora o crear archivos especiales para luego volcarlos a una impresora o trazador o usarlos desde un procesador de texto como TEX o LATEX. Gnuplot es un software gratuito, lo que significa que cualquiera puede utilizarlo y distribuirlo de forma gratuita.

“Está disponible para casi todas las plataformas, la primera versión data de 1986, la última versión es la 4.0, GNUPLOT funciona mediante comandos, que pueden usarse tanto en modo interactivo como escribiendo scripts (secuencia de comandos escritos en un fichero) («Universidad de Sevilla.», 2019)”. Es bastante flexible y sorprendentemente potente. Puede graficar funciones en 2 y 3 dimensiones definidas por el usuario, también tiene una amplia gama de funciones incorporadas, que cubren la trigonometría, como es de esperar, pero que también se extienden a funciones de Bessel, la función gamma, la función de error (erf) y muchas otras. Puede trazar datos en 2 y 3 dimensiones y los datos pueden leerse en formato ASCII o en formato binario.

La representación gráfica de funciones matemáticas permite el análisis de dependencias entre variables de una forma más sencilla que las propias expresiones matemáticas, de forma similar a diferencia de lo que ocurre en los datos experimentales, un conjunto de datos tabulares no proporciona fácilmente dependencias entre variables, no lo hace. Lo mismo ocurre con los gráficos, que permiten el análisis de diversas formas, dado que permite especificar el diseño del archivo de datos, puede acomodar muchos formatos de archivo diferentes, es multiplataforma (Linux, Windows y OS X), y es gratuito y de código abierto.

Está basado en texto, se interactúa con él a través de una sintaxis similar a la de la línea de comandos, a diferencia de la manipulación de gráficos mediante el ratón de forma WYSIWYG. Cuando se introduce un comando completo, el gráfico resultante aparece inmediatamente en una ventana separada. Esto contrasta con un lenguaje de programación de gráficos (como PIC), en el que escribir el comando, generar el gráfico y ver el resultado son actividades separadas, que requieren herramientas distintas. Cuenta con una función de historial, que facilita la recuperación, modificación y reemisión de comandos anteriores. Toda la configuración le anima a jugar con los datos: hacer un gráfico simple, cambiar algunos parámetros para afinar en las secciones interesantes, eventualmente añadir decoraciones y etiquetas para la presentación final, y al final exportar el gráfico terminado en un formato gráfico estándar.

1.5.4.3. *Visión Dinámica Molecular (VDM)*

Visión Dinámica Molecular (VDM) o *Visual Molecular Dynamics (VMD)*, es la abreviatura de uno de los más poderosos paquetes de visualización de estructuras moleculares, es distribuido bajo la afiliación de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign. Este software puede ser utilizado en varias áreas de las ciencias computacionales como la ciencia de los materiales, la química y la bioquímica. El VMD tiene muchas características únicas como, puede tratar con grandes estructuras poliméricas y biomoleculares y tiene características de representación de alta resolución que lo hace

adecuado para la visualización de alta resolución y también puede ser utilizado con instalaciones de supercomputación de alto rendimiento para mejorar la visualización rendimiento de los resultados de la simulación de diánimos moleculares extragrandes utilizando técnicas de visualización (Yarmand, 2018).

De acuerdo con la documentación original de VMD, las principales características de VMD incluyen:

- Visualización de la estructura molecular tridimensional mediante la utilización de estilos de dibujo molecular y coloración de los resultados de la simulación de la dinámica molecular.
- VMD puede soportar una amplia gama de formatos de archivos de salida de la dinámica molecular y no hay límite para el tamaño de las estructuras o trayectorias moleculares.
- El usuario define la selección atómica de una gran estructura molecular para analizar y visualizar regiones específicas de toda la estructura de datos.
- El VMD puede utilizarse para visualizar datos volumétricos como la posición, el desplazamiento y la velocidad de los átomos en las estructuras moleculares.
- Renderizando estructuras de datos de alta resolución para tener una mejor comprensión de la estructura y trayectorias moleculares.
- VMD tiene muchas características de análisis de datos estadísticos para ayudar a los usuarios a extraer información científica útil.
- VMD tiene una poderosa herramienta para hacer películas y animaciones a partir de datos moleculares resultados de la dinámica.
- VMD puede utilizarse como un software de preprocesamiento para preparar archivos de entrada para paquetes de dinámica molecular como NAMD, LAMMPS y GROMACS.
- VMD acepta los lenguajes de scripts de programming Python y Tcl para crear filtro de visualización programable definido por el usuario.
- VMD acepta códigos de fuente de programación C/C++ para crear un filtro de visualización definido por el usuario. filtro de visualización programable.

1.5.4.4. Modelo de Grano Grueso (Dimensión)

El uso de modelos de grano grueso (CG) en una variedad de técnicas de simulación ha demostrado ser una herramienta valiosa para sondear las escalas de tiempo y longitud de los sistemas más allá de lo que es factible con los modelos tradicionales de todos los átomos. Las aplicaciones a los sistemas de lípidos en particular, de las que fue pionero Smith, se han utilizado ampliamente. Se dispone de una gran diversidad de enfoques de granulación gruesa; van desde modelos cualitativos, sin

disolventes, pasando por modelos más realistas con agua explícita pero simplificada, hasta modelos que incluyen la especificidad química.

“Los modelos de esta última categoría suelen estar parametrizados sobre la base de la comparación con las simulaciones atomísticas, utilizando esquemas de Monte Carlo invertidos o enfoques de equiparación de fuerzas” (Marrink et al., 2007a). Nuestro propio modelo también se ha desarrollado en estrecha conexión con modelos atomísticos más detallados; sin embargo, la filosofía de nuestro enfoque de grano grueso es diferente. En lugar de centrarnos en una reproducción exacta de los detalles estructurales en un punto de estado concreto para un sistema específico, aspiramos a una gama más amplia de aplicaciones sin la necesidad de volver a parametrizar el modelo cada vez.

Lo hacemos mediante una amplia calibración de los bloques de construcción del campo de fuerza de grano grueso frente a los datos termodinámicos, en particular los coeficientes de reparto de aceite/agua. Esto es similar en espíritu al reciente desarrollo del campo de fuerza GROMOS. “Procesos como el auto ensamblado de lípidos, la unión de la membrana peptídica o el reconocimiento de proteínas dependen críticamente del grado en que los componentes se dividen entre los ambientes polares y no polares” (Johansson, 2013). Usar una estrategia consistente para desarrollar campos de fuerza de nivel atómico de grano grueso compatibles es más importante para su uso previsto en aplicaciones de múltiples escalas.

➤ Modelo de Martini

El campo de fuerza de Martini es un campo de fuerza de grano grueso (CG) adecuado para simulaciones de dinámica molecular de sistemas biomoleculares. El campo de fuerza es parametrizado de forma sistemática, combinando estrategias de arriba abajo y de abajo arriba: las interacciones no enlazadas se basan en la reproducción de energías libres de partición experimental entre las fases polar y apolar de un gran número de compuestos químicos, mientras que las interacciones enlazadas se derivan de simulaciones de referencia de todos los átomos. El modelo utiliza una cartografía de cuatro a uno, es decir, en promedio cuatro átomos pesados y los hidrógenos asociados están representados por un solo centro de interacción.

Para simplificar el modelo, sólo se identifican cuatro tipos principales de sitios de interacción: polares, no polares, apolares y cargados. “Cada tipo de partícula tiene un número de subtipos, que permiten una representación precisa de la naturaleza química de la estructura atomística subyacente” (Marrink et al., 2007a). Ejemplos de mapeo de Martini de moléculas seleccionadas: (A) Partícula de agua estándar que representa cuatro moléculas de agua, (B) Molécula de agua polarizable con cargas

incrustadas, (C) Lípido DMPC, (D) Fragmento de polisacárido, (E) Péptido, (F) Fragmento de ADN, (G) Fragmento de poliestireno, (H) Molécula de fullereno.

En todos los casos las cuentas CG de Martini se muestran como cuentas transparentes de cian que se superponen a la estructura atómica. Actualmente se dispone de topologías para muchos lípidos y moléculas de surfactantes, incluyendo el colesterol, y para todos los aminoácidos, así como para una variedad de azúcares, polímeros y nanopartículas. “Además, se dispone de escrituras para construir topologías para péptidos y proteínas arbitrarias, para añadir redes elásticas y para moverse entre representaciones de grano grueso y atomísticas” (Uusitalo et al., 2017) (Marrink et al., 2007a).

Este es un modelo desarrollado recientemente que permite la simulación mesoscópica de múltiples sistemas macromoleculares, como proteínas, lípidos o polímeros. En el modelo de Martini, los sistemas moleculares se describen mediante grupos de esferas, cada esfera representando un conjunto de átomos, generalmente 3 o 4 átomos pesados. El modelo mesoscópico o CG (coarse-grained) es una gran herramienta que nos permite dar la evolución temporal y espacial de un sistema en situaciones donde no es factible utilizar modelos atómicos.

El campo de fuerza fue desarrollado por el grupo Marrink y Tieleman y el objetivo del modelo CG es simplificar el sistema para permitir la simulación de una gama más amplia de moléculas. El diseño del modelo Martini consta de los siguientes pasos:

- El modelo de Martini se basa en asociar grupos de 4 o 5 átomos pesados (excluyendo el hidrógeno) y representarlos como uno solo. Hay cuatro tipos de partículas en el modelo de Martini: 1) Polar – P, 2) No Polar – N, 3) Apolar – C y 4) Con carga – Q.
- Las interacciones de no enlace del modelo de Martini se han parametrizado sistemáticamente mediante datos experimentales termodinámicos, específicamente, se calcularon las energías libres de hidratación, vaporización y las energías de partición entre el agua y las fases orgánicas para 18 tipos diferentes de moléculas.
- Martini reproduce con precisión las tendencias de energía libre de hidratación y vaporización, pero los valores son tan altos que el modelo CG condensado no es tan estable como debería ser. Este factor se debe al uso del potencial de Lennard-Jones (LJ) y su aplicación limitada en líquidos. Sin embargo, el comportamiento de la distribución del agua se puede reproducir con mucha precisión utilizando el modelo de Martini.
- En el modelo de Martini, las interacciones entre átomos se describen con los mismos términos que se discutieron en la sección anterior sobre mecánica molecular, que incluyen interacciones entre átomos adyacentes, interacciones angulares entre átomos cercanos o interacción dihedral.

Para parametrizar estas interacciones se utilizan datos obtenidos de la geometría atómica. Se realiza el mapeo de la estructura atómica y se simula con los parámetros atómicos, los parámetros resultantes

son la configuración inicial para la simulación con CG. El modelo de Martini se ha aplicado en varios campos, su primera aplicación fue en la formación o fusión de pequeñas vesículas lipídicas hace 13 años. A partir de estos estudios iniciales, la trayectoria de este modelo ha crecido de forma espectacular.

➤ *Fuerzas de Martini*

Martini es un campo de fuerza de grano grueso (CG) adecuado para simulaciones de dinámica molecular (DM) de sistemas biomoleculares, se basa en el mapeo de dos a cuatro átomos pesados a una partícula CG. El uso del modelo de grano grueso (CG) dentro de una variedad de técnicas de simulación, ha demostrado ser una herramienta valiosa para sondear las escalas de tiempo y longitud de los sistemas más allá de lo que es factible con los modelos tradicionales.

El modelo acuñado el campo de fuerza de Martini ha sido desarrollado en estrecha conexión con los modelos atomísticos, sin embargo, el enfoque de grano grueso es diferente ya que, en lugar de centrarse en una reproducción exacta de los detalles estructurales en un punto concreto para un sistema específico, se aspira a una gama más amplia de aplicaciones sin necesidad de volver a parametrizar el modelo.

“El objetivo general del enfoque de granulación gruesa es proporcionar un modelo sencillo que sea computacionalmente rápido y fácil de usar, pero a la vez lo suficientemente flexible como para ser aplicable a una amplia gama de sistemas biomoleculares” (Bruininks, Souza y Marrink, 2019). Actualmente, el campo de fuerza de Martini proporciona parámetros para una variedad de biomoléculas, incluyendo muchos lípidos diferentes, colesterol, aminoácidos, azúcares, ADN, fullereno, colágeno, dendrímeros y más; también se dispone de un protocolo para simular péptidos y proteínas.

Una amplia comparación del rendimiento del modelo de Martini con respecto a una variedad de propiedades experimentales ha revelado que el modelo funciona bastante bien generalmente "semi-cuantitativamente" para una amplia gama de sistemas y puntos de estado. “Las propiedades reproducidas con precisión incluyen las estructurales (densidades de los líquidos, el área/lípido para muchos tipos diferentes de lípidos, las conformaciones lipídicas accesibles, el ángulo de inclinación de la membrana que abarca las hélices, o los motivos de empaquetamiento de la hélice), elásticos (el módulo de flexión de las dos capas, la tensión de ruptura), dinámicos (velocidades de difusión de los lípidos, péptidos y proteínas, velocidad de permeación de la transmembrana de agua (TM), escalas de tiempo para la agregación de lípidos) y termodinámica (temperaturas de transición de fase de dos capas, propensión a la orientación interfacial frente al péptido TM, energía libre de desorción de lípidos, formación del dominio de la membrana) (Bruininks, Souza y Marrink, 2019)”.

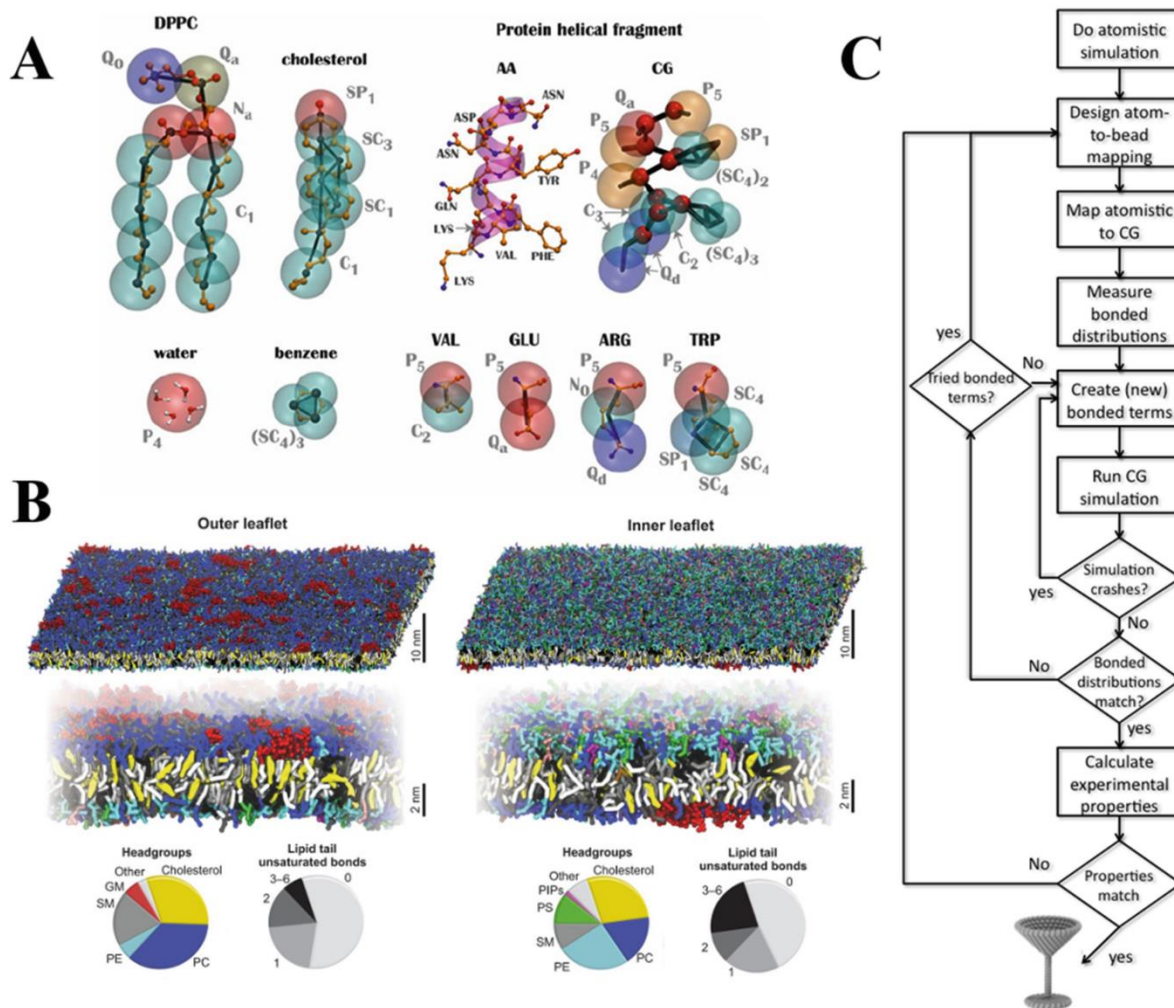


Figura 14-1: Visión práctica del campo de fuerza de Martini.¹¹
 Fuente: (Marrink y Mark, 2003).

¹¹ Martini es un campo de fuerza de grano grueso (CG) adecuado para simulaciones de dinámica molecular (MD) de sistemas biomoleculares. Se basa en la asignación de dos a cuatro átomos pesados a una partícula CG. Las interacciones efectivas entre las partículas CG se parametrizan para reproducir las energías libres de partición de los compuestos químicos pequeños entre las fases polar y apolar. En este capítulo, se presenta un resumen de los elementos clave de este campo de fuerza CG, seguido de un ejemplo de aplicación práctica: un experimento de fusión lipoplex-membrana. Formulando como práctica, este capítulo contiene directrices para construir modelos CG de importantes sistemas biológicos, como bicapas asimétricas y ADN de doble cadena. Finalmente, en la última sección se describen una serie de notas con información útil, limitaciones y consejos.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Tipo y diseño de investigación

Se puede enunciar que según el tratamiento de los datos este trabajo es guiado por el método de investigación mixta debido a que vamos a obtener resultados tanto cualitativos como cuantitativos, en base al objetivo es una investigación teórica por cuanto se realizará una simulación teórico – computacional ya que se busca la estabilización molecular del comportamiento del lipoplejo aniónico mediante las fuerzas de Martini. En cuanto al nivel de profundización en el objeto de estudio es exploratoria y descriptiva porque vamos a investigar un campo nuevo de la ciencia sobre indagaciones realizadas anteriormente y posterior a eso se detallarán los resultados obtenidos.

Según la manipulación de variables es preexperimental porque es un trabajo previo para futuras investigaciones, pudiendo corroborar los resultados teóricos obtenidos. Las variables encontradas nos permitirán encontrar los valores de parámetros como la distancia existente desde la membrana lipídica al ADN o la concentración de electrolitos dentro del lipoplejo. Además, permitirá estabilizar de manera molecular su comportamiento.

En cuanto al tipo de inferencia es deductiva puesto que vamos a analizar los resultados minuciosamente para ver el que mejor se ajuste para estabilizar el lipoplejo aniónico. Por último, para el análisis del comportamiento del sistema se acude a la herramienta GROMACS con algunos scripts de PYTHON, se usa VMD para la visualización molecular y GNUPLOT para la realización de las gráficas, tomando en cuenta al periodo temporal que en este caso es longitudinal. Cabe recalcar que todo esto se lo ha realizado en el Sistema Operativo Ubuntu, ejecutando los códigos desde la terminal.

2.2. Simulación con Grano Grueso

Los sistemas moleculares complejos son aquellos cuyos componentes son las macromoléculas y el desafío que plantea la simulación de sistemas moleculares complejos es desarrollar modelos capaces de describir los procesos relevantes que caracterizan estos materiales, los cuales ocurren a escala de su microestructura y afectan los procesos que ocurren a nivel macroscópico. Es decir, nos encontramos con el problema de describir la interacción de un gran número de elementos, y la coexistencia de un rango muy amplio de escalas de tiempo. “Por ejemplo, en el caso de las proteínas, la coexistencia de escalas espacio temporales se debe a que las proteínas exhiben jerarquías ordenadas

espacialmente en diferentes escalas interdependientes relacionadas con sus funciones biológicas” (García Luis, 2003).

A través del proceso de granulación, se pueden desarrollar algoritmos para resolver el problema de coexistencia de escalas espacio temporales, ya que permiten el estudio de propiedades relacionadas con las escalas espacio temporales de manera jerárquica y la capacidad de utilizarlas para estudios de propiedades a mayor escala. “En el caso de los sistemas macromoleculares, lo que se suele hacer es agrupar los átomos de esas moléculas para construir partículas a nivel superior que se muevan coherentemente con un grado de libertad” (Bueren-Calabuig, 2014).

Se puede decir que las simulaciones son métodos computacionales que sirven para comprender el comportamiento de varios elementos pertenecientes al sistema biológico como objeto de estudio, además son un gran complemento para estudios teóricos experimentales. Sin embargo, usando grano grueso (CG, con sus siglas en inglés) es una de las posibles maneras para realizar el modelado molecular y de cierta manera conjugarlo con técnicas experimentales, ya que tiene como objetivo principal representar un sistema físico con menos grados de libertad que los existentes en el sistema. Debido a que se reducen los grados de libertad y se eliminan algunos detalles de las interacciones finas del sistema de grano grueso a modelar no se requiere de muchos recursos, es más viable y rápido. El resultado que se puede obtener es un aumento en el orden de magnitudes en las diferentes escalas de tiempo simuladas.

2.3. Construcción del modelo ideal del sistema en grano grueso

La modelación con grano grueso, CG por sus siglas en inglés permite simular el comportamiento de un sistema complejo para ello, lo divide en componentes mucho más simples. La combinación de los enfoques TOP-DOWN (de arriba hacia abajo) y BOTTOM-UP (de abajo hacia arriba) permite que los sistemas puedan ser construidos según cada necesidad. Para realizar la modelación con el primer enfoque se empieza con la construcción de bloques lo que dará lugar a un sistema simple y finalmente a un sistema complejo. Mientras que el segundo enfoque se trata de ir del grano fino al grano grueso y viceversa.

El campo de fuerza de Martini (modelo de grano grueso) se basa en un mapeo de cuatro a uno (4:1), eso quiere decir, en promedio cuatro átomos pesados están representados por un solo centro de interacción. Existen varios tipos de bloques principales de construcción, también llamados centros de interacción, los cuales dependen de la naturaleza química de los grupos, dentro de ellos encontramos a los de naturaleza polar (P), no polar (N), apolar (C) y cargadas (Q). La construcción de un modelo

ideal de un sistema en grano grueso de Martini reduce la complejidad de las moléculas y el grado de granularidad del sistema se refleja por la medida en la que el sistema se va desglosando.

Dicho esto, comenzaremos con la preparación de un modelo CG de Martini para el ADN, luego se realizará la construcción de la bicapa lipídica haciendo uso del lípido 1,2- dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina de sodio (DOPS), se generará una caja de simulación que contenga nuestro modelo CG de ADN con el DOPS y una bicapa simétrica con la composición lipídica deseada con los valores de contorno respectivos. Posteriormente realizaremos la solvatación, minimización y equilibrio de la energía del sistema. El sistema está formado por el medio (caja de simulación), modelo de CG de ADN (cilindro) y una bicapa lipídica simétrica (plano) con el DOPS (Gráfico 1-2).

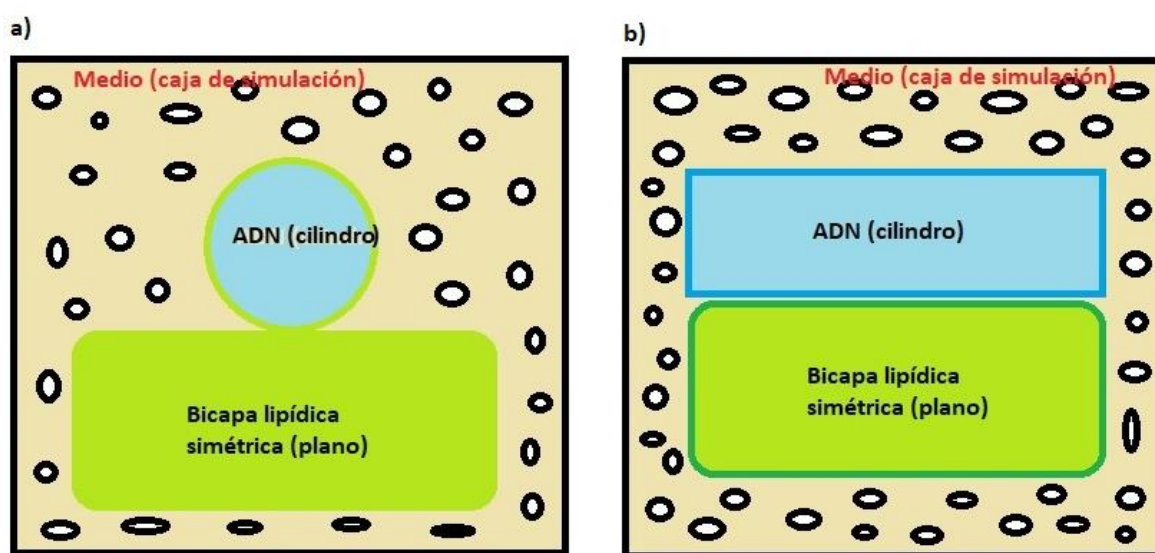


Gráfico 1-2: Construcción del modelo ideal del sistema en CG. a) Vista frontal y b) Vista superior
Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria, 2021.

2.3.1. Condiciones iniciales

Las condiciones iniciales que se toma para el plano son de un grosor de 5 nm, esto permite correlaciones dentro de la caja y sus valores son:

$$X= 12 \text{ nm}$$

$$Y=12 \text{ nm}$$

$$Z=20 \text{ nm}$$

2.3.2. Preparación del ADN

Lo primero que se debe realizar es la descarga del archivo .pdb del sitio web de Martini (<http://cgmartini.nl/>) en Descargas / parámetros del campo de fuerza / ADN

[24bp_AA2CG_stiff.tar.gz](#). Esta estructura corresponde a una secuencia de ADN con 24 bases en cada hebra ([CGCGAATTCGCG]2), además, es negativa y puede ser visualizada en VMD.

Para transformar una estructura de ADN atómico en una estructura CG, usaremos el script `martinize-dna.py` el cual viene dado en el paquete antes descargado y a través del terminal de Ubuntu se llama a Python, pero antes de ejecutar `martinize-dna.py`, debemos eliminar las moléculas de iones y agua del archivo `.pdb`. Modificamos el archivo `24bp.pdb` quitando las moléculas de agua a través de VMD, ahora el archivo `24bp_cleaned.gro` ya es compatible con el script `martinize-dna.py` y podemos realizar la transformación de todos los átomos (AA) a CG.

La salida incluye un `CG.pdb` y los archivos `CG.itp` y usaremos una red elástica rígida para implicar una estructura helicoidal estricta en nuestro ADN. El resultado siempre debe ser leído, además se debe verificar si el número de cadenas o pares de bases especificado coincide con lo que esperamos. En nuestro caso, deberán ser dos cadenas (A y B) cada una con 24 nucleótidos, también necesitamos rotar el ADN de modo que esté paralelo a la membrana para hacerlo usaremos GROMACS.

2.3.3. Creación de la bicapa lipídica de ADN

Ahora necesitamos generar una caja de simulación que contenga nuestro modelo CG de ADN y una bicapa simétrica con la composición lipídica deseada. Para construir la membrana partimos del fichero `24bp_CG_rotated.gro` para formar la bicapa lipídica con ADN, apuntaremos a una proporción de 4:1 de 1,2- dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina de sodio (DOPS). Para ello, utilizaremos `insane.py` que es un programa de Python desarrollado internamente el cual genera una configuración de CG inicial utilizando un enfoque basado en cuadrículas.

Este procedimiento convierte a `insane` en uno de los constructores de estado inicial más rápidos para membranas con o sin proteína(s) incorporada(s). La última versión estable de `insane` puede descargarse de nuestra página web ([cgmartini.nl / descargas / herramientas](#)). El `insane` se define el DOPS y la cabeza es 'S y P', los valores de glicerol 'G G' y las colas del lípido son "CDCC CDCC", pero esto es para cuando utilizamos un lípido que no está definido en la lista del `insane.py`; en nuestro caso si está definido. Ejecutamos el código en el terminal de Ubuntu llamando a Python con el ADN rotado y el lípido DOPS, entonces, se define que el tamaño de la caja es -x 120, -y 120 y -z 200 Å^o,

2.3.4. Centrado y solvatación del sistema

Partimos de la molécula de ADN (`24bp_CG_rotated.gro`) la cual la vamos a recentrar moviendo la posición de la molécula con GROMACS, con el código `editconf` se trasladará la caja de 12 12 12 a 6

6 6. Ahora debemos añadir solvente al sistema (aumentar agua), entonces tomamos el archivo .gro uno con agua y otro con ADN (DOPS_DNA.gro), dicha herramienta los une replicando el solvente y solvatando el ADN. También quitaremos el agua que se encuentra por los lípidos y ADN usando VMD.

2.3.5. Preparación de los archivos de topología

Como DOPS es un lípido predeterminado, su topología ya viene dada en el archivo descargado de Martini como .itp. Esto debería generar una caja que contenga aproximadamente 5400 átomos de DOPS, más el ADN a la concentración fisiológica de sal. La proporción objetivo de agua atomística con respecto a la cantidad de lípidos es alrededor de 8:1.

Para el agua de Martini, con una cuenta que representa cuatro moléculas de agua, la proporción objetivo es 2:1. La carga del ADN aún no está neutralizada y será 44, por lo tanto, es recomendable exceder la cantidad de agua deseada en 44, ya que transformaremos esas aguas en gotas de sodio. Para generar un complejo mayor, copiaremos la configuración de la membrana de ADN a lo largo de su eje perpendicular al canal normal.

Debemos generar un archivo superior que coincida con la composición y el orden de "DOPS_DNA.gro" y hacer uso de los archivos de topología correctos. Para lograr un sistema de carga neutral, reduciremos el número de aguas en la topología y agregaremos los iones de sodio justo debajo (esto transformará las moléculas de agua en iones de sodio). El sistema debe ser electroneutral por esa razón se cambia la configuración del sistema.

2.3.6. Minimización y Equilibrio de la Energía

Una vez que tenemos todos los componentes juntos ya podemos comenzar a ejecutar una corrida de minimización y equilibrio de energía. No entraremos en muchos detalles, pero la configuración predeterminada se puede encontrar en cgmartini.nl (Descargas / Parámetros de campo de fuerza / Parámetros de entrada). Para realizar la minimización de la energía, debemos configurar el integrador en "empinado" y 1000 pasos deberían ser suficientes para la obtención de esta.

Se usa GROMACS el código grompp con la molécula de AND y el lípido DOPS (DOPS_DNA.gro) y se usa el archivo de topología. Dicho script nos arrojará los valores de topología de todo el sistema. Ahora debemos añadir iones de Na (Sodio) en el sistema, para lo cual tomamos el fichero .tpr, la topología inicial dada, la molécula de ADN y el lípido DOPS, dándonos así un nuevo fichero de topología incluido el Na+.

Para el equilibrio del sistema se deben realizar 250 000 pasos en un paso de tiempo de 3000 s, para lo cual se usará el acoplamiento de presión anisotrópica y el barostato berendsen para mejorar la estabilidad. No debemos olvidarnos de volver a configurar el integrador en "md" y agregar "define ¼ -DCONSTRAINED_X". Se usa GROMACS con el script grompp y el fichero de eq.mdp, el de la minimización de la energía em.gro y la topología topol.top, generando la energía de equilibrio eq.tpr.

2.4. Modelación Molecular

Para la simulación del sistema es importante encontrar ciertos parámetros al momento de realizar la construcción del script.

2.4.1. Sitios de interacción

Una vez que se ha construido el sistema con el mapeo de CG el cual se ha mencionado que se basa en 4:1, es decir, 4 átomos pesados se representan en 1 centro de interacción.

2.4.2. Interacciones enlazantes

Dentro de este grupo se encuentran todas las interacciones que son consecuencia de la unión covalente entre los átomos del sistema. Esto resulta como consecuencia de la variación de la longitud de enlace ya sea de estiramiento o acortamiento, con respecto a la de referencia. La longitud de referencia es aquella cuando todos los términos restantes del campo de fuerza son nulos, la cual no necesariamente corresponde a la longitud de equilibrio del enlace.

Según (Marrink et al., 2007b) existen interacciones de enlace entre sitios químicamente conectados, los enlaces se describen mediante un potencial armónico débil $V_{bond}(R)$ la cual se expresa en forma de un potencial armónico de Hooke.

$$V_{bond}(R) = \frac{1}{2}K_{bond}(R - R_{bond})^2 \quad [1]$$

Con una distancia de equilibrio entre los átomos $R_{bond} = \sigma = 0.47 \text{ nm}$ y una fuerza constante de $K_{bond} = 1250 \frac{\text{KJ}}{\text{mol nm}^2}$. Las interacciones de LJ se excluyen entre las partículas enlazadas, las cuales en promedio están algo más cerca unas de otras a diferencia de las partículas vecinas no enlazadas

(para las que la distancia de equilibrio es $2^{1/6} \sigma$). Sin embargo, el uso de una única distancia de enlace y una única constante de fuerza no es requisito.

Se pueden utilizar diferentes valores para reflejar mejor la estructura química subyacente, para representar la rigidez de la cadena se utiliza un potencial armónico débil $V_{angle}(R)$ del tipo coseno para los ángulos.

$$V_{angle}(\theta) = \frac{1}{2} K_{angle} \{(\cos(\theta) - \cos(\theta_0))\}^2 \quad [2]$$

No se excluyen las interacciones de LJ entre los segundos vecinos más cercanos, para las cadenas alifáticas la constante de fuerza se mantiene en $K_{angle} = 25 \text{ KJ/mol}$ con un ángulo de enlace de equilibrio de $\theta_0 = 180^\circ$.

2.4.3. Interacciones no enlazantes

Las interacciones de Van Der Waals son del tipo no enlazantes dando estabilidad a la estructura de la molécula y se calculan considerando los pares de átomos. Una manera de incluirlas en los cálculos de la mecánica molecular es mediante los potenciales de Lennard-Jones, donde es posible considerar las dos principales características de las interacciones no enlazantes. Las primeras, son las atractivas a largo alcance y las segundas, son las repulsivas a corto alcance.

Se utiliza la función de la Energía Potencial de Lennard-Jones (LJ) desplazada para poder describir las interacciones no enlazadas.

$$U_{LJ}(r) = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 \right] \quad [3]$$

Con σ_{ij} representando la distancia de aproximación entre dos partículas y ε_{ij} la fuerza de su interacción. El mismo tamaño efectivo $\sigma = 0.47 \text{ nm}$ para cada par de interacciones, el término $\left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12}$ modela la repulsión de Pauli, mientras que $\left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6$ modela las atracciones las cuales son provocadas por las fuerzas de Van Der Waals.

Las interacciones de Van Der Waals entre los pares de átomos se pueden calcular mediante reglas de combinación, una de las más usadas y la que se usa en este trabajo se denomina Lorentz-Berthelot. Dicha combinación calcula el parámetro σ de las interacciones como la media aritmética del par de

átomos y el ε como la media geométrica de los valores de σ . La misma que queda expresada de la siguiente manera:

$$\sigma_{ij} = \frac{\sigma_i + \sigma_j}{2} \quad \varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i + \varepsilon_j} \quad [4]$$

Además de la interacción de LJ, los grupos cargados tipo Q (Q-type) llevan una carga completa q_{ij} interactuando a través de una función de Energía Potencial Coulómbica desplazada.

$$U_{el}(r) = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r r} \quad [5]$$

Con una constante dieléctrica relativa $\varepsilon_r = 15$ para el apantallamiento explícito. Este cambio fue necesario para equilibrar el aumento de la fuerza de hidratación de muchos de los tipos de partículas CG. Las contribuciones electrostáticas es de gran importancia contemplarlas en la energía del sistema a modelar, este tipo de interacciones no enlazantes se modelan generalmente como potenciales de Coulomb entre los pares atómicos. Donde $4\pi\varepsilon_0$ es la constante de Coulomb, q_i y q_j las cargas de los átomos y r la distancia entre los átomos.

2.4.3.1. Sumas de Ewald

Según (Martín Molina, 2003) la técnica de Ewald consiste en sumar todas las interacciones posibles sobre todas las cajas que se han generado en torno a la original para crear las condiciones periódicas. Considerando el disolvente como un medio con una permitividad dieléctrica constante, la energía total asociada a una configuración está dada por:

$$U_{total} = U_{ion-ion}(r) + U_{ion-plano}(x) + U_{ion-continuo}(x) \quad [6]$$

El primer término corresponde con la energía de interacción coulombiana entre dos iones con subíndices i y j que se encuentran en el interior del cilindro, separados a una distancia r ente sus centros.

$$U_{ion-ion}(r) = \begin{cases} \sum_{i>j=1}^{N_{cc}} \frac{z_i z_j e^2}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r r} & si \quad r > 2a \\ \infty & si \quad r \leq 2a \end{cases} \quad [7]$$

N_{cc} es el número de iones del cilindro.

El segundo término corresponde a la interacción ion i del cilindro y el plano cargado.

$$U_{ion-plano}(x) = -\frac{\rho_0 z_i e^2 x}{2\varepsilon_0 \varepsilon_r} \quad [8]$$

Para calcular el último término de la energía entre un ion i del cilindro y el continuo de carga externo se calcula el potencial $V^{ext}(x)$ dividiendo el espacio en pequeños triángulos al plano cargado.

$$V^{ext}(x) = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r} \int_0^1 \int_0^{2\pi} \int_{W/2}^{\infty} \frac{\rho_{el}(x)}{r_c} r \, dx \, d\phi \, dr \quad [9]$$

Si se denota como $r \rightarrow max$ al límite de integración en la dirección radial y resolviendo la integral se tiene:

$$V^{ext}(x) = \frac{\rho_{el}(x)}{2\varepsilon_0\varepsilon_r} \int_0^L \int_0^{2\pi} \sqrt{\frac{W^2}{4} + (x-x')^2} \, dx' \, d\phi \quad [10]$$

Esta ecuación se resuelve de manera iterativa porque no se conoce la distribución de carga de fuerza del cilindro, por ende:

$$U_{ion-continuo}(x) = e z_i V^{ext}(x) \quad [11]$$

2.4.4. Doble Capa Eléctrica

2.4.4.1. Modelos de la Doble Capa Eléctrica

Tomando lo que (Martín Molina, 2003) menciona en su tesis los principales mecanismos a través de los cuales las partículas adquieren una determinada carga superficial, tiene origen en la disociación de los grupos superficiales, adsorción de iones procedentes de la disolución. Esta doble capa eléctrica depende de la densidad de carga superficial y concentración de iones en el medio.

$$\sigma_0 = \frac{z_e}{4\pi R^2} \quad [12]$$

Para que el sistema sea eléctricamente neutro debe haber un exceso de cationes que compense la carga de la partícula.

2.4.4.2. Ecuación de Poisson-Boltzmann

Se define la distribución de Poisson Boltzmann como:

$$\rho_i(r) = \rho_i^0 e^{[-\beta w_i(r)]} \quad [13]$$

Donde $\rho_i(r)$ y ρ_i^0 son la densidad de iones de la especie i a una distancia r de la superficie (Martín Molina, 2003). La ecuación 13 puede reescribirse en términos del potencial eléctrico de la siguiente manera:

$$w_i = z_i e \Psi(r) \quad [14]$$

2.4.4.3. Modelo de Gouy – Chapman

Este modelo estudia la distribución de iones en torno a una superficie cargada, así como la función de potencial eléctrico $\Psi(r)$, por lo tanto, es posible establecer una relación entre la densidad de carga superficial y el potencial de la superficie $\Psi(r = 0) = \Psi_0$, conocido simplemente como potencial superficial (Martín Molina, 2003).

En la ecuación 14 se desprecia los efectos estadísticos del entorno de los iones porque se considera el trabajo eléctrico debido al desplazamiento del ion i sin tomar en cuenta las contribuciones energéticas producidas por el desplazamiento de otros iones. (Martín Molina, 2003) menciona que la relación entre el potencial y la densidad de carga en la superficie viene dada por:

$$\sigma_0 = -\varepsilon_0 \varepsilon_r \left. \frac{d\Psi(x)}{dx} \right|_{x=0} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r k}{e\beta} f(e\beta\Psi_0) \quad [15]$$

A partir de esto se desarrollan otros modelos que se usan para describir la distribución iónica en torno a una superficie cargada.

2.4.4.4. Modelo de Stern – Grahame

Stern plantea que los iones no pueden acercarse a la superficie a una distancia menor a la de su radio, esta distancia se denota como δ y su valor oscila entre 0.1 y 0.5 nm; valores que se encuentran entre el radio de un ion no hidratado y uno hidratado. Si $x = \delta$ es denominado plano de Stern, de forma que la doble capa eléctrica queda dividida en dos regiones: la capa de Stern que va desde la superficie de la partícula hasta al plano Stern y la capa difusa que abarca la región de la doble capa eléctrica, cuyas distancias son mayores a δ , donde se puede aplicar el modelo de Gouy- Chapman (Martín Molina, 2003).

“Este modelo considera que todos los iones son móviles y no hay fenómenos de adsorción en la superficie, por lo que en la capa de Stern no habría carga acumulada y la densidad de carga en la zona difusa δ_d es la encargada de compensar la densidad de carga superficial del plano de esta manera se mantiene la electroneutralidad del sistema (Martín Molina, 2003)”. Graham en su modelo de doble capa eléctrica, divide la capa de Stern en dos regiones: una capa interna que es ocupada por iones no hidratados adsorbidos y una segunda capa donde se encontrarían los iones hidratados.

Por lo tanto, “las dos regiones estarán separadas por un plano situado a una distancia igual a la de un radio iónico denominado plano interior de Helmholtz y el plano exterior de Helmholtz es el plano de Stern del modelo de Stern que sirve de frontera con la capa difusa (Israelachvili, 2011)”.

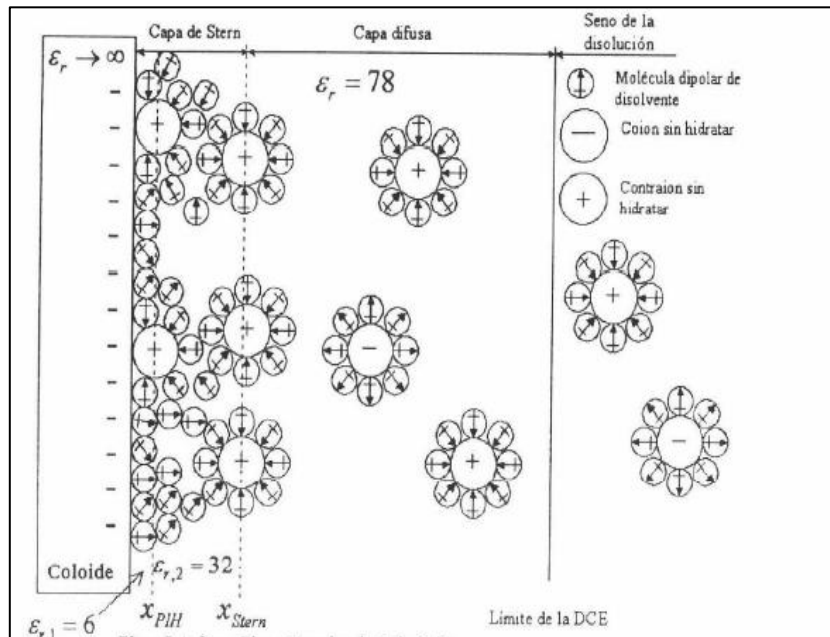


Figura 15-2: Plano interior y plano exterior de Helmholtz.

Fuente: (Martín Molina, 2003).

Cuando hay ausencia de adsorción específica la ecuación 13 se puede escribir como:

$$\sigma_0 = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_b T}{e} f(e\beta\Psi_d) \quad [16]$$

O bien así

$$\sigma_d = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_b T}{e} f(e\beta\Psi_d) \quad [17]$$

2.4.5. Modelo Primitivo de la Doble Capa Eléctrica

Los iones de un modelo primitivo de electrolito son esferas rígidas cargadas con un determinado tamaño, entonces todos los iones son móviles experimentan una interacción repulsiva de corto alcance debido a su volumen (Martín Molina, 2003). Si los iones poseen el mismo tamaño se tiene un modelo primitivo restringido.

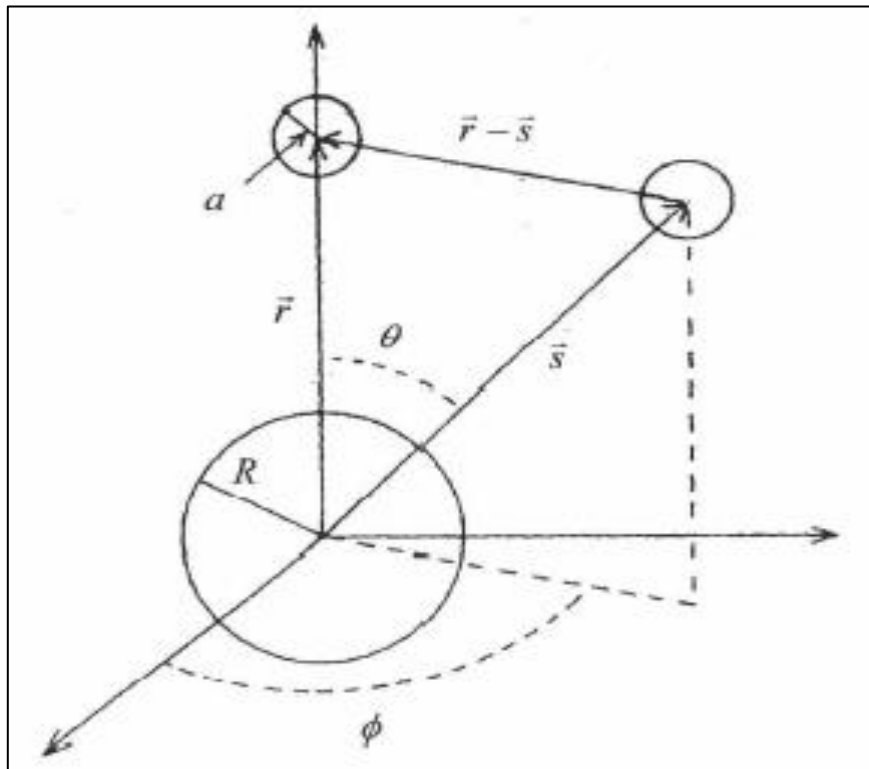


Figura 16-2: Representación esquemática de las partículas que forman la doble capa eléctrica.

Fuente: (Martín Molina, 2003).

2.4.6. *Sobrecarga del Sistema*

(Martín Molina, 2003) en su tesis nos dice que los iones al ser esferas rígidas tienen una distancia de acercamiento al plano cargado es $x = a$. Precisamente a distancias próximas a esta, el modelo primitivo predice una mayor concentración de iones catiónicos o contraiones que son los iones con carga negativa, el exceso de contraiones da lugar al fenómeno de sobrecarga también conocida como inversión de carga.

“Cuando el sistema se encuentra sobrecargado, la carga neta de signo opuesto a σ_0 hace que los iones catiónicos se sientan atraídos a distancias del plano del orden de tres veces el radio iónico y por ende su concentración aumenta en esta región. Y cuando el sistema invierte su carga, los papeles que desempeñan los iones catiónicos e iones aniónicos se intercambian por lo que el mínimo de una función coincide con el máximo de la función correspondiente a la otra especie iónica (Martín Molina, 2003)”.

2.5. **Parámetros del sistema**

2.5.1. *Tiempo de paso:* Es el valor del intervalo de tiempo que hay entre cada configuración generada durante el proceso de simulación. El número de pasos en el script es de 250 000 pasos, lo que corresponde a un tiempo de 3000 segundos (s) aproximadamente.

2.5.2. *Carga (C/m²):* Se toma las cargas individuales de cada elemento **DOPS:** -, **ADN:** -4, **Na:** +1, **Cl:** -1, **BICAPA:** -, **H:** +1, **O:** -2.

2.5.3. *Concentración (mol/litro):* La concentración es el número de partículas por unidad de volumen, cuando se tiene una alta concentración las partículas interaccionan más entre sí a diferencia cuando la concentración es baja.

2.5.4. *Distancia entre plano y cilindro:* Los valores de distancia son: 3.5 y 15 nm.

2.6. Cambio de variables del sistema

Tabla 3-2: Cambio del tamaño de caja, valores de distancia y concentración para los diferentes sistemas.

FORMACIÓN DEL SISTEMA	TAMAÑO DE LA CAJA (nm)	DISTANCIA (nm)	CONCENTRACIÓN (mol/l)	CARGA (C/m²)
<i>Bicapa +ADN + H₂O</i>	Grosor: 5	-dm: 0	-sol W: 90 -sol WF: 10 -sold: 0.47	BICAPA: -450 ADN: -4 H: +1 O: -2
<i>Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + H₂O</i>	-x: 12 -y: 12 -z: 20	-dm: 3.5	-sol W: 90 -sol WF: 10 -sold: 0.47	BICAPA: -450 ADN: -4 DOPS: - H: +1 O: -2
<i>Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sin Sal (Sin NaCl + H₂O)</i>	-x: 12 -y: 12 -z: 30	-dm: 15	-sol W: 90 -sol WF: 10 -sold: 0.47	BICAPA: -450 ADN: -4 DOPS: - Na: 0 Cl: 0 H: +1 O: -2
<i>Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H₂O</i>	-x: 12 -y: 12 -z: 20	-dm: 3.5	-sol W: 90 -sol WF: 10 -sold: 0.47 -salt: 0.15	BICAPA: -450 ADN: -4 DOPS: - Na: +1 Cl: -1 H: +1 O: -2

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria., 2022.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Construcción del modelo ideal del sistema en grano grueso

En el capítulo 2 se establece la preparación de un modelo CG de Martini para el ADN, el cual se colocó encima de una bicapa lipídica, se generó una caja de simulación que contenía nuestro modelo CG de ADN y una bicapa simétrica con la composición lipídica deseada (DOPS), cuyas dimensiones fueron 120x120x200 Å.

Posteriormente se duplicó la pila de membranas del ADN, se realizó la minimización y equilibrio de la energía. El sistema está formado por el medio (caja de simulación), modelo de CG de ADN (cilindro) y una bicapa lipídica simétrica (plano).

Lo importante de la preparación del ADN es entender que la estructura corresponde a una secuencia de ADN con 24 bases en cada hebra ([CGCGAATTCGCG]₂), y que, además, es negativa. La eliminación de los iones y de las moléculas de agua a través de VMD hace posible que la estructura de ADN atómico se pueda transformar en una estructura CG.

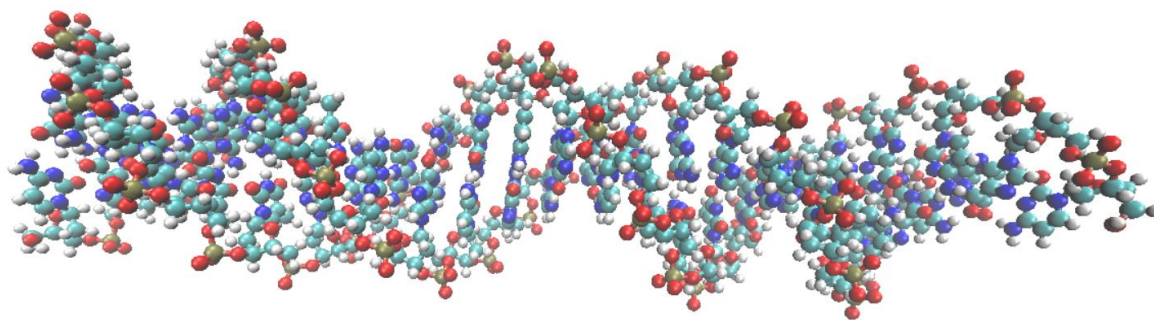


Gráfico 2-3: Visualización en VMD del ADN de 24 pares de bases del paquete descargado de Martini (24bp.pdb)

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria, 2021.

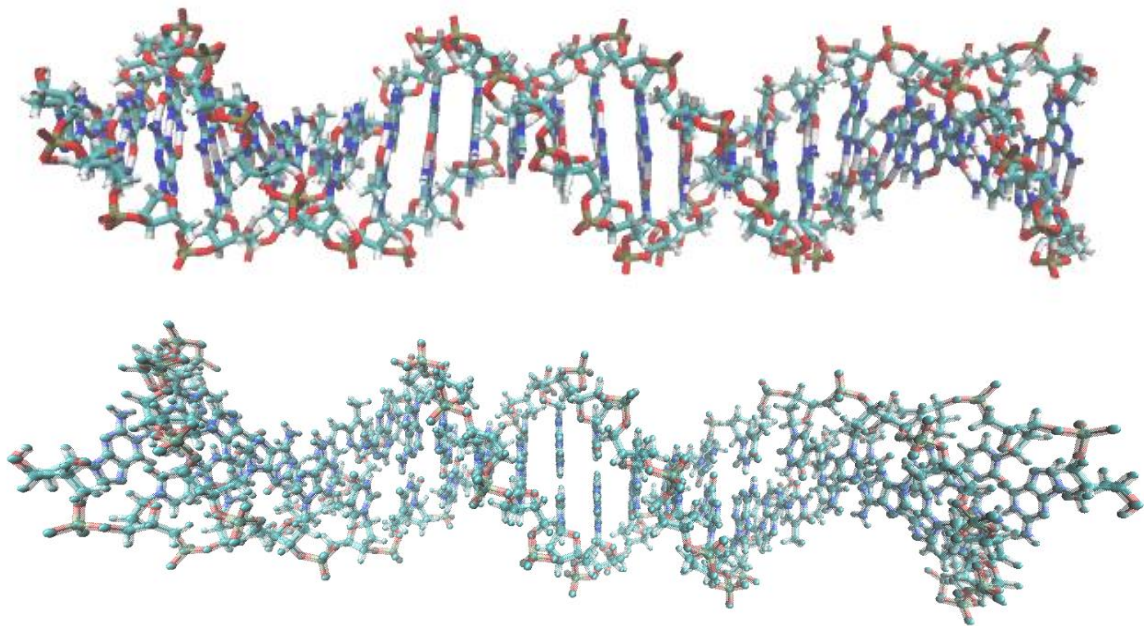
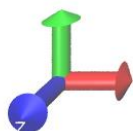
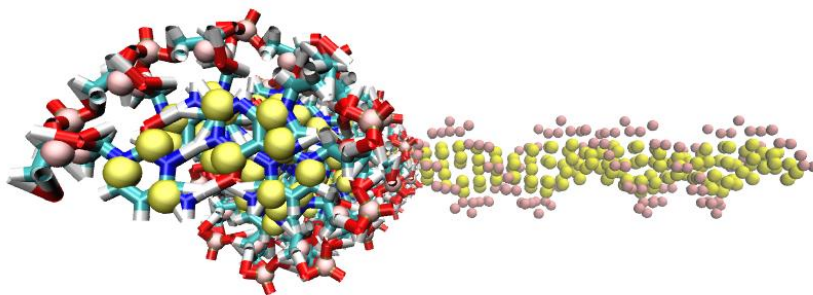


Gráfico 3-3: Eliminación mediante VMD de las moléculas de iones y agua del ADN (24bp.pdb)
Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria, 2021.

Se usó una red elástica rígida para implicar una estructura helicoidal estricta en nuestro ADN y constantemente se leyó el resultado porque se debía verificar si el número de cadenas o pares de bases especificado coincidía con lo que esperamos. En la Figura 4-3 podemos ver que, en nuestro caso, son dos cadenas (A y B) cada una con 24 nucleótidos, también rotamos el ADN de modo que esté paralelo a la membrana para hacerlo usamos GROMACS.



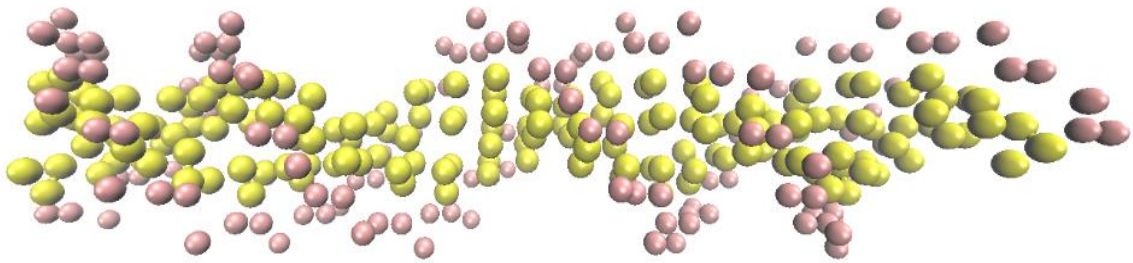


Gráfico 4-3: Rotación mediante GROMACS de las 2 cadenas de 24 nucleótidos
Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria, 2021.

La caja de simulación construida contiene nuestro modelo CG de ADN y una bicapa simétrica con la composición lipídica deseada (DOPS). En la construcción de la membrana se formó la bicapa lipídica con ADN, la proporción es de 4:1 de 1,2- dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina de sodio (DOPS). Con la ayuda de insane.py generaremos una configuración de CG inicial utilizando un enfoque basado en cuadrículas. Insane se define el DOPS, en nuestro caso ya lo estaba y se definió con un grosor de 5 nm.

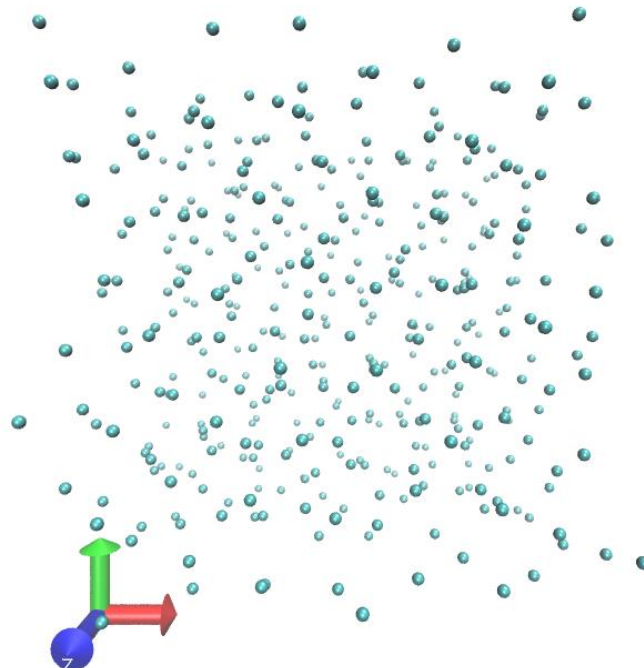


Gráfico 5-3: Creación de la caja -x 12 -y 12 -z 20 nm
Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria, 2021.

Se entiende que los átomos con carácter iónico o iones, es decir, un anión y un catión, estos pueden permanecer unidos gracias a la atracción electrostática que se establece entre ambos debido a que poseen carga opuesta, por lo que se dice que se ha formado un enlace iónico. Este tipo de enlaces se presentan comúnmente en cristales de compuestos salinos como el cloruro de sodio y se conocen también como puentes salinos o interacciones electrostáticas.

Gracias a las interacciones entre moléculas de diferente grado de polaridad o carga eléctrica se da lugar a las fuerzas de atracción intermolecular ya que por su baja estabilidad y un periodo de corta duración se las han asignado como interacciones débiles. Eso sí, dependiendo del tipo de moléculas que interactúan y sus características específicas al momento de interaccionar, estas fuerzas débiles son distintas.

La bicapa con el lípido (DOPS) y el ADN están sumergidos en un modelo primitivo 1:1, tienen la misma constante dieléctrica $\epsilon=15$ y temperatura $T= 303$ K. Gracias a que el ADN, el lípido (DOPS) y los iones de sal están cargados surgen fenómenos de correlación de carga y correlación de tamaño, es decir, interaccionan entre sí por efecto de sus cargas.

La configuración inicial del sistema necesita que se solvate, minimice y equilibre su energía por lo que se juega con diferentes sistemas intercambiando sus variables, el primero es el sistema inicial con la bicapa, el lípido y el ADN, en otro se le añade NaCl, mientras que otro la carece y para entender las interacciones de Coulomb se emplea el formalismo de las sumas de Ewald. En el caso de CG podemos decir que para tener una buena estadística el número de configuraciones depende en gran parte de los resultados obtenidos frente al cambio de la formación del sistema, valores del tamaño de la caja, distancia, concentración y carga.

Las simulaciones realizadas en este trabajo utilizan las Fuerzas de Matini (CG), el modelo de la doble capa eléctrica de manera que con ayuda del modelo de Monte Carlo se puede estudiar el efecto de las correlaciones de corto alcance las cuales se deben al volumen de exclusión de los iones. Con esto se determinan los valores para el análisis de la contribución de fuerza que ejercen los iones, la fuerza electrostática y la fuerza total que existe en el sistema debido al cambio de los parámetros intrínsecos.

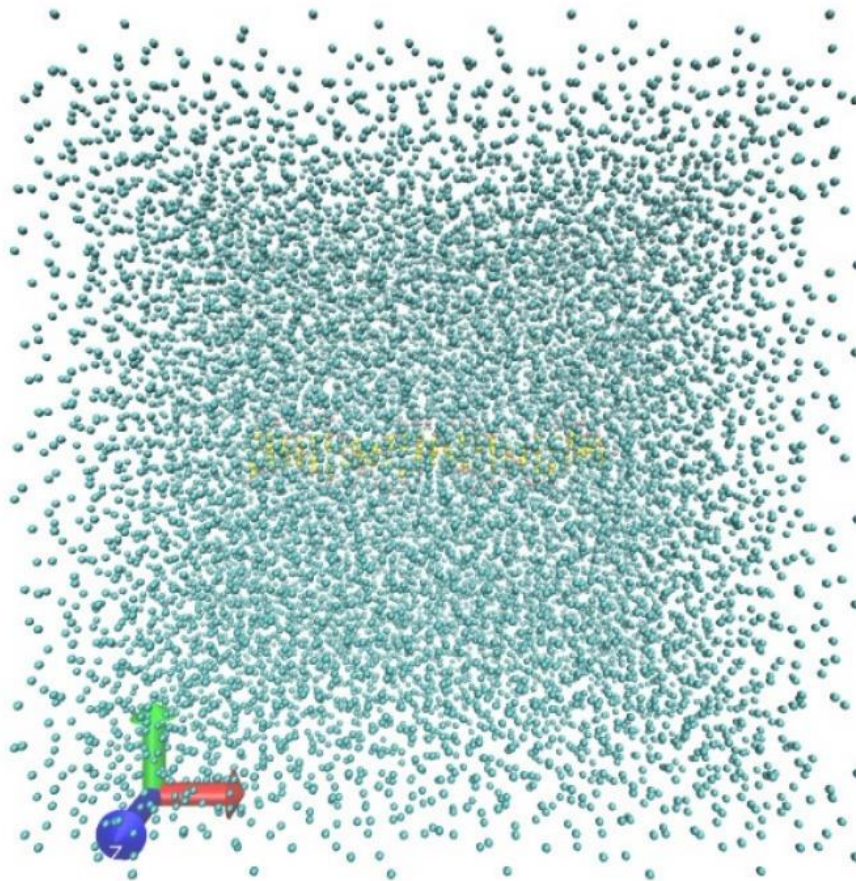


Gráfico 6-3: Visualización del ADN más agua
 Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria, 2021.

3.1.1. Construcción de la Bicapa + ADN + H₂O

Tabla 4-3: Grosor de la caja, valores de distancia y concentración para la construcción de la bicapa

FORMACIÓN DEL SISTEMA	TAMAÑO DE LA CAJA (nm)	DISTANCIA (nm)	CONCENTRACIÓN (mol/l)	CARGA (C/m ²)
<i>Bicapa +ADN + H₂O</i>	Grosor: 5	-dm: 0	-sol W: 90 -sol WF: 10 -sold: 0.47	BICAPA: -450 ADN: -4 H: +1 O: -2

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria., 2022.

Para la construcción de la bicapa lipídica se solvató el sistema, el mismo que previamente fue rotado y trasladado, la caja de agua CG está a una temperatura de 303 K y 1 bar de presión, esto nos dio como resultado la bicapa con ADN y agua. Luego, guardamos el sistema quitando el agua que se solapa con la membrana y el ADN con VMD.

Del archivo system.gro realizamos el archivo de topología, los contabilizamos en la consola de VMD, pero el sistema no está neutralizado por lo que añadimos al cloro un valor de 44 y restamos al agua 44, en este caos en la topología no coincidía el número de átomos con la primera fila por lo que la tercera fila fue nuestra referencia y se cambió el valor del agua de la parte externa para equilibrar la carga del sistema.

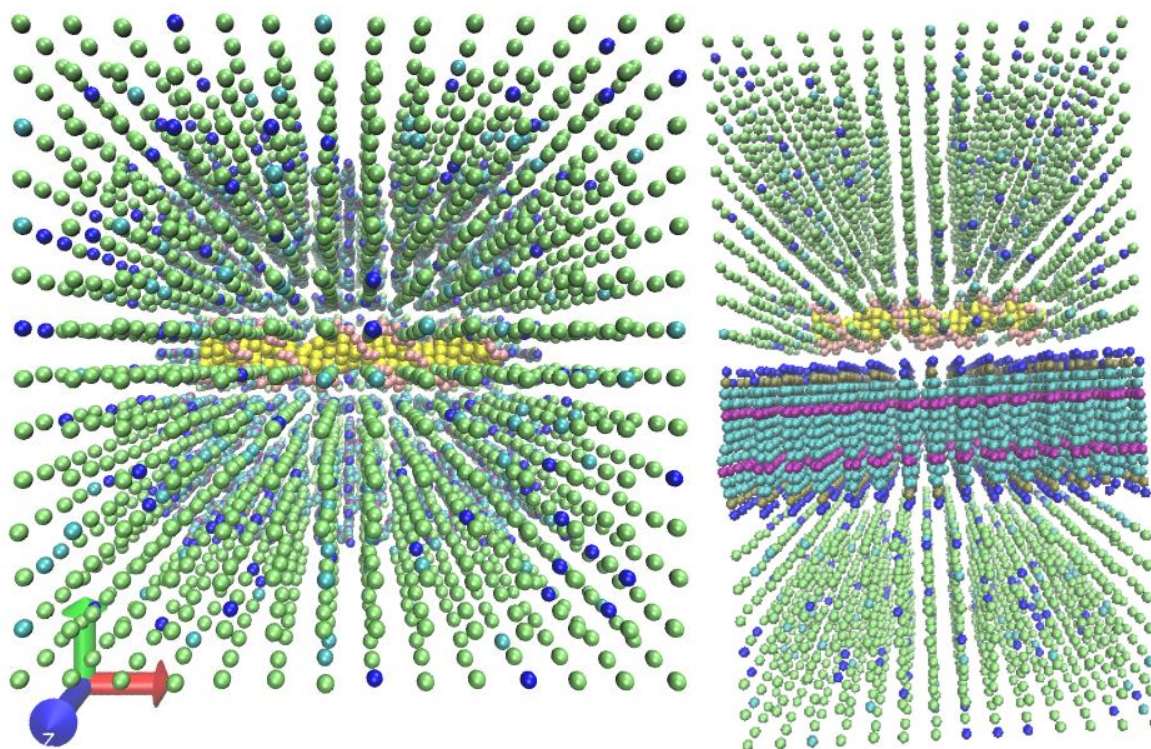


Gráfico 7-3: Creación de bicapa con ADN y agua. a) Vista en un plano XYZ+ b) Vista de rotación
Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria, 2021.

3.1.2. Sistema inicial: Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + H₂O

Tabla 5-3: Cambio del tamaño de caja, valores de distancia y concentración para el sistema inicial

FORMACIÓN DEL SISTEMA	TAMAÑO DE LA CAJA (nm)	DISTANCIA (nm)	CONCENTRACIÓN (mol/l)	CARGA (C/m ²)
<i>Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + H₂O</i>	-x: 12 -y: 12 -z: 20	-dm: 3.5	-sol W: 90 -sol WF: 10 -sold: 0.47	BICAPA: -450 ADN: -4 DOPS: - H: +1 O: -2

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria., 2022.

3.1.2.1. Centrado y solvatación del sistema

Tomando en cuenta la rotación de la molécula de ADN la recentramos moviendo la posición de la molécula con GROMACS y aumentamos agua en el sistema, es decir, lo solvatamos con el fichero inicial DOPS_ADN.gro y nos da uno de salida.

3.1.2.2. Topología del sistema

Se genera la topología del sistema inicial:

Nucleic_A+Nucleic_B	1
DOPS	225
DOPS	225
W	19296
WF	2144
NA+	461
CL-	11

Pero luego el sistema debe ser electroneutral por lo que se cambia la configuración del sistema para que esto sea posible.

3.1.2.3. Minimización y Equilibrio de la Energía

La minimización de la energía se detuvo, pero las fuerzas no han convergido a la precisión solicitada $F_{max} < 10$ (que puede no ser posible para el sistema). Eso detenido porque el algoritmo intentó hacer un nuevo paso cuyo tamaño era demasiado pequeño, o no hubo cambio en la energía desde el último paso. De cualquier manera, nosotros debemos considerar la minimización como convergente dentro de la máquina disponible precisión, dada su configuración inicial y los parámetros EM.

La doble precisión normalmente le brinda una mayor precisión, pero esto a menudo no es necesario prepararse para ejecutar la dinámica molecular. Es posible que debamos aumentar la precisión de la restricción o cambiar fuera de las restricciones por completo (establecer restricciones = ninguna en el archivo mdp). Los descensos más pronunciados convergieron a la precisión de la máquina en 5050 pasos, pero no alcanzó el $F_{max} < 10$ solicitado.

Energía potencial = -8.0840262e+05 kJ

Fuerza máxima = 2.3943442e+02 N en el átomo 2400

Norma de fuerza = 1.3268925e+01 N

Para el equilibrio de la energía se realizaron estadísticas sobre 250001 pasos usando 2501 marcos y nos dan valores de energía. Además, vamos a conseguir los valores de energía del eje de cada caja y los valores de presión para cada uno de los átomos de interacción.

Energies (kJ/mol)				
Bond	Angle	G96Angle	Proper Dih.	Improper Dih.
9.94498e+03	2.54379e+02	4.99981e+03	7.43417e+01	2.80687e+02
LJ (SR)	Coulomb (SR)	Potential	Kinetic En.	Total Energy
-6.77449e+05	-8.23047e+03	-6.70125e+05	1.09928e+05	-5.60197e+05
Conserved En.	Temperature	Pressure (bar)	Constr. rmsd	
-7.43566e+05	3.19762e+02	3.35326e+00	0.00000e+00	
Box-X	Box-Y	Box-Z		
1.26360e+01	1.26360e+01	2.22115e+01		
Total Virial (kJ/mol)				
3.63361e+04	3.16033e+01	3.60979e+00		
3.16028e+01	3.63074e+04	-5.21450e+00		
3.61142e+00	-5.21356e+00	3.63331e+04		
Pressure (bar)				
3.95218e+00	-1.51685e-01	-8.30271e-02		
-1.51680e-01	3.09716e+00	4.51251e-02		
-8.30425e-02	4.51164e-02	3.01043e+00		

Gráfico 8-3: Resultados de energías, presión y temperatura del sistema inicial total y de cada caja con los átomos de interacción

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria., 2022.

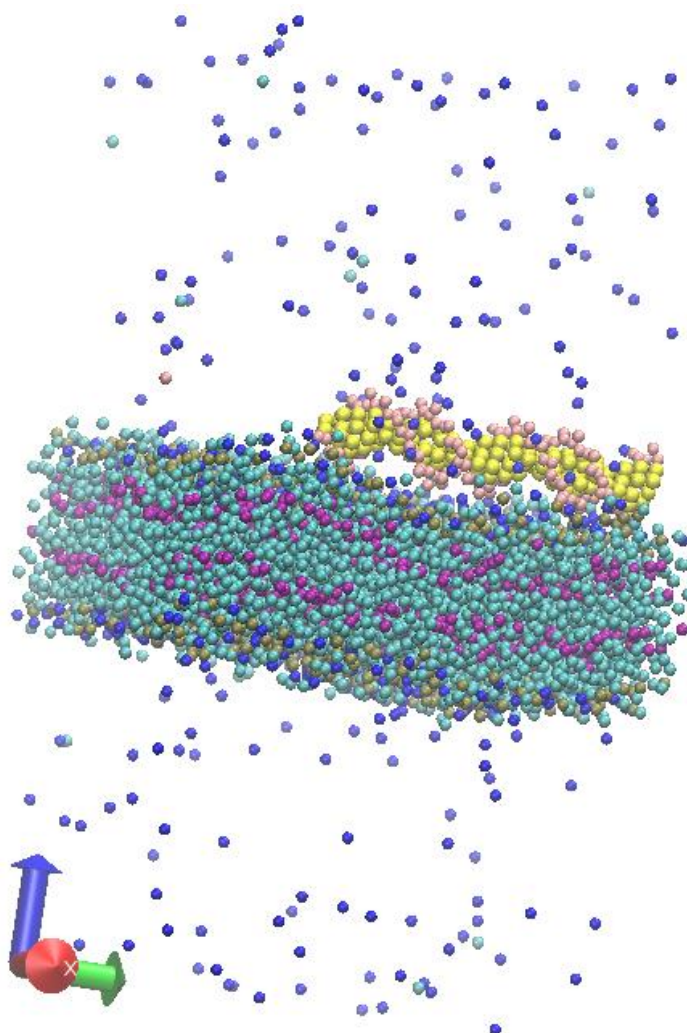


Gráfico 9-3: Simulación del sistema inicial: Bicapa + Lípido (DOPS) + ADN

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria., 2022.

3.1.3. Sistema 2: Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sin Sal (Sin NaCl + H₂O)

Tabla 6-3: Cambio del tamaño de caja, valores de distancia y concentración para el sistema 2

FORMACIÓN DEL SISTEMA	TAMAÑO DE LA CAJA (nm)	DISTANCIA (nm)	CONCENTRACIÓN (mol/l)	CARGA (C/m ²)
<i>Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sin Sal (Sin NaCl + H₂O)</i>	-x: 12 -y: 12 -z: 30	-dm: 15	-sol W: 90 -sol WF: 10 -sold: 0.47	BICAPA: -450 ADN: -4 DOPS: - Na: 0 Cl: 0 H: +1 O: -2

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria., 2022.

3.1.3.1. Centrado y solvatación del sistema

La diferencia en este sistema son las condiciones ya que el tamaño de la caja no es la misma que en los sistemas anteriores y tampoco la distancia, pero la proteína parece no estar dentro de la membrana. Por lo que se ejecutó otro código con -orient para ponerlo, esto nos dio las siguientes condiciones:

```
X: 12.000 (15 bins) Y: 12.000 (15 bins) en folleto superior
X: 12.000 (15 bins) Y: 12.000 (15 bins) en folleto inferior
225 lípidos en el prospecto superior, 225 lípidos en el prospecto inferior
NDX Solute 1 310
Carga de proteína: 0.000000
Membrana NDX 311 5710
Carga de membrana: -450.000000
Carga total: -450.000000
Disolvente NDX 5711 56131
Sistema NDX 1 56131
```

Para la solvatación y centrado conservamos los mismos valores del primer sistema, además le quitamos el agua que se encuentra por lo lípidos y ADN utilizando VMD.

3.1.3.2. Topología del sistema

Se tomó las mismas condiciones que el sistema 1 y finalmente se generó un fichero de topología.

3.1.3.3. Minimización y Equilibrio de la Energía

Se minimiza la energía y se observa que los descensos más pronunciados convergieron a la precisión de la máquina en 5700 pasos, pero no alcanzó el $F_{max} < 10$ solicitado, es lo mismo que sucedía en el caso anterior.

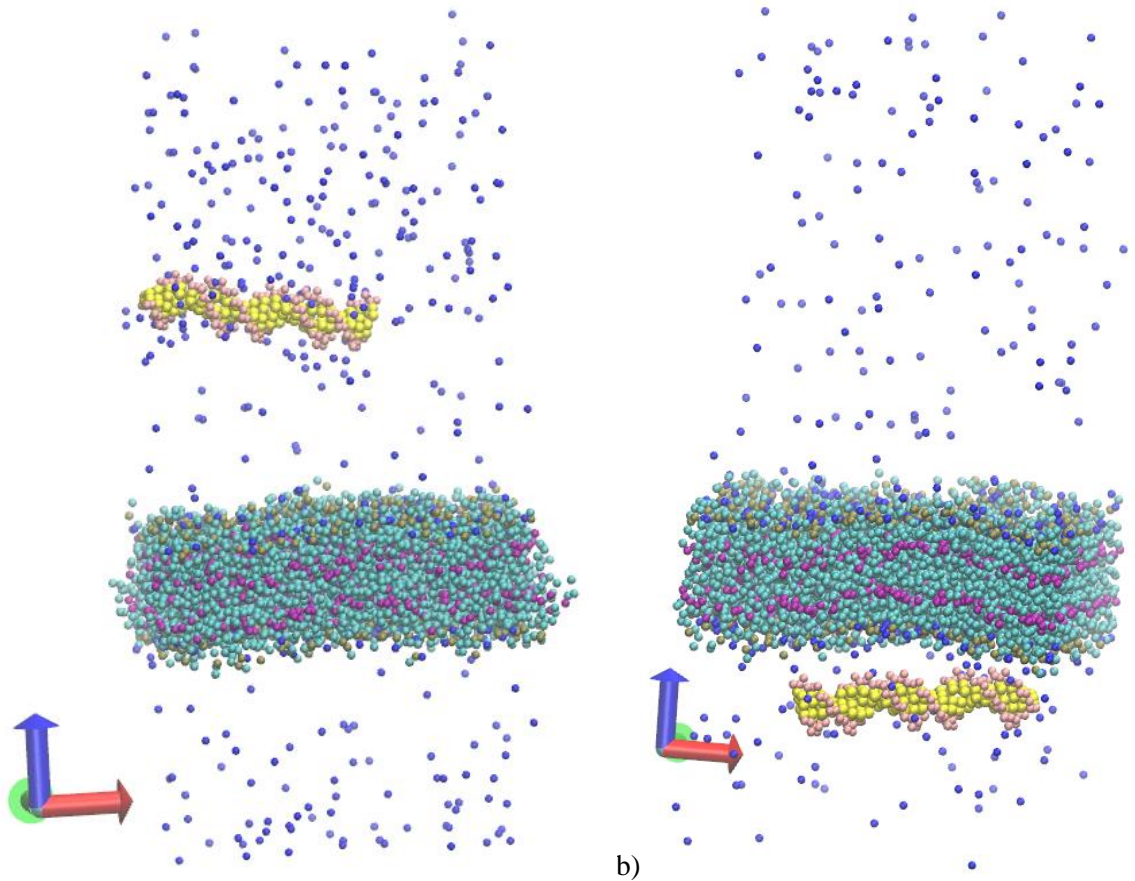
```
Potential Energy = -9.5329706e+05 kJ
Maximum force = 2.5974402e+02 N on atom 3828
Norm of force = 1.2082503e+01 N
```

Para el equilibrio de la energía se realizaron estadísticas sobre 250001 pasos usando 2501 marcos y nos dan valores de energía. Además, vamos a conseguir los valores de energía del eje de cada caja y los valores de presión para cada uno de los átomos de interacción.

Energies (kJ/mol)				
Bond	Angle	G96Angle	Proper Dih.	Improper Dih.
9.90027e+03	2.53662e+02	5.02828e+03	7.46745e+01	2.82373e+02
LJ (SR)	Coulomb (SR)	Potential	Kinetic En.	Total Energy
-8.19358e+05	-7.33506e+03	-8.11154e+05	1.31769e+05	-6.79384e+05
Conserved En.	Temperature	Pressure (bar)	Constr. rmsd	
-9.04848e+05	3.19788e+02	3.67591e+00	0.00000e+00	
Box-X	Box-Y	Box-Z		
1.27103e+01	1.27103e+01	2.65976e+01		
Total Virial (kJ/mol)				
4.34975e+04	-9.69998e+00	-1.07570e+02		
-9.69885e+00	4.34286e+04	-1.40385e+00		
-1.07575e+02	-1.40045e+00	4.35852e+04		
Pressure (bar)				
4.14819e+00	1.00199e-01	7.12730e-01		
1.00190e-01	4.01744e+00	4.91881e-02		
7.12763e-01	4.91618e-02	2.86209e+00		

Gráfico 10-3: Resultados de energías, presión y temperatura del sistema 3 total y de cada caja con los átomos de interacción.

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria., 2022.



a) b)
Gráfico 11-3: Simulación del sistema 3: Lípido (DOPS) + ADN + Sin Sal (Sin NaCl). a) Antes de darle los parámetros de simulación. b) Después de darle los parámetros de simulación
 Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria., 2022.

3.1.4. Sistema 3: Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H₂O

Tabla 7-3: Cambio del tamaño de caja, valores de distancia y concentración para el sistema 3

FORMACIÓN DEL SISTEMA	TAMAÑO DE LA CAJA (nm)	DISTANCIA (nm)	CONCENTRACIÓN (mol/l)	CARGA (C/m ²)
<i>Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H₂O</i>	-x: 12 -y: 12 -z: 20	-dm: 3.5	-sol W: 90 -sol WF: 10 -sold: 0.47 -salt: 0.15	BICAPA: -450 ADN: -4 DOPS: - Na: +1 Cl: -1 H: +1 O: -2

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria., 2022.

3.1.4.1. Centrado y solvatación del sistema

Realizamos el mismo proceso, pero ahora para este sistema. Tomando en cuenta la rotación de la molécula de ADN la recentramos moviendo la posición de la molécula con GROMACS y aumentamos agua en el sistema, es decir, lo solvatamos con el fichero inicial DOPS_ADN.gro y nos da uno de salida. También quitamos el agua que se encuentra por los lípidos y el ADN usando VMD.

3.1.4.2. Topología del sistema

A diferencia del primer sistema, ahora cambiamos el valor -sold que es el diámetro del solvente por el diámetro de Martini que debe ser 0.47nm, también se cambió la concentración del W y de WF, además se añadió la concentración de la sal y finalmente se generó un fichero de topología.

Protein	1
DOPS	225
DOPS	225
W	19296
WF	2144
NA+	461
CL-	11

Por último, guardamos el sistema quitando el agua que se solapa con la membrana y el ADN con VMD y se cambia el valor del agua de la parte externa para equilibrar la carga del sistema.

3.1.4.3. Minimización y Equilibrio de la Energía

Se minimiza la energía y se observa que los descensos más pronunciados convergieron a la precisión de la máquina en 4662 pasos, pero no alcanzó el $F_{max} < 10$ solicitado, es lo mismo que sucedía en el caso anterior.

Potential Energy = -7.9973312e+05 kJ

Maximum force = 2.1955446e+02 N on atom 1104

Norm of force = 1.0905734e+01 N

Para el equilibrio de la energía se realizaron estadísticas sobre 250001 pasos usando 2501 marcos y nos dan valores de energía. Además, vamos a conseguir los valores de energía del eje de cada caja y los valores de presión para cada uno de los átomos de interacción.

Energies (kJ/mol)					
Bond	Angle	G96Angle	Proper Dih.	Improper Dih.	
9.90924e+03	2.53372e+02	4.92110e+03	7.47018e+01	2.80636e+02	
LJ (SR)	Coulomb (SR)	Potential	Kinetic En.	Total Energy	
-6.77462e+05	-9.60471e+03	-6.71628e+05	1.09997e+05	-5.61631e+05	
Conserved En.	Temperature	Pressure (bar)	Constr. rmsd		
-5.93056e+05	3.19983e+02	1.28145e+00	0.00000e+00		
Box-X	Box-Y	Box-Z			
1.25655e+01	1.25655e+01	2.25020e+01			
Total Virial (kJ/mol)					
3.65967e+04	-6.95560e+00	5.58020e+00			
-6.95565e+00	3.65153e+04	-7.55783e+00			
5.57876e+00	-7.55722e+00	3.64862e+04			
Pressure (bar)					
1.31180e+00	-1.05333e-01	-5.35461e-03			
-1.05332e-01	1.18674e+00	6.28388e-02			
-5.34111e-03	6.28331e-02	1.34581e+00			

Gráfico 12-3: Resultados de energías, presión y temperatura del sistema 2 total y de cada caja con los átomos de interacción

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria., 2022.

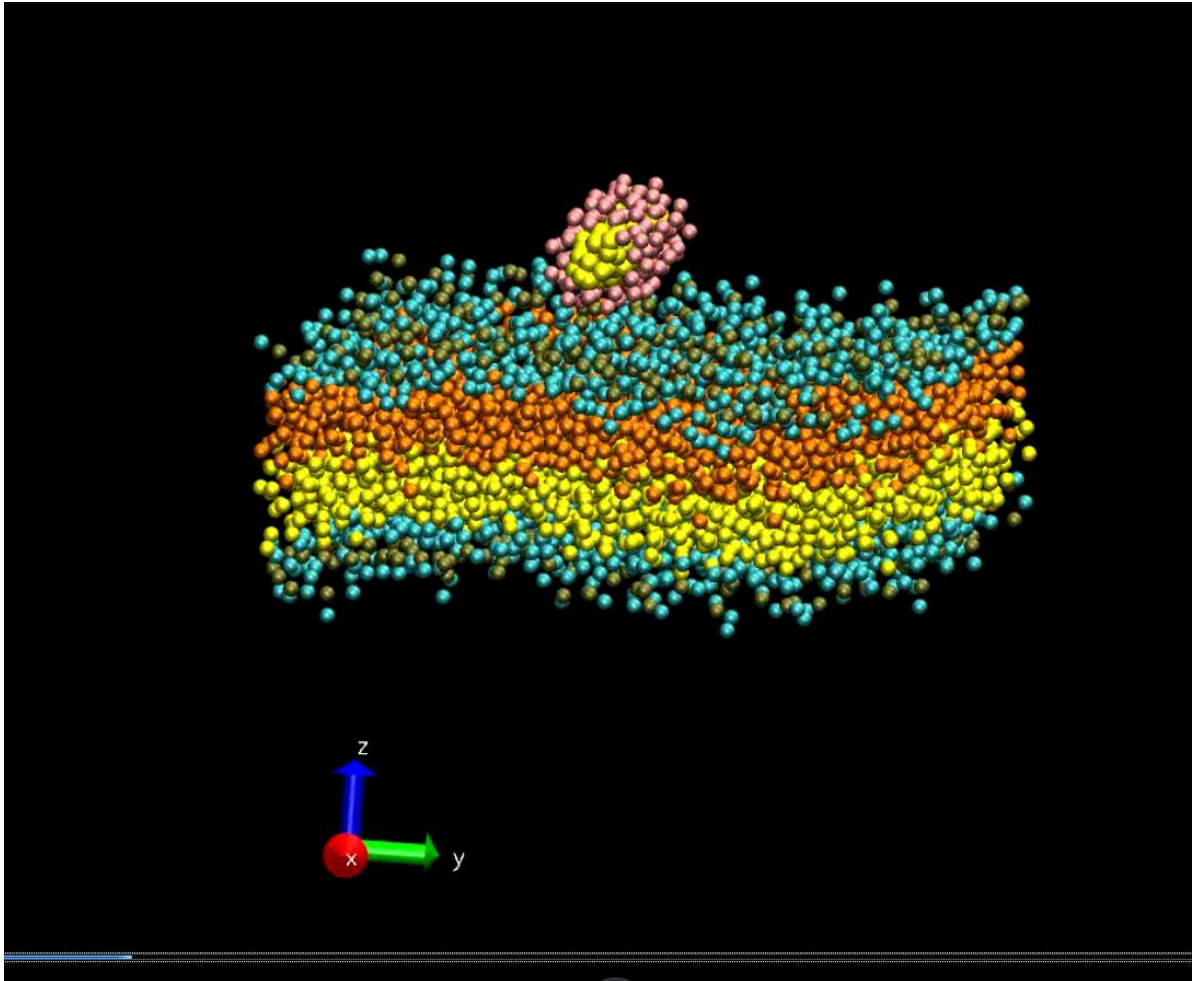


Gráfico 13-3: Video de la simulación del sistema 2: Lípido (DOPS) + ADN + Sal (NaCl)
Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria., 2022.

3.2. Valores de los resultados obtenidos de los diferentes sistemas

Tabla 8-3: Comparación de los valores obtenidos en cada sistema

FORMACIÓN DEL SISTEMA	RESULTADOS	VALORES
Bicapa +ADN + H₂O	<i>Energía total</i> <i>Temperatura</i> <i>Presión</i> <i>Constante dieléctrica</i> <i>Fuerza Electrostática</i> <i>Tiempo</i>	-5.62309e+05 kJ/mol 3.20014e+02 K 1.06245e+00 bar 15 -1.01236e+04 N 2027.24 s
Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sin Sal (Sin NaCl + H₂O)	<i>Energía total</i> <i>Temperatura</i> <i>Presión</i> <i>Constante dieléctrica</i> <i>Fuerza Electrostática</i> <i>Tiempo</i>	-6.82446e+05 kJ/mol 3.20024e+02 K 1.08274e+00 bar 15 -9.77352e+03 N 1323.026 s
Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H₂O	<i>Energía total</i> <i>Temperatura</i> <i>Presión</i> <i>Constante dieléctrica</i> <i>Fuerza Electrostática</i> <i>Tiempo</i>	-5.62030e+05 kJ/mol 3.20035e+02 K 9.87259e-01 bar 15 -9.98117e+03 N 1040.577 s

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria, 2022.

En la tabla 8.3 podemos visualizar los valores de los diferentes sistemas realizados. Si comparamos cada uno de los valores obtenidos, podemos observar que el valor de la energía es mayor en el primer sistema (-5.62309e+05 kJ) el cual está formado por Bicapa +ADN + H₂O. La temperatura se mantiene casi en el mismo orden en los 3 sistemas, a diferencia de la presión que en el sistema formado por Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H₂O es mucho más bajo (9.87259e-01 bar) los valores de los resultados con los cambios en los parámetros expuestos se deben a las interacciones moleculares de los diferentes sistemas, ya que estas vieron afectadas de las iniciales.

Las interacciones electrostáticas se dan entre iones (cationes y aniones) las cuales tienen carga positiva y negativa respectivamente, estas interacciones pueden ser atractivas o repulsivas lo cual dependerá de los signos de las cargas. Nosotros sabemos que las cargas del mismo signo se repelen mientras que las de signo contrario se atraen. Una de las principales causas por las que la presión sea baja en el sistema con NaCl es porque las interacciones electrostáticas son favorables porque son muy fuertes, estas interacciones electrostáticas dentro de un cristal de cloruro de sodio se llaman enlaces iónicos. Se consideran interacciones no covalentes cuando un solo catión y anión están juntos dentro de una proteína o dentro de un ADN o ARN plegado, estas pueden ser fuertes y de largo alcance.

Temperature VS Pressure

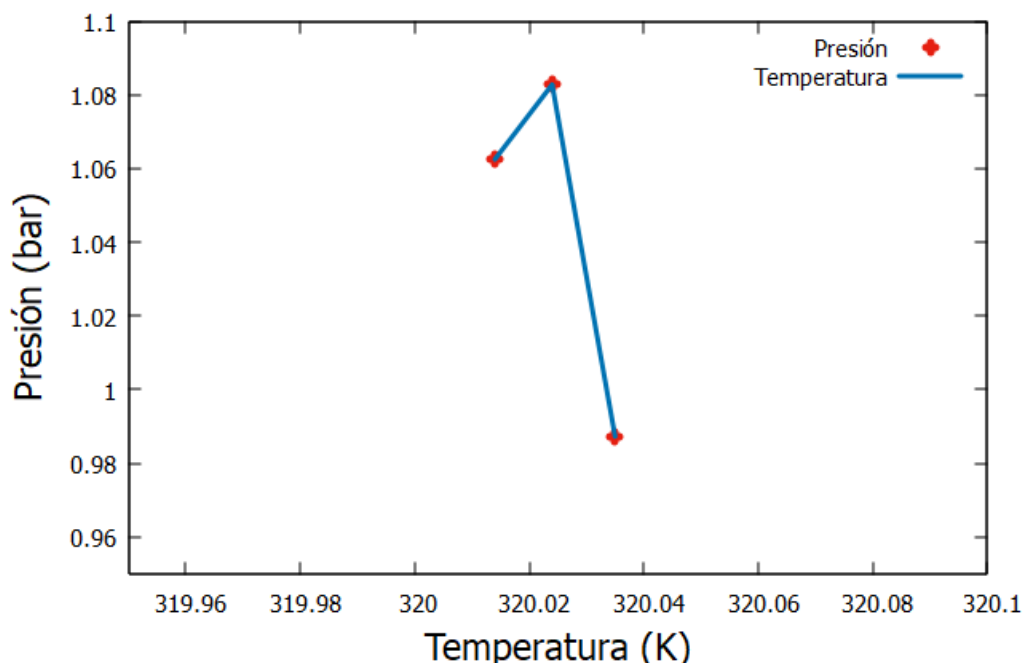


Gráfico 14-3: Gráfico de Temperatura VS Presión de los sistemas 1, 2 y 3, correspondientes a 1) Bicapa +ADN + H₂O a una distancia -dm: 0 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47 (mol/l) y cargas de BICAPA: -450, ADN: -4, H: +1, O: -2 (C/m²); 2) Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sin Sal (Sin NaCl + H₂O) a una distancia de -dm: 15 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47 (mol/l) y cargas de BICAPA: -450, DOPS: +, ADN: -4, H: +1, O: -2, Na: 0, Cl: 0 (C/m²) y 3) Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H₂O a una distancia de -dm: 3.5 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -salt: 0.15 (mol/l) y cargas BICAPA: -450, DOPS: +, ADN: -4, H: +1, O: -2, Na: +1, Cl: -1 (C/m²)

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria, 2022.

Cabe mencionar que las fuerzas electrostáticas disminuyen gradualmente con respecto a la distancia ($\frac{1}{r^2}$), donde r es la distancia entre los iones. La principal interacción estabilizadora entre los oxígenos de los fosfatos del ADN (carga = -1) y los iones de magnesio (carga = +2), son las interacciones electrostáticas, en el plegamiento de las proteínas, del ARN y la hibridación del ADN dichas interacciones dependen de la concentración de sal y del pH del medio. Se dice que las interacciones electrostáticas entre las cadenas laterales de aminoácidos aniónicos y catiónicos son frecuentes en las proteínas, los pares de iones conocidos como puentes salinos se forman cuando un grupo de un aminoácido catiónico se sitúa a 3.0 a 5.0 Å alrededor del grupo de un aminoácido aniónico los cuales están unidos por interacciones electrostáticas además de los enlaces de hidrogeno.

Dado a que los iones en una solución acuosa generalmente tienden a permanecer solvatados, eso quiere decir que solo interaccionan brevemente. En las moléculas en las que el ion (catión o anión)

está encerrado en regiones de la molécula este tiene poco contacto con el agua, por lo tanto, buscarán a un ion de carga opuesta para formar las interacciones electrostáticas siempre y cuando los iones se puedan acercar lo suficiente. Tomando en cuenta que nuestra molécula de ADN (carga negativa) encierra al lípido (DOPS), dando lugar al lipoplejo y junto con la bicapa se encuentran en una solución acuosa estas interaccionaron solo por momentos, por ello se buscó añadir sal (NaCl) para que se formen las interacciones electrostáticas a medida que se vayan acercando.

La constante dieléctrica ϵ refleja la tendencia del medio a apantallar especies cargadas unas de las otras. En el vacío ϵ es 1, en el interior de una proteína es alrededor de 4 y en el agua es 80. En los sistemas biológicos es complejo calcular los efectos electrostáticos, una de las causas es por la falta de uniformidad del entorno dieléctrico. Los microambientes dieléctricos son complejos y existen tanto variables con menor apantallamiento de cargas en regiones de cadenas laterales de los hidrocarburos como variables con mayor apantallamiento en regiones de cadenas laterales polares. En nuestros sistemas formados ϵ permanece constante y tomando en cuenta todo lo mencionado podemos decir que las fuerzas electrostáticas en el sistema 2 formado por Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H₂O no son tan débiles y llega un punto en el que el sistema se vuelve estable. Vale la pena mencionar que el fenómeno de la Doble Capa Eléctrica (DCE) se da cuando la estructura de iones está en torno a una superficie cargada, desde hace tiempo este modelo ha sido estudiado mediante modelos que se basan en la ecuación de Poisson-Boltzmann (EPB). Sin embargo, dicho formalismo en presencia de iones multivalentes no tiene la capacidad para describir de manera correcta la DCE. Los modelos basados en la EPB visto clásicamente consideran a los iones como cargas puntuales, por lo tanto, no tienen en cuenta las correlaciones iónicas que se dan gracias a su tamaño. De cierta manera, este es el motivo por el cual los modelos basados en la EPB no pueden explicar el fenómeno de la sobrecarga sin considerar otros factores.

Se debe destacar también el fenómeno de la sobrecarga que también se lo conoce como inversión de carga, este es un proceso mediante el cual una partícula coloidal cargada puede llegar a comportarse como si tuviera una carga de signo contrario en presencia de un electrolito. Dicho efecto se ve favorecido cuando el electrolito es de tipo asimétrico, siendo el contraión quien presenta una valencia mayor que la unidad, por lo que ha tenido algunas aplicaciones, una de las más destacadas es aquella destinada a provocar una sobrecarga en las moléculas de ADN de ciertos virus para combatir algunas de las infecciones dadas.

El modelo primitivo DCE por el contrario si tiene en cuenta el tamaño iónico de las moléculas y de esta manera podemos estudiar el efecto de las correlaciones de corto alcance las cuales se deben al volumen de exclusión de los iones con el uso de las teorías mecano estadísticas o simulaciones de

Monte Carlo. El estudio de los coloides en presencia de electrolitos multivalentes en los últimos años ha sido de gran interés tanto a nivel industrial, tecnológico, pero sobre todo científico.

Computacionalmente se ha estimado aproximadamente la energía de interacción carga-carga de los sistemas, además fueron corroborados con cálculos, sin embargo, la mejor manera para obtenerlos fue ayudándonos de un software, en este caso GROMACS ejecutado en la terminal de Ubuntu. La energía total de interacción del sistema 2 fue de $-5.62030e+05$ kJ/mol, dicho sistema es aquel que se logró estabilizar en un cierto punto de la simulación. También es importante mencionar el tiempo que dura cada simulación, en este caso es en segundos, el tiempo del primer sistema es de 2027.24 s, del segundo 1040.577 s y del tercero 1323.026 s, pero el tiempo que se demoró en la obtención de los resultados fue de 3 días.

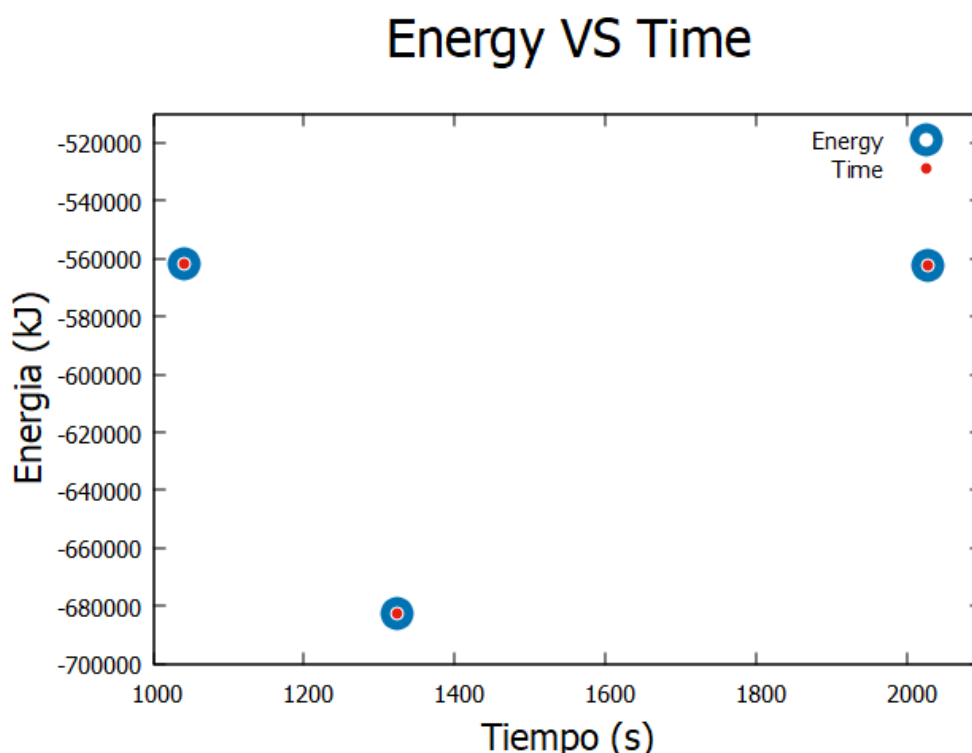


Gráfico 15-3: Gráfico de Energía total VS Tiempo de los sistemas 1, 2 y 3, correspondientes a 1) Bicapa +ADN + H₂O a una distancia -dm: 0 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47 (mol/l) y cargas de BICAPA: -450, ADN: -4, H: +1, O: -2 (C/m²); 2) Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sin Sal (Sin NaCl + H₂O) a una distancia de -dm: 15 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47 (mol/l) y cargas de BICAPA: -450, DOPS: +, ADN: -4, H: +1, O: -2, Na: 0, Cl: 0 (C/m²) y 3) Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H₂O a una distancia de -dm: 3.5 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47, -salt: 0.15 (mol/l) y cargas BICAPA: -450, DOPS: +, ADN: -4, H: +1, O: -2, Na: +1, Cl: -1 (C/m²)

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria, 2022.

En el gráfico 15-3 podemos observar que los valores de energía total determinados para cada sistema son negativos, teniendo en cuenta los parámetros de distancia, concentración y carga. El sistema con energía más alta es el primero (Bicapa +ADN + H₂O), mientras que el sistema con menor energía es el segundo (Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sin Sal (Sin NaCl + H₂O)) y la energía del tercer sistema (Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H₂O) es la intermedia todo esto se debe a lo descrito anteriormente, las interacciones electrostáticas son las responsables del comportamiento de los aniones y cationes del sistema, además en esta investigación se buscó que dichas interacciones se haga entre aniones lo que fue posible en un periodo corto de tiempo y también gracias al modelo primitivo de la doble capa eléctrica. Con respecto al tiempo se puede decir que el más corto fue del segundo sistema (sin sal), mientras el más largo fue del primer sistema porque da lugar a la formación del mismo.

Force VS Distance

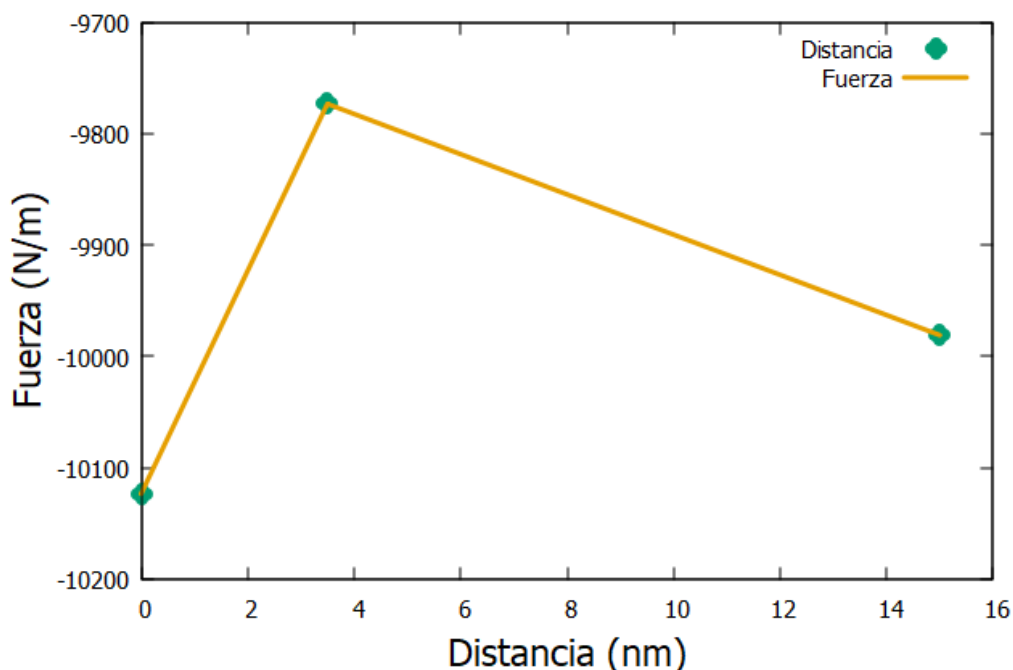


Gráfico 16-3: Gráfico de Fuerza VS Distancia de los sistemas 1, 2 y 3, correspondientes a 1) Bicapa +ADN + H₂O a una distancia -dm: 0 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47 (mol/l) y cargas de BICAPA: -450, ADN: -4, H: +1, O: -2 (C/m²); 2) Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sin Sal (Sin NaCl + H₂O) a una distancia de -dm: 15 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47 (mol/l) y cargas de BICAPA: -450, DOPS: +, ADN: -4, H: +1, O: -2, Na: 0, Cl: 0 (C/m²) y 3) Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H₂O a una distancia de -dm: 3.5 nm, con concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47, -salt: 0.15 (mol/l) y cargas BICAPA: -450, DOPS: +, ADN: -4, H: +1, O: -2, Na: +1, Cl: -1 (C/m²)

Realizado por: Cevallos Luzuriaga, Victoria, 2022.

CONCLUSIONES

- ❖ En este trabajo de titulación se buscó estabilizar molecularmente el comportamiento de un lipoplejo aniónico, en este caso fue el DOPS, pero debido a la carga negativa del grupo polar del lípido aniónico resultaba imposible la asociación con el ADN (carga negativa), según la literatura se debe a que la fuerza electrostática existente entre los grupos fosfato del ADN y el grupo aniónico del lípido es repulsiva. A pesar de esto, es posible que dicho efecto se mitigue si se usa cationes divalentes los cuales anulan las repulsiones electrostáticas, facilitando la formación del sistema. En las siguientes conclusiones se detallará la formación del sistema y la interacción con la membrana.
- ❖ Mediante el uso de grano grueso (CG) de Martini se pudo construir el sistema inicial, el ADN fue descargado de la página de Martini. Cabe destacar que el sistema simulado es uno pequeño. El tamaño de la caja fue de 12x12x20 nm, en dicha caja se configuró el ADN (cilindro) el cual tenía una carga negativa y la bicapa lipídica (plano). De igual manera se tomó el lípido DOPS y una vez que se tuvo la caja, se creó la bicapa lipídica con un grosor de 5 nm en un medio acuoso.
- ❖ Para el sistema se consideró algunos parámetros como el tamaño de la caja, la distancia entre el ADN y la membrana, la concentración y las cargas. Para el sistema 1 formado por Bicapa + ADN + H₂O, con un grosor de 5 nm, distancia -dm = 0 nm, concentraciones de -sol W: 90, sol WF: 10, -sold: 0.47 y cargas BICAPA: -450, ADN: -4, H: +1, O: -2. En el sistema 2 formado por Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sin Sal (Sin NaCl + H₂O), con una dimensión de -x: 12, -y: 12, -z: 30, distancia -dm: 15 nm, concentraciones de -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47 y cargas BICAPA: -450, DOPS: +, ADN: -4, H: +1, O: -2, Na: 0, Cl: 0. Para el sistema 3 formado por Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H₂O, con una dimensión de -x: 12, -y: 12, -z: 20, distancia -dm: 3.5 nm, concentraciones -sol W: 90, -sol WF: 10, -sold: 0.47, -salt: 0.15 y cargas BICAPA: -450, DOPS: +, ADN: -4, H: +1, O: -2, Na: +1, Cl: -1. Con la ayuda de GROMACS, la variación de estos parámetros nos permitió observar el comportamiento de cada sistema.
- ❖ Se pudo estudiar y comparar los resultados obtenidos de manera computacional con los cambios realizados en los diferentes parámetros para la estabilización del lipoplejo. Mediante el uso de GROMCAS en Linux se pudo estimar aproximadamente la energía de interacción

carga-carga de los sistemas. Los valores de energía total determinados para cada sistema son negativos. El sistema con energía más alta es el primero (Bicapa + ADN + H₂O) con un valor de -5.62309e+05 kJ/mol, mientras que el sistema con menor energía es el segundo (Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sin Sal (Sin NaCl + H₂O)) cuyo valor fue de -6.82446e+05 kJ/mol y la energía del tercer sistema (Bicapa + ADN + Lípido (DOPS) + Sal (NaCl) + H₂O) con un valor de -5.62030e+05 kJ/mol es la intermedia. La energía total de interacción del sistema 2 (Bicapa + Lípido (DOPS) + ADN + Sal (NaCl)) fue de -5.62030e+05 kJ/mol, uno de los factores determinantes para la energía de interacción es que las fuerzas electrostáticas disminuyen gradualmente con respecto a la distancia $\left(\frac{1}{r^2}\right)$, donde r es la distancia entre los iones.

- ❖ El sistema 2 es aquel que se logra estabilizar por un periodo de tiempo corto (2 s) en un cierto punto de la simulación, esto se debe a la adición de los iones de sal en el sistema, puesto que estos se vieron atraídos por la carga negativa de la membrana. Esto se logra entender gracias al fenómeno de la doble capa eléctrica que se caracteriza por cuantificar las fuerzas de interacción electrostática entre la superficie de la fibra cargada y los iones electrolíticos que están a su alrededor, siendo biocompatible con la membrana la cual llega a tener un comportamiento positivo. Además, la presión en este sistema fue baja con un valor de 9.87259e-01 bar y una de las principales causas es porque las interacciones electrostáticas son fuertes. En los sistemas formados la constante dieléctrica (ϵ) permanece constante con un valor de 15 y tomando en cuenta todo lo mencionado podemos decir que las fuerzas electrostáticas en el sistema 2 no son tan débiles y llega un punto en el que el sistema se vuelve estable.
- ❖ Ya se mencionó en la conclusión anterior que el sistema 2 fue el que se pudo estabilizar por periodo de tiempo corto, ahora, los parámetros que nos permitieron ver que el lipoplejo estaba estable fueron que los iones en una solución acuosa generalmente permanecen solvatados, es decir, su interacción es breve, la membrana buscó a un ion de carga opuesta (iones de sal) para formar las interacciones electrostáticas siempre y cuando los iones se puedan acercar lo suficiente. Es importante mencionar el tiempo de duración de cada simulación, en este caso en la escala de los segundos, el tiempo del primer sistema es de 2027.24 s, del segundo 1040.577 s y del tercero 1323.026 s, con lo que se puede decir que el mayor tiempo fue del primer sistema, puesto que se inicia la formación de este, pero el tiempo que se demoró en la obtención de los resultados de los diferentes valores fue de 3 días.

RECOMENDACIONES

- ❖ La simulación ha aportado al mundo de la ciencia e investigación, además se puede decir que es una herramienta de fácil acceso, eficaz y económica con relación a los procesos experimentales. Sin embargo, para su uso es indispensable contar con un ordenador de excelentes capacidades y características para poder obtener los resultados de los sistemas moleculares de manera clara y sin trabas.
- ❖ En el mundo de la dinámica molecular existe un estrecho lazo con la física y química cuánticas, por lo que, es prescindible tener a profesionales que estén familiarizados en las áreas y por supuesto, con su colaboración.
- ❖ Se recomienda realizar un estudio enfocado a explorar lo que sucedería en este pequeño intervalo de estabilización, logrando que el lipoplejo interactúe y traslape la bicapa, dándose así la endocitosis, saliendo un endosoma que posteriormente se escapará y se dividirá en la fragmentación de ADN y el lisosoma ya que era la unión de un endosoma con el lípido.
- ❖ Se podría estudiar también el efecto de la variación de las colas de los lípidos, manteniendo algunos de los parámetros del lipoplejo constantes, es muy probable que en el futuro se pueda investigar el papel de los grupos de la cabeza de los lípidos y sus proporciones de carga ya que sabemos que esto afecta a la transfección. Cabe destacar también que es muy probable que tomando en cuenta la relación ADN/lípido pueda que la proporción y el tamaño de los fragmentos de ADN desempeñen un papel importante. Algo interesante que se podría ver es hasta el punto de que dichos cambios en los parámetros alteran las rutas de fusión observadas y así poder dar conocimiento sobre el proceso.

GLOSARIO

Terapia génica: Según (Laffon, Valdiglesias y Pasaro Mendez, 2015) actualmente, la información genética de las células con genes defectuosos puede modificarse introduciendo genes normales y es posible cambiar la composición genética de una célula introduciendo genes normales para reemplazar los defectuosos. Así, la terapia génica se puede definir como un conjunto de tecnologías que permiten la introducción de fragmentos de ADN o ARN en células de interés (células diana) para modular la expresión de determinadas proteínas las cuales sufren de alteraciones, con ello es posible revertir los efectos biológicos de las alteraciones proteicas producidas.

Vectores: En el libro de (Laffon, Valdiglesias y Pasaro Mendez, 2015) denominado *Terapia Génica* menciona que Edward Tatum en 1966, publicó un artículo en el que proponía que los virus pudiesen usarse para introducir genes en células de interés, es decir, actuarían como vehículos para esos genes. Además, generalmente un gen se transporta a través del torrente sanguíneo mediante el uso de transportadores llamados vectores. Hoy en día existen dos grandes grupos de sistemas que se usan para la liberación de genes: vectores virales y los vectores no virales (Morishita, Ryuichi, and Nakagami, Hironori, 2013).

Vectores virales: (Laffon, Valdiglesias y Pasaro Mendez, 2015) mencionan que, esencialmente los vectores virales utilizados en la terapia génica son en realidad virus modificados con los que el paciente es infectado. Los virus depositan su material genético en los núcleos de las células a las cuales infectan, como resultado de la expresión del material genético se obtiene la proteína que se desea para la terapia. Al emplear vectores virales, el tamaño del gen que puede ser transferido depende del volumen (tamaño) del virus y es un factor limitante al momento de insertar genes de gran longitud. Los vectores virales se obtienen eliminando uno o más genes necesarios para la replicación viral y reemplazándolos con genes terapéuticos. De esta manera el virus nuevo es defectivo, esto significa que conserva la capacidad de infectar a las células, pero no es capaz de replicarse en ellas.

Vectores no virales (NVV): (Laffon, Valdiglesias y Pasaro Mendez, 2015) proponen que los métodos de entrega fisicoquímicos o vectores no virales representan un intento de usar sistemas sintéticos para imitar la función de los virus como vehículos de entrega de genes, por lo que en principio son vectores y más seguros desde el punto de vista de su riesgo biológico y patogenicidad. En este sentido, los vectores no virales son conceptualmente indistinguibles de los fármacos a los que estamos acostumbrados. (Morishita, Ryuichi, and Nakagami, Hironori, 2013) en su libro *“Gene Therapy: Technologies and Applications”* dicen que, aunque los vectores virales ofrecen una mayor eficacia, los vectores no

virales, que suelen basarse en lípidos o polímeros catiónicos, se han investigado intensamente durante décadas como una alternativa atractiva. Los vectores no virales presentan ventajas como un perfil de seguridad potencialmente mejorado, flexibilidad en el tamaño del gen entregado y menor inmunogenicidad.

Endosomas: Pueden ser organelos citoplasmáticos estables o estructuras temporales formadas como resultados de procesos intracelulares (endocitosis); se dividen en dos (tempranos y tardíos). Los endosomas tempranos se encuentran restringidos a una región del citoplasma cercana a la membrana celular. Sin embargo, un gran número de vesículas que son originadas en los endosomas tempranos viajan hacia estructuras más profundas del citoplasma, estas son conocidas como endosomas tardíos, donde se convierten en lisosomas (Evered y Collins, 2009).

Transfección: Según (Amir Al-Ahmed, 2014) es la entrega de ADN, ARN y macromoléculas en las células objetivo del paciente. Es una técnica desarrollada originalmente para permitir que las células infectadas capten ADN purificado en lugar de partículas virales o no virales intactas. En la terapia génica, el ADN puede administrarse in vivo o ex vivo.

Endocitosis: Proceso por el cual las células capturan partículas del ambiente externo al penetrar la membrana que consta las partículas que serán ingeridas. Se produce una intususcepción, creando un saco de agua que rodea el material ingerido. Dependiendo de la naturaleza de las partículas envueltas, se pueden distinguir diferentes tipos de endocitosis. Tomado de (Evered y Collins, 2009) del libro "*Membrane Recycling*".

Fosfatidilcolina: Es uno de los principales lípidos de las membranas celulares animales, derivándose de los fosfolípidos. Su principal sitio de síntesis es en el retículo endoplasmático, algo en la mitocondria. Los mecanismos de exportación se dan por las proteínas ABC, endocitosis / exocitosis como parte de las lipoproteínas. Su transporte intracelular se da a través del envasado en lipoproteínas (Evered y Collins, 2009).

BIBLIOGRAFÍA

AL-DULAYMI, M., MOHAMMED-SAEID, W., EL-ANEED, A. y BADEA, I., Peptide-modified gemini surfactants: Preparation and characterization for gene delivery. *Methods in Molecular Biology* [en línea]. S.l.: Humana Press Inc., 2019. pp. 203-225. [Consulta: 12 agosto 2020]. Disponible en: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-9516-5_14.

AMIR AL-AHMED, and M.A.J.M., Materials for Biomedical Applications. *Trans Tech Publications* [en línea]. 2014. [Consulta: 12 abril 2022]. Disponible en: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/epoch/reader.action?docID=1910879&query=lipoplex>.

ANDRADE, S.K.S., Simulación por Dinámica Molecular del Empleo de las Saponinas Dioscina y Escina como Tensoactivos en la Extracción de Petróleo. [en línea], [sin fecha]. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/38257> LK - link%7C<http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/38257> SRC - BaiduScholar FG - 0.

ARBUTHNOT, P., Gene Therapy for Viral Infections. *Elsevier Science & Technology* [en línea]. 2015. [Consulta: 12 abril 2022]. Disponible en: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/epoch/reader.action?docID=2060793&query=lipoplex>.

BAEZ-CASTILLO, L., Simulación por dinámica molecular de membranas de fosfolípidos usando GROMACS. [en línea], pp. 156. 2013. Disponible en: <http://repositorioinstitucional.uson.mx/handle/unison/1723>.

BALBUENA, L., MALDONADO-ARCE, A. y ZAPATA, E., Elasticidad de las membranas biológicas. Martínez- y Hernández- *Revista Mexicana de Física*, Vol. 56, págs. . En: [Original String]:Elasticidad de las membranas biológicas. Martínez-Balbuena, L., Maldonado-Arce, A. y Hernández-Zapata, E. 2010. 1, 2010, *Revista Mexicana de Física*, Vol. 56, págs. 107-122., vol. 1 SRC-B, pp. 107-122. 2010.

BARRÁN-BERDÓN, A.L., MISRA, S.K., DATTA, S., MUÑOZ-ÚBEDA, M., KONDAIAH, P., JUNQUERA, E., BHATTACHARYA, S. y AICART, E., Cationic gemini lipids containing polyoxyethylene spacers as improved transfecting agents of plasmid DNA in cancer cells.

Journal of Materials Chemistry B [en línea], vol. 2, no. 29, pp. 4640-4652. 2014. [Consulta: 11 abril 2022]. ISSN 2050-7518. DOI 10.1039/C4TB00389F. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/tb/c4tb00389f>.

BRITANNICA, membrane | Definition, Structure, & Functions | Britannica. *Encyclopedia Britannica* [en línea]. 2007. [Consulta: 12 abril 2022]. Disponible en: <https://www.britannica.com/science/membrane-biology>.

BRUININKS, B.M., SOUZA, P.C., INGOLFSSON, H. y MARRINK, S.J., A molecular view on the escape of lipoplexed DNA from the endosome. *eLife* [en línea], vol. 9. [sin fecha]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=32297853&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

BRUININKS, B.M.H., SOUZA, P.C.T., INGOLFSSON, H. y MARRINK, S.J., A molecular view on the escape of lipoplexed dna from the endosome. *eLife*, vol. 9, pp. 1-16. 2020. ISSN 2050084X. DOI 10.7554/eLife.52012.

BRUININKS, B.M.H., SOUZA, P.C.T. y MARRINK, S.J., A Practical View of the Martini Force Field. *Methods in Molecular Biology* [en línea]. S.I.: Humana Press Inc., 2019. pp. 105-127. [Consulta: 12 agosto 2020]. Disponible en: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-9608-7_5.

BUEREN-CALABUIG, J.A., Dinámica molecular. *Bioinformática*, pp. 425-442. 2014.

DELGADO, M.G., SANTAMARTA, E., SÁIZ, A., LARROSA, D., GARCÍA, R. y OLIVA, P., Fluctuating neurological symptoms in demyelinating disease mimicking an acute ischaemic stroke. *BMJ case reports* [en línea], vol. 2012. [sin fecha]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=22602832&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

EASTMAN, S.J., Biophysical characterization of cationic lipid:DNA complexes. En: [Original String]:Biophysical characterization of cationic lipid:DNA complexes. Eastman, S.J., y otros. 1997. 1, 1997, *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, Vol. 1325, págs. 41-62., y *otros Biochimica et Biophysica ActaBiomembranes Vol 1325 pgs*, vol. 1 SRC-B, pp. 41-62. 1997.

EASTMAN, S.J., SIEGEL, C., TOUSIGNANT, J., SMITH, A.E., CHENG, S.H. y SCHEULE, R.K., Biophysical characterization of cationic lipid:DNA complexes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1325, no. 1, pp. 41-62. 1997. ISSN 00052736. DOI 10.1016/S0005-2736(96)00242-8.

EVERED, D. y COLLINS, G.M., *Membrane Recycling* [en línea]. S.l.: Wiley. 2009. ISBN 9780470718438. Disponible en: <https://elibro.net/es/lc/epoch/titulos/179801>.

FRUCTUOSO, M., RACHDI, L., PHILIPPE, E., DENIS, R.G., MAGNAN, C., LE STUNFF, H., JANEL, N. y DIERSSEN, M., Corrigendum to «Increased levels of inflammatory plasma markers and obesity risk in a mouse model of Down syndrome» [Free Radic. Biol. Med. 114 (2018) 122-130]. *Free radical biology & medicine* [en línea], vol. 118, pp. 150. [sin fecha]. ISSN 0891-5849. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=29525132&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

GALLARDO, C.M. y VAN WELY, K.H.M., *El ADN* [en línea]. S.l.: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 2019. ISBN 9788400105211. Disponible en: <https://elibro.net/es/lc/epoch/titulos/120676>.

GARCÍA LUIS, M.H., *Coordinadores: Biología celular y molecular* [en línea]. S.l.: s.n. 2003. ISBN 9702603870. Disponible en: <https://oncousd.files.wordpress.com/2015/06/biologia-celular-y-molecular.pdf>.

HAMM, M. y KOZLOV, M.M., Elastic energy of tilt and bending of fluid membranes. *The European Physical Journal E* 2000 3:4 [en línea], vol. 3, no. 4, pp. 323-335. 2000. [Consulta:

11 abril 2022]. ISSN 12928941. DOI 10.1007/S101890070003. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s101890070003>.

HUANG, L. y LI, S., Liposomal gene delivery: A complex package. *Nature Biotechnology* [en línea], vol. 15, no. 7, pp. 620-621. 1997. [Consulta: 12 agosto 2020]. ISSN 10870156. DOI 10.1038/nbt0797-620. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nbt0797-620>.

ILLANA, J., Biología molecular y estructura del ADN. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, vol. 110, no. 3, pp. 234-240. 2014. ISSN 1575-3417.

ISRAELACHVILI, J.N., Intermolecular and Surface Forces: Third Edition. *Intermolecular and Surface Forces: Third Edition*, pp. 1-676. 2011. DOI 10.1016/C2011-0-05119-0.

JOHANSSON, M.P., y otros. En: [Original String]:Johansson, M.P., y otros. 2013. Biomolecular Simulations: methods and protocols. New York : Humana Press, 2013.SRC - BaiduScholarFG - 0, *Biomolecular Simulations methods and protocols New York Humana Press*, 2013.

LAFFON, B., VALDIGLESIAS, V. y PASARO MENDEZ, E., *Terapia genica* [en línea]. S.l.: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Cientificas. 2015. ISBN 9788400099060. Disponible en: <https://elibro.net/es/lc/epoch/titulos/41792>.

LEITE NASCIMENTO, T., HILLAIREAU, H., VERGNAUD, J., RIVANO, M., DELOMÉNIE, C., COURILLEAU, D., ARPICCO, S., SUK, J.S., HANES, J. y FATTAL, E., Hyaluronic acid-conjugated lipoplexes for targeted delivery of siRNA in a murine metastatic lung cancer model. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 514, no. 1, pp. 103-111. 2016. ISSN 18733476. DOI 10.1016/j.ijpharm.2016.06.125.

LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, et al., *Molecular Cell Biology 5th Ed* [en línea]. S.l.: s.n. 2000. ISBN 0716776014. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/%5Cnhttp://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=K3JbjG1JiUMC&pgis=1>.

MA, B., ZHANG, S., JIANG, H., ZHAO, B. y LV, H., Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *Journal of controlled release : official journal of the*

Controlled Release Society [en línea], vol. 123, no. 3, pp. 184-194. 2007a. [Consulta: 11 abril 2022]. ISSN 1873-4995. DOI 10.1016/J.JCONREL.2007.08.022. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17913276/>.

MA, B., ZHANG, S., JIANG, H., ZHAO, B. y LV, H., 2007b. *Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery*. 20 noviembre 2007. S.l.: Elsevier.

MARKVOORT, A.J. y MARRINK, S.J., Lipid Acrobatics in the Membrane Fusion Arena. *Current Topics in Membranes*, vol. 68, pp. 259-294. 2011. ISSN 1063-5823. DOI 10.1016/B978-0-12-385891-7.00011-8.

MARRINK, S.J. y MARK, A.E., Molecular Dynamics Simulation of the Formation, Structure, and Dynamics of Small Phospholipid Vesicles. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 125, no. 49, pp. 15233-15242. 2003. ISSN 00027863. DOI 10.1021/JA0352092.

MARRINK, S.J., RISSELADA, H.J., YEFIMOV, S., TIELEMAN, D.P. y DE VRIES, A.H., The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 111, no. 27, pp. 7812-7824. 2007a. ISSN 15206106. DOI 10.1021/jp071097f.

MARRINK, S.J., RISSELADA, H.J., YEFIMOV, S., TIELEMAN, D.P. y DE VRIES, A.H., The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 111, no. 27, pp. 7812-7824. 2007b. ISSN 15206106. DOI 10.1021/JP071097F.

MARTÍN MOLINA, A., Propiedades electrocinéticas de sistemas coloidales modelo: efecto del tamaño iónico. [en línea], 2003. [Consulta: 5 marzo 2022]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10481/28752>.

MARTÍNEZ-BALBUENA, L., MALDONADO-ARCE, A. y HERNÁNDEZ-ZAPATA, E., Elasticidad de las membranas biológicas. . S.l.: 2010.

MARTÍNEZ, M., Nuevas estrategias de compactación y Transfección De DN-RNA en terapia génica. , pp. 279. 2017.

MAY, S. y BEN-SHAUL, A., Modeling of Cationic Lipid-DNA Complexes. *Current Medicinal Chemistry* [en línea], vol. 11, no. 2, pp. 151-167. 2004. [Consulta: 12 agosto 2020]. ISSN 09298673. DOI 10.2174/0929867043456142. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=11&issue=2&spage=151>.

MORISHITA, RYUICHI, AND NAKAGAMI, HIRONORI, E., Gene Therapy: Technologies and Applications. *London: Future Medicine Ltd*, [en línea]. 2013. [Consulta: 1 junio 2022]. Disponible en: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/epoch/reader.action?docID=1179646>.

NELSON, D.L. y COX, M.M., Lehninger Principios de Bioquímica. [en línea], [sin fecha]. Disponible en: http://www.researchgate.net/publication/48214045_Lehninger_Principios_de_Bioquimica/download LK - link%7Chttp://www.researchgate.net/publication/48214045_Lehninger_Principios_de_Bioquimica/download SRC - BaiduScholar FG - 0.

PENA, A., *Las membranas de las células* [en línea]. S.l.: FCE - Fondo de Cultura Económica. 1986. ISBN 9786071603715. Disponible en: <https://elibro.net/es/lc/epoch/titulos/71969>.

PHILIP L YEAGLE, *The STRUCTURE of BIOLOGICAL*. S.l.: s.n. 2005. ISBN 0849314038.

RAFAEL, M.S., DOS SANTOS-JUNIOR, I.P., TADEI, W.P., SALLUM, M.A.M. y FORATTINI, O.P., Karyotype of Brazilian *Anopheles albiparvus* sensu lato (Diptera:Culicidae). *Genetics and molecular research : GMR* [en línea], vol. 4, no. 4, pp. 684-690. [sin fecha]. ISSN 1676-5680. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=16475113&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

RODRÍGUEZ, C. Caracterización físicoquímica de complejos mesoscópicos formados. En: [Original String]:Rodríguez, C. 2013. Caracterización físicoquímica de complejos mesoscópicos formados. Granada : Universidad de Granada. Departamento de física aplicada,

2013. F1645Y13518N2135.SRC - BaiduScholarFG - 0, *Granada Universidad de Granada Departamento de física aplicada F1645Y13518N2135*, 2013.

SAMANIEGO ANDRADE, S.K., Simulación por Dinámica Molecular del Empleo de las Saponinas Dioscina y Escina como Tensoactivos en la Extracción de Petróleo. , 2015.

SANCHEZ GONZALEZ, D.J., *Gebe Therapy for Viral Infections* [en línea]. S.l.: Editorial Alfil, S. A. de C. V. 2006. ISBN 9781449285913. Disponible en: <https://elibro.net/es/lc/epoch/titulos/72726>.

SEVERINO, P., SZYMANSKI, M., FAVARO, M., AZZONI, A.R., CHAUD, M. V., SANTANA, M.H.A., SILVA, A.M. y SOUTO, E.B., Development and characterization of a cationic lipid nanocarrier as non-viral vector for gene therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 66, pp. 78-82. 2015. ISSN 18790720. DOI 10.1016/j.ejps.2014.09.021.

SINGER, S.J. y NICOLSON, G.L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 175, no. 4023, pp. 720-731. 1972. ISSN 0036-8075 (Print). DOI 10.1126/science.175.4023.720.

Universidad de Granada; Junta de Andalucía. . Lipoplejos catiónicos. Andalucía : Universidad de Granada; Junta de Andalucía, . En: [Original String]:Universidad de Granada; Junta de Andalucía. 2019. Lipoplejos catiónicos. Andalucía : Universidad de Granada; Junta de Andalucía, 2019.SRC - BaiduScholarFG - 0, 2019.

Universidad de Sevilla. En: [Original String]:Universidad de Sevilla. 2019. Breve introducción a Gnuplot. Sevilla : Universidad de Sevilla, 2019.SRC - BaiduScholarFG - 0, *Breve introducción a Gnuplot Sevilla Universidad de Sevilla*, 2019.

UUSITALO, J.J., INGÓLFSSON, H.I., MARRINK, S.J. y FAUSTINO, I., Martini Coarse-Grained Force Field: Extension to RNA. *Biophysical Journal*, vol. 113, no. 2, pp. 246-256. 2017. ISSN 15420086. DOI 10.1016/j.bpj.2017.05.043.

YARMAND, A., Elsevier, Vol. October, págs. . En: [Original String]:VMD Documentation.

Yarmand, A. 2018. 2018, Elsevier, Vol. October, págs. 1-20., vol. 2018 SRC, pp. 1-20. 2018.

ANEXOS

ANEXO A: CÓDIGOS EN GNU PLOT PARA LA REPRESENTACIÓN DE LA GRÁFICA ENERGÍA VS TIEMPO

```
set xlabel "Tiempo (s)" font "TimesNewRomanl,14"  
set ylabel "Energia (kJ)" font "TimesNewRomanl,14"  
set title "Energy VS Time" font "TimesNewRomanl,20"  
set xrange [500:2500]  
set yrange [-1000000:800000]  
plot "RG_Bicapa_ADN_H2O.txt" using 1:2 lw 15 lt 6 w lp title "Energy",  
"RG_Bicapa_ADN_H2O.txt" using 1:2 lw 10 lt 7 w lp title "Time"
```

ANEXO B: CÓDIGOS EN GNU PLOT PARA LA REPRESENTACIÓN DE LA GRÁFICA TEMPERATURA VS PRESIÓN

```
set xlabel "Temperatura (K)" font "TimesNewRomanl,14"  
set ylabel "Presión (bar)" font "TimesNewRomanl,14"  
set title "Temperature VS Pressure" font "TimesNewRomanl,20"  
set xrange [319.95:320.1]  
set yrange [0.95:1.1]  
plot "RG_Bicapa_ADN_H2O.txt" using 3:4 lw 5 lt 15 title "Presión",  
"RG_Bicapa_ADN_H2O.txt" using 3:4 title "Temperatura" with lines lw 3 lt  
6
```

ANEXO C: CÓDIGOS EN GNU PLOT PARA LA REPRESENTACIÓN DE LA GRÁFICA FUERZA VS DISTANCIA

```
Fuerza VS Distancia  
set xlabel "Distancia (nm)" font "TimesNewRomanl,14"  
set ylabel "Fuerza (N/m)" font "TimesNewRomanl,14"  
set title "Force VS Distance" font "TimesNewRomanl,20"  
set xrange [0:16]  
set yrange [-10200:-9700]  
plot "RG_Bicapa_ADN_H2O.txt" using 5:6 lw 8 lt 10 title "Distancia",  
"RG_Bicapa_ADN_H2O.txt" using 5:6 title "Fuerza" with lines lw 3 lt 12
```