

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Medicina Humana**  
**Escuela Profesional de Medicina Humana**



**Análisis computacional mediante el programa gromacs de la lisozima de clara de huevo para la determinación de su estabilidad a 5C hasta 37C en solución fisiológica; para posterior uso en soluciones oftálmicas.**

Tesis presentada por la Bachiller:

**Tapia Rossel, Daniela Sofía**

**ORCID: 0000-0002-2137-869**

para optar el Título profesional de Médico Cirujano

**Asesor:**

**Mg. Manrique Sila George Christian**

**ORCID: 0000-0001-7660-6701**

Arequipa-Perú

2024

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**

**MEDICINA HUMANA**

**TITULACIÓN CON TESIS**

**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR**

Arequipa, 13 de Marzo del 2024

Dictamen: 011419-C-EPMH-2024

Visto el borrador del expediente 011419, presentado por:

**2017802892 - TAPIA ROSSEL DANIELA SOFIA**

Titulado:

**ANÁLISIS COMPUTACIONAL MEDIANTE EL PROGRAMA GROMACS DE LA LISOZIMA DE CLARA DE HUEVO PARA LA DETERMINACIÓN DE SU ESTABILIDAD A 5C HASTA 37C EN SOLUCIÓN FISIOLÓGICA; PARA POSTERIOR USO EN SOLUCIONES OFTÁLMICAS**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

**07961667 - NOEL CORDOVA EDGARD ELEAZAR  
DICTAMINADOR**



**29550785 - ZAVALA ESPINOZA OLENKA  
DICTAMINADOR**



**29420612 - MANRIQUE SAM MARIA CECILIA  
DICTAMINADOR**



Análisis computacional mediante el programa gromacs de la lisozima de clara de huevo para la determinación de su estabilidad a 5C hasta 37C en solución fisiológica; para posterior uso en soluciones of

---

ORIGINALITY REPORT

---

**2**%

SIMILARITY INDEX

**3**%

INTERNET SOURCES

**1**%

PUBLICATIONS

**1**%

STUDENT PAPERS

---

PRIMARY SOURCES

---



**hdl.handle.net**

Internet Source

**2**%

---

Exclude quotes Off

Exclude matches < 1%

Exclude bibliography Off

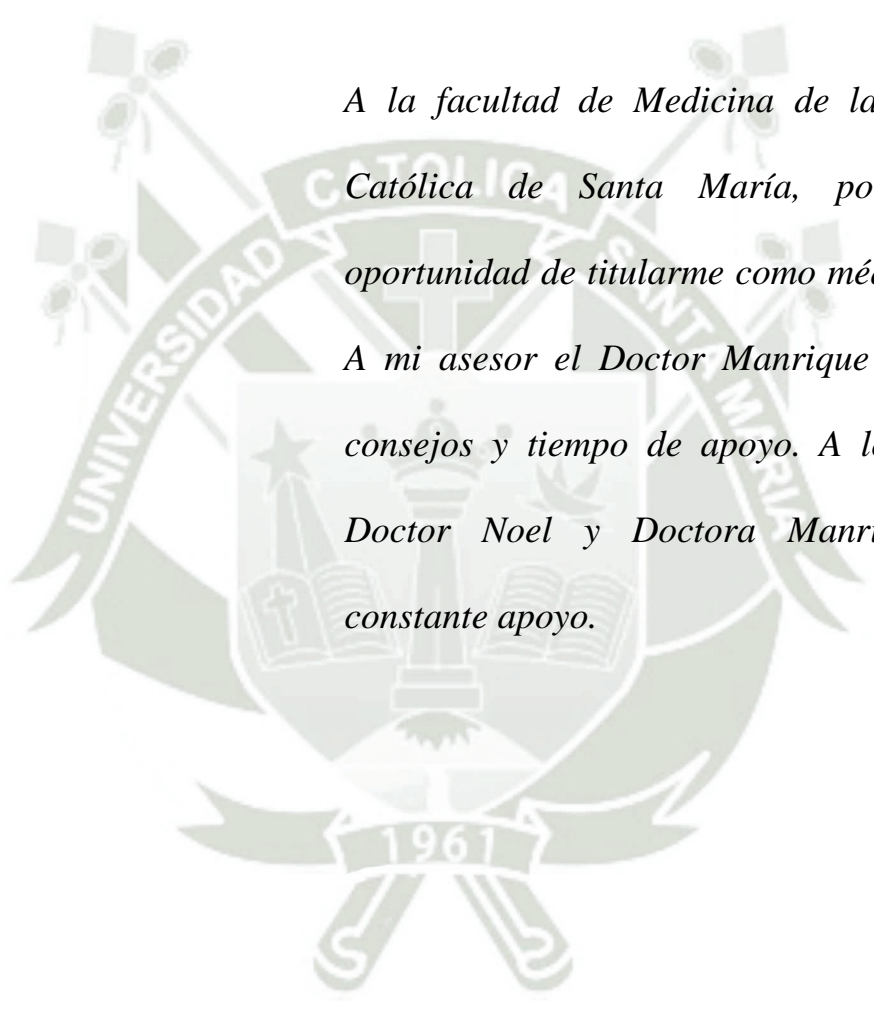
*A mis queridos padres y hermana*

*Por su amor incondicional, su apoyo constante y  
su sacrificio, esta tesis está dedicada a ustedes.*

*Sus palabras de aliento y su ejemplo de  
perseverancia han sido mi mayor inspiración a lo  
largo de este viaje académico. Gracias por  
brindarme las oportunidades que me han  
permitido llegar hasta aquí.*

*Gracias por permitirme ser la persona que soy*

*Daniela Tapia*



*A la facultad de Medicina de la Universidad  
Católica de Santa María, por darme la  
oportunidad de titularme como médico cirujano.  
A mi asesor el Doctor Manrique por su guía,  
consejos y tiempo de apoyo. A los jurados el  
Doctor Noel y Doctora Manrique por su  
constante apoyo.*

## RESUMEN

La pandemia del COVID 19 provocó un aumento en el tiempo en pantalla en la mayor parte de la sociedad. Con este incremento especialmente los alumnos tuvieron un mayor índice del síndrome de ojo seco, el cual aumenta la probabilidad de sufrir una infección ocular. Actualmente en el mercado no se encuentra ninguna gota oftalmológica que prevenga las mismas ya que la mayoría de estas sólo se centran en brindar la lubricación al ojo, mas no contienen ninguna proteína bactericida como las lágrimas naturales. Por lo cual mediante el siguiente trabajo se pretende determinar si la lisozima de clara de huevo es estable a diferentes temperaturas (de 5 a 37 C) cuando se encuentra en una solución de concentraciones fisiológicas mediante métodos computacionales. Determinar el valor de la Raíz de la Desviación Cuadrática Media y el valor del Radio de Giro de la lisozima. Paro lo cual se realizó un estudio prospectivo experimental en el cual se realiza un análisis mediante dinámica molecular en el programa Gromacs de la lisozima utilizando el campo de fuerza OPLS-AA/L el solvente fue el TIP3P. Después de haber realizado el análisis se concluyó que la lisozima de clara de huevo 1DPX es estable a diferentes temperaturas 5, 15, 30, 33 y 37 °C según los valores obtenidos raíz cuadrada media de las fluctuaciones cuadráticas, Radio de giro y Puentes de Hidrógeno.

**Palabras clave:** Lisozima, síndrome de ojo seco

## ABSTRACT

The COVID 19 pandemic caused an increase in screen time in most of society. With this increase, students especially had a higher rate of dry eye syndrome, which increases the probability of suffering an eye infection. Currently on the market there is no eye drop that prevents them since most of these only focus on providing lubrication to the eye, but do not contain any bactericidal protein like natural tears. Therefore, the following work aims to determine if egg white lysozyme is stable at different temperatures (from 5 to 37 C) when found in a solution of physiological concentrations using computational methods. Determine the value of the Root Mean Square Deviation and the value of the Radius of Gyration of lysozyme. To stop this, a prospective experimental study was carried out in which an analysis was carried out using molecular dynamics in the Gromacs program of lysozyme using the OPLS-AA/L force field, the solvent was TIP3P. After having carried out the analysis, it was concluded that 1DPX egg white lysozyme is stable at different temperatures 5, 15, 30, 33 and 37 °C according to the values obtained root mean square of the quadratic fluctuations, Radius of gyration and Bridges of Hydrogen.

**Keywords:** Lysozyme, dry eye syndrome

## INDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN: .....	11
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO TEÓRICO .....	12
Enunciado del problema .....	12
Descripción del problema .....	12
Área del conocimiento .....	12
Operacionalización de variables .....	12
Variables dependientes.....	12
Variable independiente .....	12
Interrogantes básicas.....	13
Tipo y nivel de investigación .....	13
Justificación del Problema .....	13
Objetivos.....	15
Objetivo General:.....	15
Objetivos específicos: .....	15
Hipótesis .....	15
Marco conceptual .....	15
Síndrome del ojo seco .....	15
Síntomas:.....	16
Fisiopatología:.....	17
Causas: .....	18
Diagnóstico: .....	20
Evaluación: .....	21
Lisozima historia:.....	25
Estructura de la lisozima de clara de huevo .....	25
Distribución en el cuerpo humano .....	26
Funciones: .....	27
Papel de la lisozima en la lactancia materna: .....	28
Usos: .....	29
Industria del queso: .....	30
Plásticos: .....	30
Vino: .....	30
CAPITULO II: PLANTEAMIENTO OPERACIONAL .....	32

Técnicas, instrumentos y materiales de verificación .....	32
Instrumentos: .....	33
Campo de Verificación .....	33
Estrategia de Recolección de Datos.....	34
Validación de los instrumentos: .....	34
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	35
Para la Temperatura 5° .....	35
Para la Temperatura 15° .....	40
Temperatura 30° .....	46
Temperatura 33° .....	52
Temperatura 37° .....	58
Figuras resumen.....	64
RMSD.....	64
RMSF.....	64
Radio de giro .....	65
CONCLUSIONES: .....	67
REFERENCIAS .....	68
ANEXOS:.....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis de Raíz de Desviación Media Cuadrática temperatura 5°C. ....	35
Figura 2. Análisis de Raíz de la Desviación Media Cuadrática de las Fluctuaciones temperatura 5°C. ....	36
Figura 3. Análisis de Radio de Giro temperatura 5°C. ....	37
Figura 4. Análisis de Puente de Hidrógeno temperatura 5°C. ....	37
Figura 5. Análisis de Ramachandran temperatura 5°C. ....	38
Figura 6. Estructura a temperatura 5°C. ....	39
Figura 7. Estructura secundaria temperatura 5°C. ....	40
Figura 8. Análisis de Raíz de Desviación Media Cuadrática temperatura 15°C. ....	41
Figura 9. Análisis de Raíz de la Desviación Media Cuadrática de las Fluctuaciones temperatura 15°C. ....	42
Figura 10. Análisis de Radio de Giro temperatura 15°C. ....	42
Figura 11. Análisis de Puente de Hidrógeno temperatura 5°C. ....	43
Figura 12. Análisis de Ramachandran temperatura 15°C. ....	44
Figura 13. Estructura a temperatura 15°C. ....	45
Figura 14. Estructura secundaria temperatura 15°C. ....	46
Figura 15. Análisis de Raíz de Desviación Media Cuadrática temperatura 30°C. ....	47
Figura 16. Análisis de Raíz de la Desviación Media Cuadrática de las Fluctuaciones temperatura 30°C. ....	48
Figura 17. Análisis de Radio de Giro temperatura 30°C. ....	49
Figura 18. Análisis de Puente de Hidrógeno temperatura 30°C. ....	49
Figura 19. Análisis de Ramachandran temperatura 30°C. ....	50
Figura 20. Estructura a temperatura 30°C. ....	51
Figura 21. Estructura secundaria temperatura 30°C. ....	52
Figura 22. Análisis de Raíz de Desviación Media Cuadrática temperatura 33°C. ....	53
Figura 23. Análisis de Raíz de la Desviación Media Cuadrática de las Fluctuaciones temperatura 33°C. ....	54
Figura 24. Análisis de Radio de Giro temperatura 33°C. ....	55
Figura 25. Análisis de Puente de Hidrógeno temperatura 33°C. ....	55
Figura 26. Análisis de Ramachandran temperatura 33°C. ....	56
Figura 27. Estructura a temperatura 33°C. ....	57

Figura 28. Estructura secundaria temperatura 33°C.....	58
Figura 29. Análisis de Raíz de Desviación Media Cuadrática temperatura 37°C. ....	59
Figura 30. Análisis de Raíz de la Desviación Media Cuadrática de las Fluctuaciones temperatura 37°C.....	60
Figura 31. Análisis de Radio de Giro temperatura 37°C. ....	60
Figura 32. Análisis de Puente de Hidrógeno temperatura 37°C. ....	61
Figura 33. Análisis de Ramachandran temperatura 37°C. ....	62
Figura 34. Estructura a temperatura 37°C.....	62
Figura 35. Estructura secundaria temperatura 37°C. ....	63
Figura 36. Comparación de temperaturas del Análisis de Raíz de Desviación Media Cuadrática.....	64
Figura 37. Comparación de temperaturas del Análisis de Raíz de la Desviación Media Cuadrática de las Fluctuaciones. ....	65
Figura 38. Comparación de temperaturas del Análisis de Radio de Giro. ....	66
Figura 39. Comparación de temperaturas Análisis de Puente de Hidrógeno.....	66

## INTRODUCCIÓN:

El síndrome de ojo seco se encuentra en aumento este suele ser causado entre otros por el uso excesivo de computadoras, síndrome de Sjögren, edad avanzada, etc. En la mayoría de los pacientes tiene un origen multifactorial que involucran la superficie del ojo ocasionando así la pérdida de la homeostasis de las lágrimas produciendo las molestias que normalmente aquejan los pacientes con este síndrome. El tratamiento indicado para aliviar los síntomas y posibles complicaciones se utilizan lágrimas artificiales. En las lágrimas naturales se encuentra componente bactericida que es la lisozima que previene en gran medida las infecciones oculares. Sin embargo, en ningún tipo de lágrimas artificiales se agregan ninguna clase de componente que nos ayude a prevenir infecciones. La lisozima tiene una buena acción antibacteriana y antifúngica y se encuentra en distintos fluidos de nuestro organismo. Esta actúa a nivel del enlace  $\beta$  (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y el enlace glucosídico peptidoglicano N-acetilglucosamina (NAG). Destruyendo la pared celular de ciertas bacterias Gram-positivas. La lisozima de clara de huevo es muy similar a la humana. En el presente trabajo se realiza una simulación con técnicas de dinámica molecular para comprobar la estabilidad de la estructura a diferentes temperaturas para su posterior uso como componente de soluciones oftálmicas.

## CAPITULO I: PLANTEAMIENTO TEÓRICO

### Enunciado del problema

Falta de componentes inmunológicos en las soluciones oftálmicas destinadas para tratar entre otras patologías el síndrome de ojo seco. Resultando así en un incremento de infecciones oculares.

### Descripción del problema

#### Área del conocimiento

- Área general: Ciencias de la Salud
- Área Específica: Medicina Humana
- Especialidad: Biología Genética y Molecular
- Línea: Función inmunológica oftálmica

### Operacionalización de variables

#### Variables dependientes

VARIABLE	UNIDAD	TIPO DE VARIABLE
Raíz de la Desviación Cuadrática Media	Angstrom	Cuantitativa continua
Radio de Giro	Angstrom	Cuantitativa continua

#### Variable independiente

VARIABLE	UNIDAD	TIPO DE VARIABLE
Temperatura	Grados centígrados	Cuantitativa continua

### Interrogantes básicas

- ¿La lisozima de clara de huevo es estable a diferentes temperaturas (de 5 a 37 C) cuando se encuentra en una solución de concentraciones fisiológicas mediante métodos computacionales?.
- ¿Cuál es el valor de la Raíz de la Desviación Cuadrática Media de la lisozima de clara de huevo después de estabilizarla con técnicas de dinámica molecular a los diferentes grados centígrados (5 hasta 37 C)?.
- ¿Cuál es el valor del Radio de Giro de la lisozima al estabilizarla con técnicas de dinámica molecular a diferentes grados centígrados (5 hasta 37 C<sup>0</sup>)?.

### Tipo y nivel de investigación

Se trata de un estudio prospectivo experimental

### Justificación del Problema

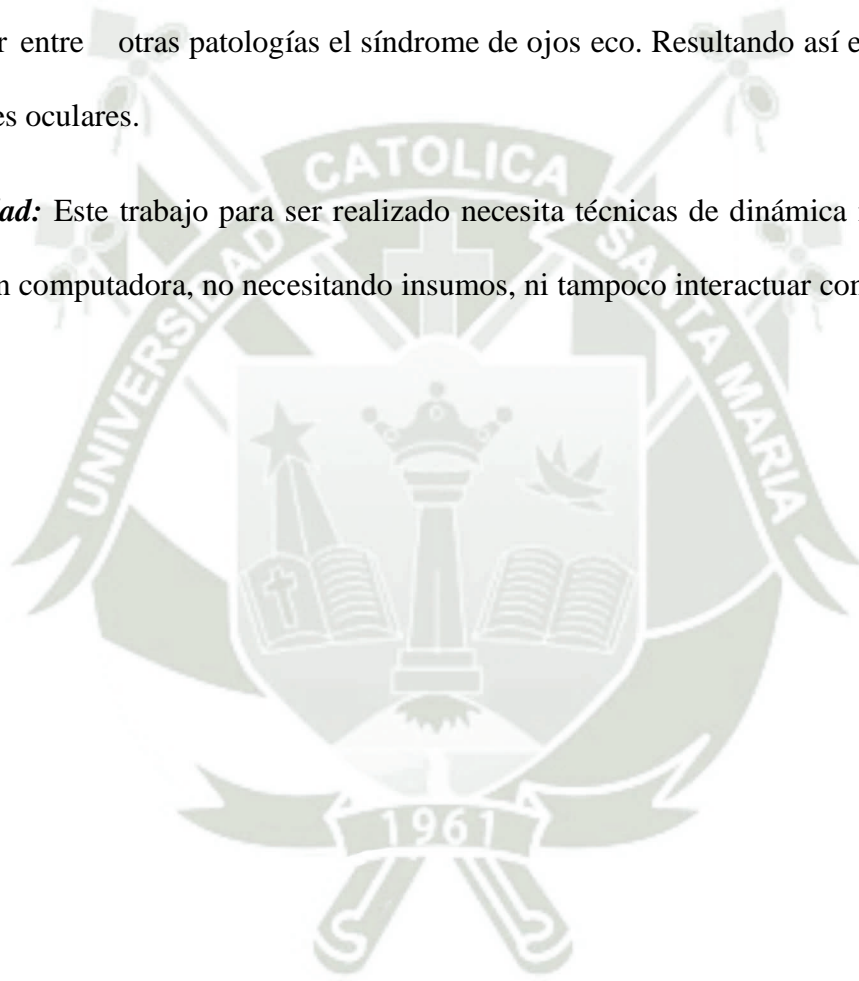
No existen proteínas bactericidas en las soluciones oftálmicas destinadas para tratar entre otras patologías el síndrome de ojo seco. Resultando así en un incremento de infecciones oculares. El síndrome de ojo seco se encuentra en aumento este suele ser causado entre otros por el uso excesivo de computadoras, síndrome de sjogren, edad avanzada, etc. Para aliviar los síntomas y posibles complicaciones se utilizan lágrimas artificiales. En las lágrimas naturales se encuentran proteínas bactericidas que previenen en gran medida las infecciones oculares, uno de ellos es la lisozima. La lisozima tiene una buena acción antibacteriana y antifúngica y se

encuentra en distintos fluidos de nuestro organismo, por ende sería un buen candidato a un compuesto inmunológico que se podría agregar a las soluciones oftálmicas.

**Novedad:** No se ha realizado ningún estudio similar tal como se evidencia en los antecedentes de investigación.

**Relevancia:** Agregar un componente inmunológico en las soluciones oftálmicas destinadas para tratar entre otras patologías el síndrome de ojos eco. Resultando así en un descenso en infecciones oculares.

**Factibilidad:** Este trabajo para ser realizado necesita técnicas de dinámica molecular que se realizan en computadora, no necesitando insumos, ni tampoco interactuar con pacientes.



**Objetivos.****Objetivo General:**

Determinar si la lisozima de clara de huevo es estable a diferentes temperaturas (de 5 a 37 C) cuando se encuentra en una solución de concentraciones fisiológicas mediante métodos computacionales.

**Objetivos específicos:**

Determinar el valor de la Raíz de la Desviación Cuadrática Media de la lisozima de clara de huevo para determinar la variación en la estructura de esta después de estabilizarla con técnicas de dinámica molecular a los diferentes grados centígrados (5 hasta 37C0).

Determinar el valor del Radio de Giro de la lisozima de clara de huevo al estabilizarla con técnicas de dinámica molecular para determinar el grado de compactación a los diferentes grados centígrados (5 hasta 37C0)

**Hipótesis**

La lisozima es estable a diferentes temperaturas (de 5 a 37 C) cuando se encuentra en una solución de concentraciones fisiológicas mediante métodos computacionales.

**Marco conceptual****Síndrome del ojo seco**

Es una condición crónica llamada también enfermedad del ojo seco o queratoconjuntivitis seca. Este síndrome se da por múltiples factores que involucran la superficie del ojo ocasionando así la pérdida de la homeostasis de las lágrimas produciendo las molestias que normalmente aquejan los pacientes con este síndrome. Algunas de las etiologías para esta patología son: hiperosmolaridad de la película lagrimal, inflamación o daño en la superficie del ojo y anomalías neurosensoriales.

**Prevalencia:** en estudios epidemiológicos realizados a nivel mundial, la prevalencia de la enfermedad del ojo seco varía del 5 al 50 por ciento.

Los estudios sobre la carga global informan que las personas que viven en Asia (principalmente China, Tíbet, Corea) tienen una prevalencia más alta

**Los factores de riesgo** incluyen:

- Edad avanzada
- Sexo femenino
- Cambios hormonales (mayormente por un menor nivel de andrógenos)
- Enfermedades sistémicas (Diabetes, Parkinson, síndrome de Sjögren)
- Uso de lentes de contacto
- Medicamentos sistémicos (antihistamínicos, anticolinérgicos, estrógenos, isotretinona)
- Deficiencias nutricionales (Deficiencia de vitamina A)
- Cirugía oftálmica
- Entornos de baja humedad

**Síntomas:**

La mayoría de los pacientes experimentan síntomas de irritación ocular crónica asociada con molestias leves a moderadas. Sin embargo, existe una variación considerable en los síntomas informados por los pacientes y los signos clínicamente medibles a lo largo del tiempo.

Las quejas comunes de los ojos incluyen:

- Sequedad
- Ojos rojos

- Irritación general
- Sensación arenosa
- Sensación de quemarse
- Sensación de cuerpo extraño
- Sensibilidad a la luz
- Visión borrosa

Las causas agravantes incluyen medicamentos, condiciones de viento, clima frío, ambientes de baja humedad, tiempo prolongado frente a la pantalla y la hora del día. La visión borrosa asociada tiende a variar ampliamente. Dado que la película lagrimal es la primera capa que encuentra la luz al entrar en el ojo, una película lagrimal irregular puede degradar la calidad de la imagen recibida por la retina.

El deterioro de la visión asociado con la enfermedad de ojo seco suele ser temporal y suele mejorar con el tratamiento de la enfermedad. Rara vez, y en casos severos, la cicatrización o ulceración de la córnea puede causar daño permanente a la visión. Si la molestia ocular se acompaña de sequedad de boca y otras molestias generales, se debe evaluar el síndrome de Sjogren.

### **Fisiopatología:**

El síndrome de ojo seco tiene una etiología que es compleja. La película lagrimal del ojo está compuesta por componentes acuosos, mucosos y lipídicos. Una película lagrimal sana depende de la interacción sinérgica de la glándula lagrimal, el párpado y la superficie ocular, que juntos constituyen la unidad funcional de la glándula lagrimal. La disfunción de cualquier componente de la unidad funcional de la glándula lagrimal puede provocar ojo seco.

Históricamente, se ha dividido en dos grandes categorías: disminución de la producción de lágrimas y fisiología anormal de las glándulas de Meibomio (lo que lleva a la enfermedad por evaporación). Sin embargo, ahora se piensa que ambos mecanismos están presentes en la mayoría de los pacientes, aunque uno puede predominar.

La hiperosmolaridad de la película lagrimal y la posterior inflamación de la superficie ocular provocan diversos signos y síntomas asociados. Los síntomas son el resultado de la activación de los nervios sensoriales en la superficie ocular, lo que puede deberse a hiperosmolaridad lagrimal, presencia de mediadores inflamatorios o hipersensibilidad sensorial.

### **Causas:**

**Disminución de la producción de lágrimas:** la producción de lágrimas deteriorada puede ser el resultado de cualquier forma de destrucción o disfunción de las glándulas lagrimales.

Una disminución en el volumen del humor acuoso conduce a la hiperosmolaridad de la película lagrimal causando inflamación de las células de la superficie ocular. La insuficiencia lagrimal se puede dividir en dos subtipos principales:

- **Síndrome de Sjogren:** el síndrome de Sjögren es una enfermedad inflamatoria autoinmune crónica caracterizada por una disminución de la función de las glándulas lagrimales y salivales, lo que provoca sequedad en los ojos y la boca. El inicio del síndrome de Sjogren es raro después de los 65 años.
- **Ojo seco causado por síndrome no Sjogren:** este síndrome se refiere a pacientes con ojo seco con deficiencia de lágrimas, pero sin síntomas sistémicos asociados.

La forma más común está relacionada con la edad, en la que se cree que los conductos lagrimales se obstruyen con el tiempo, lo que lleva a un decremento de la función de las glándulas.

Las glándulas lagrimales obstruidas también pueden deberse a cicatrices conjuntivales como tracoma, penfigoide, deficiencias vitamínicas, síndrome posviral y quemaduras oculares. Este síndrome también puede ser causado por la infiltración de la glándula lagrimal por enfermedades como linfoma, sarcoidosis, epiescleritis o enfermedad de injerto contra huésped. Otras causas incluyen el uso de lentes de contacto, que se asocia con una sensibilidad corneal disminuida y la disminución de la producción de lágrimas producto de la disminución en la sensibilidad.

**Aumento de la evaporación;** pérdida: la pérdida excesiva de agua de la superficie ocular provoca inestabilidad de la película lagrimal e hiperosmolaridad lagrimal.

El aumento de la evaporación lagrimal es causado más comúnmente por la mala función de la glándula de Meibomio, también conocida como blefaritis posterior, en la que las glándulas lagrimales accesorias responsables del componente lipídico de las lágrimas son disfuncionales. En un ojo que funciona normalmente, la naturaleza de la mucina permite que la película lagrimal se extienda uniformemente para formar una membrana, y la capa lipídica proporciona una barrera para minimizar la evaporación de las lágrimas. Las anomalías de la capa lipídica se asocian con una mayor tasa de evaporación de la película lagrimal.

Las anomalías estructurales de la posición del párpado o la mala función de del movimiento de parpadear también incrementan la evaporación de la película lagrimal al aumentar el área o el tiempo de exposición de la película lagrimal. Por último, el uso de gotas oculares tópicas medicadas o conservadas, el uso crónico de lentes de contacto y los síndromes de alergia ocular pueden causar irritación de la superficie ocular y un aumento de la evaporación de la película lagrimal.

**Cuestionarios:** Debido a la variabilidad de los resultados de la evaluación clínica de la enfermedad del ojo seco, algunos médicos basan su evaluación en los resultados de cuestionarios validados. Estos también se pueden utilizar para monitorearla y pueden ser útiles para estandarizar la identificación y clasificación de esta.

Algunos de los cuestionarios más ampliamente disponibles que se utilizan específicamente para la evaluación de los síntomas incluyen:

- Índice de enfermedad de la superficie ocular (OSDI): Cuestionario de doce ítems validado en pacientes con enfermedad de ojo seco. El OSDI puede ser útil clínicamente, especialmente en pacientes con síntomas más graves, para controlar la respuesta al tratamiento y la variabilidad de los síntomas a lo largo del tiempo.
- Cuestionario de ojo seco (DEQ-5): cuestionario de cinco ítems.
- Impacto del ojo seco en la vida diaria (IDEEL) - Cincuenta y siete preguntas en tres módulos validados.
- Cuestionario de evaluación de los ojos de Salisbury (SEE): cuestionario de seis ítems que se utiliza en encuestas de prevalencia basadas en la población y autoinformadas para determinar la discapacidad visual entre los adultos mayores.

### **Diagnóstico:**

El diagnóstico del síndrome de ojo seco se basa en los síntomas característicos del paciente y los hallazgos de apoyo en el examen físico, los cuales pueden variar considerablemente en intensidad con el tiempo y bajo diferentes condiciones del ambiente. Los posibles hallazgos de apoyo en el examen físico incluyen:

- Inyección conjuntival, generalmente simétrica en ambos ojos.
- Desglose de la superficie ocular y cicatrización corneal.
- Desgarro reflejo excesivo por irritación debido a la sequedad, que paradójicamente puede ser un signo de enfermedad del ojo seco.
- Blefaritis, a menudo visible como bordes de párpados eritematosos o irritados.

- Malposición de los párpados (giro hacia adentro o hacia afuera, también llamado entropión y ectropión, respectivamente)
- Tasa de parpadeo reducida. La frecuencia de parpadeo normal varía según el entorno y la actividad, pero generalmente está en el rango de 5 a 26 parpadeos por minuto
- Discapacidad visual, con agudeza visual evaluada en cada ojo por separado. Esto debe incluir la evaluación de si la agudeza visual mejora con una mayor frecuencia de parpadeo o con el uso de gotas lubricantes para los ojos.

### **Evaluación:**

El oftalmólogo realizará un examen completo con lámpara de hendidura junto con otras pruebas para evaluar el estado de la unidad funcional lagrimal del paciente y determinar la gravedad de la enfermedad del ojo seco y las posibles etiologías. La evaluación incluye:

- Extensión y patrón de la inyección conjuntival.
- Salud de los párpados: Se notan las malposiciones de los párpados o del punto, ya que pueden provocar enfermedad del ojo seco y, a menudo, pueden repararse quirúrgicamente. Se realiza una evaluación cuidadosa de la disfunción de la glándula de Meibomio (blefaritis posterior).
- Tinción de la superficie ocular: La fluoresceína se utiliza para teñir áreas de discontinuidad en la superficie epitelial de la córnea. El verde de lisamina y la rosade Bengala se utilizan para teñir áreas de epitelio desvitalizado en la córnea y la conjuntiva.
- Tiempo de rotura de lágrimas: Medido con tinción de fluoresceína en el ojo para determinar la estabilidad de la película lagrimal. Se indica al paciente que no parpadee y se observa la película lagrimal a través de la lámpara de hendidura. Si la capa de película lagrimal suave y teñida de verde comienza a desarrollar espacios azules en menos de 10 segundos, la película lagrimal del paciente se considera anormal.

- Prueba de Schirmer: Se evalúa cuantificando la cantidad de lágrimas producidas por cada ojo. Se colocan pequeñas tiras de papel de filtro en los párpados inferiores de cada ojo, con o sin instilación previa de gotas anestésicas para los ojos. Los resultados se miden en milímetros de lágrimas recolectadas durante un período de tiempo de cinco minutos. Esta prueba se utiliza a menudo en el ámbito clínico, pero proporciona resultados extremadamente variables.
- Sensación corneal: Medida objetivamente con una variedad de técnicas para proporcionar información sobre la superficie ocular y posiblemente las asociaciones sistémicas de la enfermedad del ojo seco.
- Hiperosmolaridad lagrimal.
- Inflamación de la superficie ocular (como Metaloproteinasa 9 de la matriz como marcador de inflamación de la superficie ocular).
- Mediciones de la película lagrimal: los instrumentos de imágenes en el consultorio se pueden utilizar para medir de manera más objetiva la superficie ocular y la película lagrimal, incluida la altura del menisco lagrimal, la estabilidad de la película lagrimal, la dinámica del parpadeo y la meibografía de los párpados.

**Diagnóstico diferencial y afecciones coexistentes:** Otras afecciones que pueden causar síntomas similares al síndrome del ojo seco incluyen:

- Conjuntivitis viral: La enfermedad del ojo seco se puede confundir con "conjuntivitis". Una historia clínica cuidadosa del paciente para determinar el curso de la aparición repentina y reciente de los síntomas, cualquier enfermedad reciente de contactos enfermos y la presencia de adenopatías pueden ayudar a distinguir el diagnóstico.
- Otras infecciones microbianas: Algunas infecciones oculares pueden comenzar con un curso lento de síntomas similares a la enfermedad del ojo seco. Se debe considerar la derivación a

un oftalmólogo para cualquier paciente con alto riesgo de infecciones oculares (p. Ej., Usuario de lentes de contacto, antecedentes de diabetes mellitus), particularmente aquellos con signos de un proceso infeccioso en el examen físico (Inyección conjuntival unilateral, drenaje purulento).

Los trastornos coexistentes incluyen:

- **Blefaritis / disfunción de las glándulas de Meibomio:** La blefaritis posterior a menudo coexiste con la enfermedad del ojo seco y puede requerir tratamientos específicos, que incluyen compresas calientes y educación del paciente sobre la higiene de los párpados.
- **Alergias oculares:** La conjuntivitis alérgica también puede coexistir con la enfermedad del ojo seco. Los síntomas de picazón a menudo serán la queja principal. El alérgeno debe identificarse y evitarse de inmediato.

**Tratamiento:** La elección de los tratamientos tópicos generalmente se rige por el costo de los medicamentos y la cobertura del seguro.

**Lágrimas artificiales:** Las lágrimas artificiales generalmente incluyen celulosa para mantener determinada viscosidad, un agente esparcidor como polietilenglicol para prevenir la evaporación y un conservante para evitar que se contaminen. Disponibles sin receta, las lágrimas artificiales vienen en forma de líquido, gel y ungüento. Las formas sin conservantes de estos suplementos a menudo se recomiendan, ya que algunas personas tendrán reacciones inflamatorias a los conservantes.

**Gotas:** Una dosis inicial razonable es una gota en cada ojo, cuatro veces al día. Los pacientes a menudo comienzan a notar una mejora después de pocos días de instaurado el tratamiento. Si los individuos continúan sintomáticos, la frecuencia se puede aumentar hasta cada hora. Si se usa más de cuatro a seis veces al día, es preferible una formulación sin conservantes para minimizar el potencial de toxicidad.

**Geles y ungüentos:** Los geles y ungüentos de lágrimas artificiales de mayor viscosidad también están disponibles comercialmente y se pueden usar si los pacientes sienten que las gotas para los ojos no brindan suficiente alivio sintomático. Se debe advertir a los pacientes que los geles, y especialmente los ungüentos, pueden nublar la visión temporalmente y, a menudo, es mejor usarlos a la hora de acostarse.

**Lifitegrast tópico:** Una formulación de gotas oftálmicas tópicas, lifitegrast 5.0%, un antagonista de la integrina, se usa dos veces al día y tiene efectos secundarios de irritación ocular o malestar y un mal sabor asociado en aproximadamente el 25 por ciento de los usuarios. En ensayos aleatorizados, lifitegrast mejoró los signos y síntomas de la enfermedad del ojo seco en pacientes con síntomas leves a moderados y moderados a graves.

**Ciclosporina Tópica:** Es un agente inmunosupresor que suele ser bien tolerado, aunque no está claro que conduce a un beneficio clínicamente importante. En numerosos estudios realizados se observó que su eficacia fluctúa mucho según la dosis empleada, por eso el grado de beneficio proporcionado por el uso de este agente sigue siendo incierto.

Aunque no es universalmente beneficioso, parece haber un subconjunto de pacientes que responden favorablemente a este tratamiento, pero no hay buenos modelos predictivos disponibles para guiar la toma de decisiones clínicas.

Se dispone de una emulsión al 0,05% y una solución de ciclosporina al 0,09% para el tratamiento de la enfermedad del ojo seco. Puede tomar hasta seis semanas o más de tratamiento para lograr una mejora notable de la sequedad. En algunos pacientes, la ciclosporina puede dar como resultado la resolución a largo plazo de los síntomas de enfermedad del ojo seco.

Las concentraciones séricas de ciclosporina han sido indetectables o insignificantes con el uso tópico y no se ha informado toxicidad sistémica. La ciclosporina puede causar una sensación de ardor temporal y ocasional en el ojo. Otro factor limitante importante es el alto costo.

Como los pacientes pueden tener otros problemas concurrentes, como infecciones que provocan irritación ocular, deben someterse a un examen oftalmológico completo antes de recibir ciclosporina.

**Estrategias ambientales:** Una estrategia importante incluye el parpadeo frecuente, especialmente durante las tareas de atención visual, como leer o usar la computadora. También se debe instar al paciente a que minimice la exposición al aire acondicionado o la calefacción. Los humidificadores son útiles en el dormitorio, la oficina o cualquier espacio donde el paciente pase una cantidad significativa de tiempo.

#### **Lisozima historia:**

También es llamada acetil muramidoglucanohidrolasa, fue descubierta en 1922 por Alexander Fleming.

La lisozima es una molécula grande y no es particularmente útil como fármaco sistémico ya que no puede eliminar la enfermedad de todo el cuerpo, porque es demasiado grande para diseminarse entre las células. Sin embargo se puede aplicar por vía tópica (1).

Esta proteína ha sido muy importante en muchos aspectos de la biología como siendo la primera proteína cuya secuencia se obtuvo por cristalografía de rayos X, y la primera enzima cuyo mecanismo fue determinado gracias a David Phillips.

#### **Estructura de la lisozima de clara de huevo**

La lisozima se divide en seis categorías: lisozima de pollo (tipo C), que incluye lisozima gástrica y lisozima fijadora de calcio, y lisozima de ganso (tipo YO). Los cuatro tipos de lisozima: tipo C, tipo I, tipo G y lisozima T4 tienen estructuras tridimensionales muy similares.

Entre estas enzimas, la lisozima de huevo ha sido la más investigada por su elevada cantidad en la clara de huevo (1-3 g/L de clara de huevo) además de su facilidad de operación y su capacidad para cristalizarse y purificarse en NaCl al 5% a pH 9,5 (2).

La lisozima del huevo es un tipo de proteína que representa aproximadamente el 3,4% de la proteína de la clara del huevo. Tiene un peso molecular de 14.307 Da y consta de 129 residuos de aminoácidos. Es una proteína altamente catiónica con un alto punto isoeléctrico ( $pI = 10,7$ ) y 19 aminoácidos cargados positivamente en su secuencia. Tiene cuatro enlaces disulfuro, lo que le confiere una alta estabilidad y contiene ocho cisteínas presentes en la molécula.

### **Distribución en el cuerpo humano**

Se puede encontrar en la leche materna, bazo, pulmón, riñón, glóbulos blancos, plasma, saliva y lágrimas. La proteína tiene actividad antibacteriana contra varias especies bacterianas. Se encontraron mutaciones en el gen de la lisozima en la amiloidosis renal hereditaria (3).

En lágrimas, su contenido está entre 3.000 y 5.000  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , lo que puede prevenir bacterias y virus.

En la saliva, puede producir resistencia contra bastantes agentes como bacterias, virus y hongos de diferentes tipos como el de Candida.

Varias sustancias antibacterianas y enzimas hidrolíticas se distribuyen en los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos, que pueden resistir eficazmente a las bacterias. También se conoce que esta enzima es uno de los componentes fundamentales de los gránulos primarios y secundarios de los neutrófilos y el principal producto secretado por los macrófagos, por lo que

puede activar estas células para combatir el proceso inflamatorio provocado por la presencia de bacterias (4).

### **Funciones:**

En los seres humanos, la lisozima tiene un rol relevante en la prevención de infecciones. La lisozima es miembro de un tipo de enzimas, que actúa destruyendo el enlace  $\beta$  (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y el enlace glucosídico peptidoglicano N-acetilglucosamina (NAG). Destruye la pared celular de ciertas bacterias Gram-positivas. El resultado es que el agua penetra en las células para expandirse y finalmente explotar, fenómeno que se denomina lisis (5).

Además, esta hidrólisis puede potenciar la secreción de inmunoglobulina A (IgA), la activación de macrófagos y eliminación de consecuente de bacterias.

Debido a la inaccesibilidad del peptidoglicano protegido por la membrana externa, la lisozima es muy poco efectiva contra los microorganismos gramnegativos. Esta propiedad de hidrolizar el peptidoglicano se llama actividad neuraminidasa o muramidasa. También es importante tener en cuenta que en las bacterias Gram positivas, el peptidoglicano constituye aproximadamente el 90 % de la pared celular, mientras que en las bacterias Gram negativas es solo el 10 % (6).

Actividad antiviral: además de la actividad antibacteriana, se han descrito muchas otras actividades biológicas de la lisozima: por ejemplo, actividad antiviral.

Debido a su actividad antiinflamatoria, la aplicación oral y dérmica de lisozima puede prevenir enfermedades de la piel como el herpes simple y la varicela. Se describió que tiene actividad contra el VIH tipo 1 en experimentos in vitro y se propuso que la actividad antiviral puede estar relacionada con su carga positiva así como con su mecanismo de interacción con cargas negativas (7).

Por otra parte también la lisozima tiene efecto antioxidante, actividad antiheparina, antifúngica y mejora de la acción antibiótica. La literatura también describe la lisozima humana como un

inmunomodulador, que tiene un rol muy relevante en el mecanismo de defensa natural de los seres humanos.

La función del sistema inmunológico es distinguir y controlar a las bacterias, virus, hongos, etc, y la base de esta función en gran medida está dada por la capacidad de reconocer productos del metabolismo microbiano exclusivos de los mismos por ende muy diferentes a los que poseen todas nuestras células. Algunas de estas sustancias producidas por los microorganismos, son los lipopolisacáridos de las bacterias Gram-negativas, secuencias de ADN no metilado y los peptidoglicanos de que se encuentran en las bacterias Gram positivas y negativas (8).

Se sabe que los dímeros de lisozima pueden imitar la síntesis de algunas interleucinas INF alfa y gamma, pueden también regular la producción de TNF $\alpha$  para prevenir los efectos adversos de una producción excesiva.

La lisozima promueve la función de las células fagocíticas además de evitar la formación de radicales libres.

La desnaturalización térmica produce una estructura dimerica que retiene dos enlaces disulfuro y continúa manteniendo su función de lisis contra las paredes de los microorganismos como bacterias. Esta forma también se encuentra cuando los huevos están almacenados (9).

En algunos trabajos, la actividad biológica se atribuye a la forma dimerica de estas lisozimas, como la actividad antibacteriana frente a bacterias, virus y hongos Gram negativos y positivos. Nika Health Products Inc ha desarrollado un proceso para preparar productos dímeros de lisozima puros para la terapia con virus y antibacterianos.

### **Papel de la lisozima en la lactancia materna:**

En el periodo de la lactancia, la lisozima puede proteger a los neonatos de múltiples infecciones tanto en el tracto gastrointestinal como respiratorio. El contacto de los neonatos con los distintos microorganismos ocurre a nivel digestivo en la mucosa intestinal que generalmente no tiene

fagocitos o células inmunes maduras, por lo que el cuerpo debe tener un sistema de defensa. Cuando el sistema inmunológico se desarrolla, la leche materna proporciona a los recién nacidos lisozima entre 0.3-0.5 g / L, dándole así una relevante defensa contra los patógenos (10).

Como todos sabemos, la lisozima que se encuentra en la leche materna tiene un rol de suma importancia en el sistema inmunológico de los recién nacidos el descubrimiento de su importancia data de 1931 donde se describió por primera vez la importancia en la flora intestinal de los lactantes. Se observaron que los intestinos de los recién nacidos estaban libres de bacterias al nacer y fueron invadidos por microorganismos del ambiente en un corto período de tiempo. En los lactantes alimentados de forma natural, la flora que se encontraba al inicio es reemplazada al tercer o cuarto día por la flora dominante de *Lactobacillus bifidobacteria*.

No ocurre lo mismo con los niños alimentados artificialmente, que forman una microbiota intestinal muy diversa y no tienen ninguna ventaja de especie específica.

También se encontraron la enzima solo en las heces de niños que tomaban lactancia materna, y concluyeron que el contenido de esta en la leche materna es más alto que en la leche (fórmula infantil), y puede pasar a través de los intestinos sin ser destruido por el estómago.

El pH del estómago de los neonatos es más alto que el de los adultos, con un pH de 4,0. Debido al mayor pH, la acción de la pepsina se reduce, favoreciendo la entrada de proteínas intactas a la circulación (11).

La barrera intestinal es una forma que tenemos de defendernos de los microorganismos al inducir el fenómeno de la tolerancia oral. En este proceso participan células presentadoras de antígenos y células T reguladoras. La barrera de la mucosa gastrointestinal (incluidos los mecanismos físicos e inmunológicos) procesa y modifica las proteínas de la dieta de modo que sólo el 2% se convierte finalmente en antígenos potenciales.

#### **Usos:**

Organizaciones internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud y muchos países como Alemania, Bélgica, España y Reino Unido han reconocido a la lisozima a clara de huevo como una proteína no tóxica, por lo que es usada con fines alimentarios, farmacológicos y terapéuticos, aproximadamente se emplea 100 toneladas anualmente para los mencionados fines.

La lisozima del huevo está clasificada como aditivo alimentario con el código (E-1105). Las verduras, el pescado, la carne, las frutas, los camarones y otros alimentos frescos se mantienen frescos al poner en contacto la superficie del alimento con lisozima. Esta proteína también se utiliza para conservar otros alimentos como el kimchi, el sushi y los fideos chinos.

#### **Industria del queso:**

La FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) considera la lisozima GRAS (generalmente reconocida como segura) para su uso en la industria del queso. Entre sus usos, se ha descubierto que protege el queso de bacterias dañinas, como *Clostridium tyrobutyricum*, que hace que el queso se hinche.

Múltiples patentes garantizan que bajas concentraciones de lisozima pueden controlar el crecimiento microbiano en el queso durante más de 24 meses.

#### **Plásticos:**

También se han inventado plásticos que tienen lisozima pegada al biopolímero, creando biofilms que son empleados como preservantes por contacto de los alimentos con este tipo de plástico

#### **Vino:**

La lisozima también ha adquirido gran importancia en la elaboración del vino. El dióxido de azufre se utiliza habitualmente como conservante en enología. Actúa como antioxidante, protegiendo los compuestos fenólicos de la oxidación. Además, el SO<sub>2</sub> inhibe las enzimas oxidativas endógenas,

previniendo fermentaciones indeseables como las fermentaciones acéticas y maloláctica. Debido a los efectos tóxicos del dióxido de azufre en la salud humana, queremos reducir su uso. Por tanto, su incorporación en la producción de vino está restringida. Se han realizado muchas investigaciones para desarrollar regímenes de elaboración de vino utilizando aditivos alternativos para reemplazar los sulfitos en las funciones anteriores.

Desde el año 1990 aproximadamente el empleo de lisozima ha sido propuesto para el manejo de la fermentación en la producción de vinos ya que favorece la estabilidad microbiana y evita el incremento de la cantidad de ácido acético y aminas.

El mundo busca producir vinos sin sulfitos. Se ha demostrado que la lisozima previene el crecimiento de *Oenococcus oeni* y las bacterias que alteran el ácido láctico.

Según la legislación de la Comunidad Europea CE Nr 2066, se permite la adición de 500 mg/L para vino tinto y 250 mg/L para vino blanco (Sonni et al., 2009; Weber et al., 2009).

Aunque se utiliza en la industria del vino para controlar el crecimiento de bacterias del ácido láctico (*Oenococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*), tiene poco efecto sobre las bacterias Gram-negativas (bacterias del ácido acético) y las levaduras, por lo que no puede reemplazar completamente al dióxido de azufre.

## CAPITULO II: PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

### Técnicas, instrumentos y materiales de verificación

Se realizarán los análisis mediante dinámica molecular que es una técnica de simulación por computadora que permite seguir la trayectoria de un conjunto de átomos en el espacio en tiempo real, resolviendo numéricamente las ecuaciones de movimiento para un potencial de interacción dado. Permite calcular magnitudes termodinámicas como la energía, la presión y la temperatura que se pueden comparar con datos experimentales. En este caso en específico se utilizará esta técnica para observar el grado de condensación y cambio, por ende, estabilidad, de la proteína lisozima al colocarla a ciertas temperaturas a una presión y concentración constantes en un medio líquido. Se utilizará el campo de fuerza OPLS-AA/L el solvente fue el TIP3P y los parámetros de la simulación se encuentran en el anexo 1, los parámetros para equilibrar la proteína en cuanto a temperatura y presión se encuentran en los anexos 2 y 3 respectivamente.

Inicialmente la estructura de la proteína se descargará del Protein Data Bank el código de la proteína es 1DPX, el formato descargado se encontrará en formato pdb, por lo cual se necesitará crear su topología en gromacs cambiando su formato a .gro lo cual se realizara en la fuente del mencionado programa con el comando: `gmx pdb2gmx -f lisosima.pdb -o lisosima.gro` se seleccionará el campo de fuerza: OPLS-AA/L y como solvente TIP3P. Los archivos obtenidos de este proceso serían la lisosima.gro que ya tendría incluido ya velocidades y posiciones de los átomos de la proteína y el archivo topol.top que contendría la topología de la misma. Después se colocará una caja para que la proteína se encuentre dentro de esta, también se editara su tamaño, se realizará en la fuente de gromacs mediante en comando `gmx editconf -f lisosima.gro -o lisosima_box.gro -c -d 1.8 -bt cubic`, la caja será cubica la lisosima se encontrara en el centro a una distancia de 1.8 mm de los bordes de la caja, obteniéndose como archivo a lisosima\_box.gro. Después se procederá a añadirle el solvente a la proteína con el comando `gmx solvate -cp lisosima_box.gro -cs tip4p.gro -o lisosima_sol.gro -p topol.top`, después de este proceso se

observara cuantas moléculas de solvente se encuentran por cada proteína. El siguiente paso vendría a ser la neutralización del sistema mediante los comandos de: `gmx grompp -f ions.mdp -c prueba_sol.gro -p topol.top -o ions.tpr`.

`Gmx genion -s ions.tpr -o prueba_ions.gro -p topol.top -pname NA -nname CL -neutral -conc 290`, para hacer que el programa neutralice las cargas con iones Na e iones Cl respectivamente y hacer que todo tenga una concentración de 290 mmol/l.

Antes de comenzar con la dinámica se tiene que realizar una minimización de energía con el siguiente comando `gmx grompp -f minim.mdp -c prueba_ions.gro -p topol.top -o em.tpr` y se ejecutara con el comando `gmx mdrun -v -deffnm em`.

Después se equilibrara con respecto de la temperatura con los comandos: `gmx grompp -f nvt.mdp -c em.gro -r em.gro -p topol.top -o nvt.tpr` Y se ejecutara con el comando `gmx mdrun -deffnm nvt`.

En el archivo `nvt.mdp` se encontrara la temperatura a la cual se equilibrará el modelo la cual aparece en Kelvin, este archivo e actualizará dependiendo de la temperatura desde los 5C hasta los 37C.

Se creará un archivo de entrada a la dinámica usando el comando `gmx grompp -f minim.mdp -c prueba_ions.gro -p topol.top -o minim.tpr` esto nos permitirá generar un único archivo de entrada a la dinámica que sera el `minim.tpr` y comenzara a correr la dinámica `gmx mdrun -deffnm minim`.

Para obtener la imagen de la estructura molecular se utilizó el programa UCSF Chimera, para la realización de los gráficos se utilizó el programa Gnuplot

### **Instrumentos:**

El trabajo se realizará en el sistema operativo Ubuntu utilizando el programa Gromacs 2019

### **Campo de Verificación**

Unidades de estudio:

Se realizarán dinámicas para verificar la estabilidad de la proteína a 5, 15, 30, 33, 37 grados centígrados.

Temporalidad: Se realizará en el año 2024

Ubicación espacial: Arequipa, Perú.

Tipo de investigación: Experimental

Nivel de investigación: Descriptiva experimental

### **Estrategia de Recolección de Datos**

Organización: Los resultados se organizarán en los documentos em.log, em.edr: archivo de energía binaria, npt.edr y md\_0\_1.log: archivo de salida de la dinámica.

Recursos: Solo se requirieran recursos humanos.

### **Validación de los instrumentos:**

Se hizo una prueba piloto colocando a la proteína a una temperatura de 27 grados centígrados después está la estructura no evidenció cambios significativos mostrados en el RS md y radio de giro. Este hallazgo sería un buen resultado preliminar para observar la estabilidad de esta a los diferentes grados para después ser utilizada con fines oftalmológicos

### CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad se presenta un aumento del síndrome de ojo seco que suele ser causado entre otros por el uso excesivo de computadoras, síndrome de Sjögren, edad avanzada, etc. Para aliviar los síntomas y posibles complicaciones se utilizan lágrimas artificiales. En las lágrimas naturales se encuentran proteínas bactericidas que previenen en gran medida las infecciones oculares, uno de ellos es la lisozima. Al momento no se encuentran en el mercado soluciones oftálmicas que a parte de su función lubricante cuenten con algún componente bactericida por lo cual se realizó este estudio para determinar su estabilidad a diferentes temperaturas, los resultados se discutirán en este capítulo.

#### Para la Temperatura 5°

Nuestra Proteína 1DPX se ha sometido a una simulación de dinámica molecular de 5 grados centígrado (278.15K) y se ha obtenido la raíz de la desviación media cuadrática de las distancias (RMSD), lo que nos muestra que la proteína ha fluctuado entre los 0ns hasta los 25ns en forma muy severa, luego ha entrado a una región de pre-equilibrio entre los 30ns hasta los 92ns, luego de lo cual claramente se ha llegado a una zona de equilibrio térmico de la proteína, como se puede ver en la figura 1.

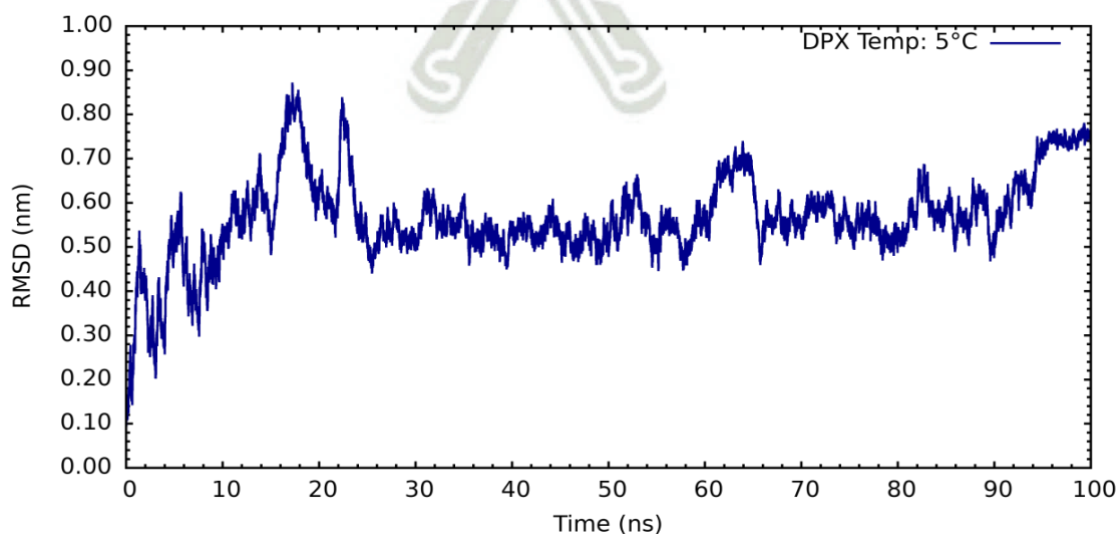


Figura 1. Análisis de Raíz de Desviación Media Cuadrática temperatura 5°C.

Así mismo, se realizó el análisis de la raíz de la desviación media cuadrática de las fluctuaciones (RMSF) de los residuos durante la simulación de dinámica molecular (ver figura 2), en ella podemos ver que los residuos que más han contribuido a la fluctuación se hallan en la cabeza de la proteína entre los residuos 1 al 20, luego de lo cual se han mantenido en forma casi constante en un movimiento probablemente roto traslacional, lo que es congruente con el análisis del RMSD.

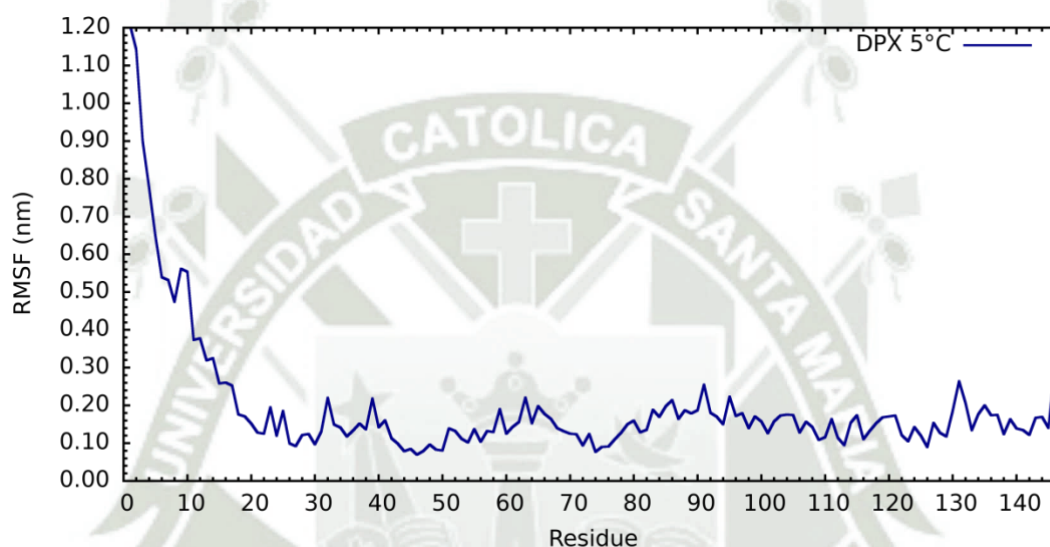


Figura 2. Análisis de Raíz de la Desviación Media Cuadrática de las Fluctuaciones temperatura 5°C.

Por otro lado, también se realizó el análisis del radio de giro (ver figura 3) para la proteína, logrando ver que durante todo el proceso la proteína a tendido a un proceso de compactación, seguramente por un incremento en el número de puentes de hidrógeno, de la figura 3 podemos encontrar que al inicio antes de los 20ns, la proteína pierde compactación y la vuelve a ganar en dos oportunidades, luego de lo cual inicia su proceso de compactación continua, con ligeros reacomodos como se observa entre los 42ns hasta los 60ns, y entre los 80ns a los 90ns, luego de lo cual ya permanece constante.

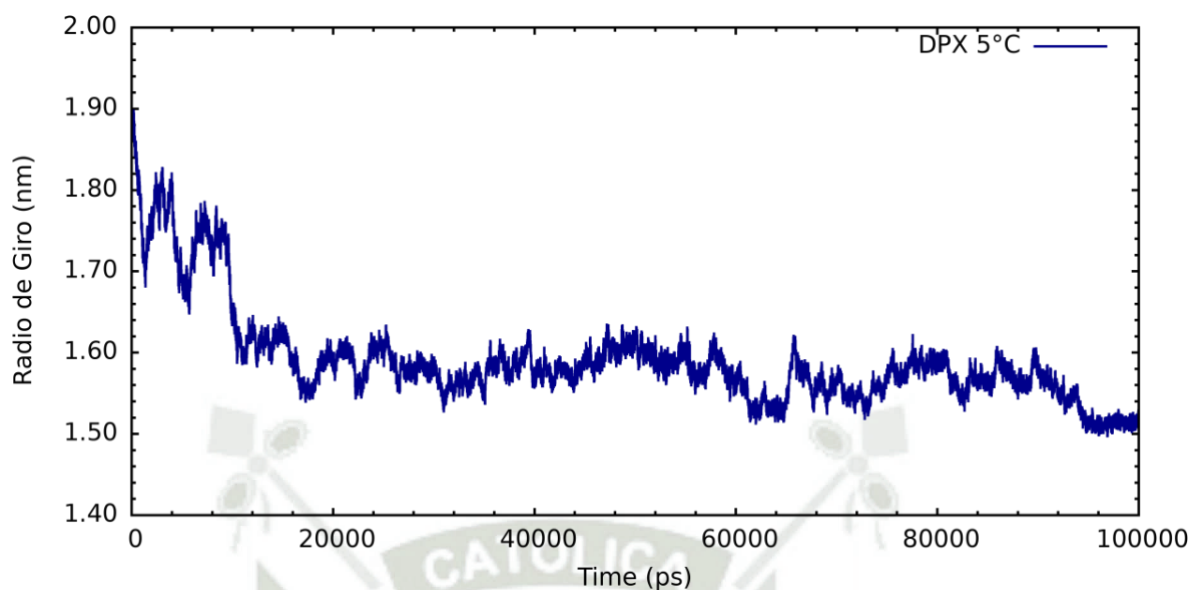


Figura 3. Análisis de Radio de Giro temperatura 5°C.

Lo anterior puede ser corroborado mediante al análisis de los puentes de hidrogeno (ver figura 4), donde se ve como el sistema presenta una ganancia y perdida de los puentes de hidrógeno en la región entre 1 a 20ns, luego de lo cual a partir de los 40ns inicia una región de fluctuación entre ganancia y perdida de puentes de hidrogeno, hasta llegar a la región de 85ns donde los puentes de hidrógenos permanecen aparentemente constantes hasta el final de la simulación molecular.

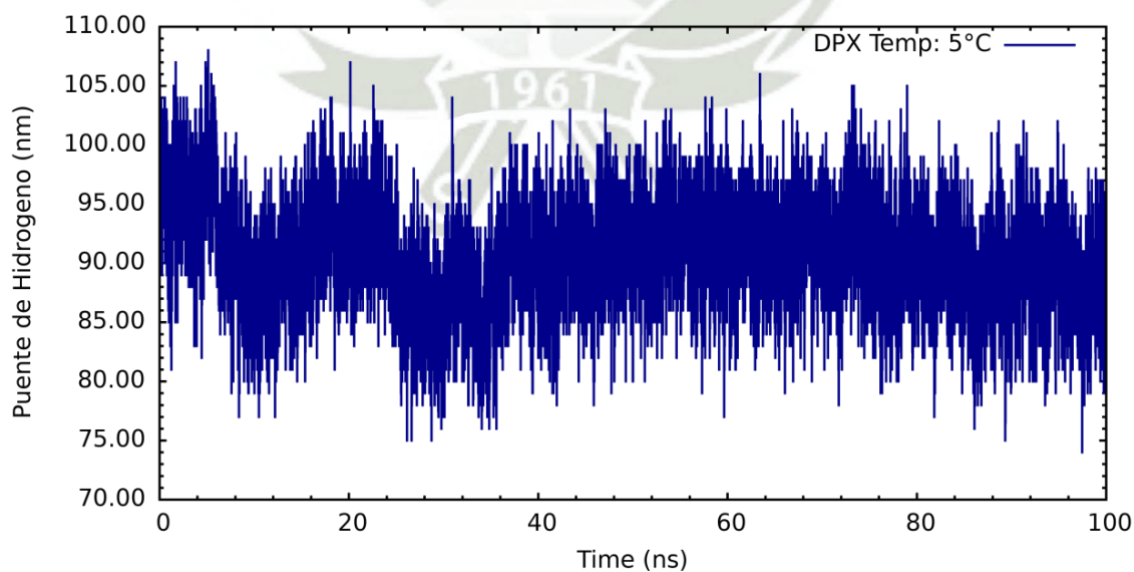


Figura 4. Análisis de Puente de Hidrógeno temperatura 5°C.

Cuando se realizó el análisis del diagrama de Ramachandran (ver figura 5), para la estructura final de la simulación de dinámica molecular a la temperatura de 5°C, podemos observar que considerando todos los residuos excepto las glicinas y prolinas, tenemos que ciento un (101) residuos se hallan en las regiones favorecidas lo que hace un 78.3% de los residuos considerados, mientras veintiocho residuos (28) se hallan en las regiones adicionalmente permitidas lo que hace el 21.7% de los residuos considerados. A todo esto, se han retirado dos (2) residuos de prolinas y glicinas terminales, y cabe considerar que un total de 13 glicinas han sido excluidas, las cuales se hallan señaladas como triángulos en la gráfica, y un total de tres (3) prolinas que también fueron retiradas.

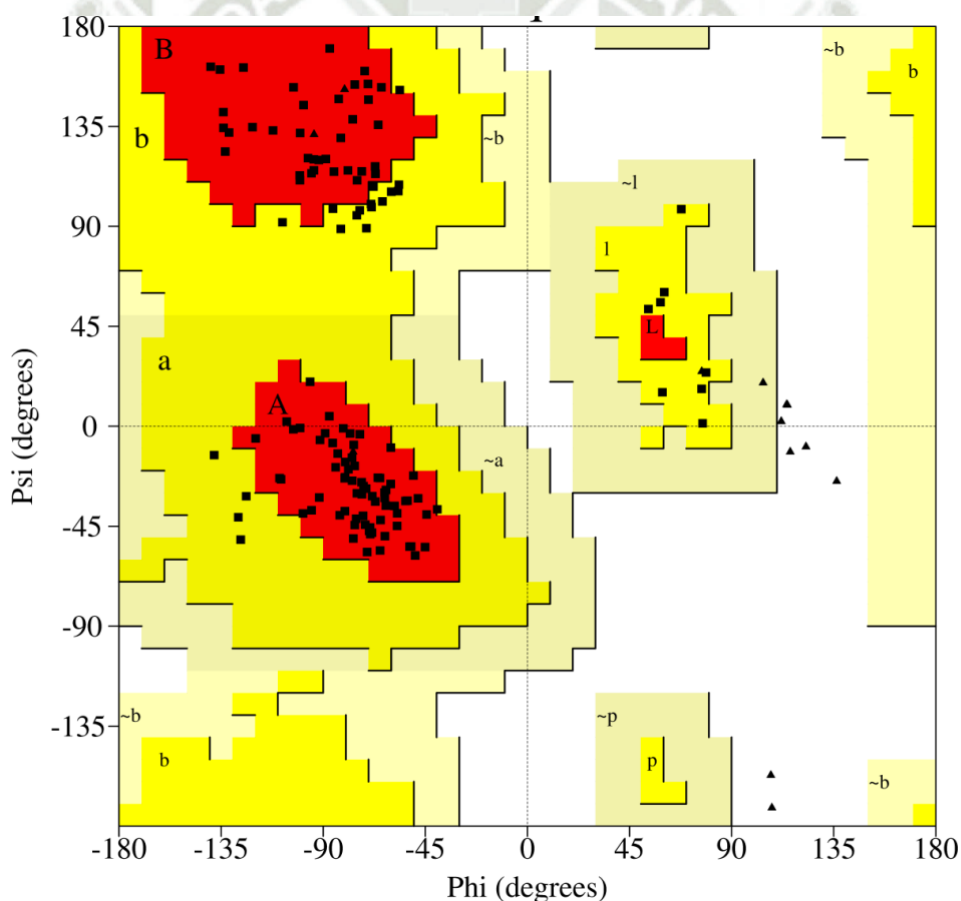


Figura 5. Análisis de Ramachandran temperatura 5°C.

La figura 6 corresponde a la estructura de la proteína 1DPX después de haber realizado una dinámica molecular a temperatura de 5°C con una trayectoria de 100ns.

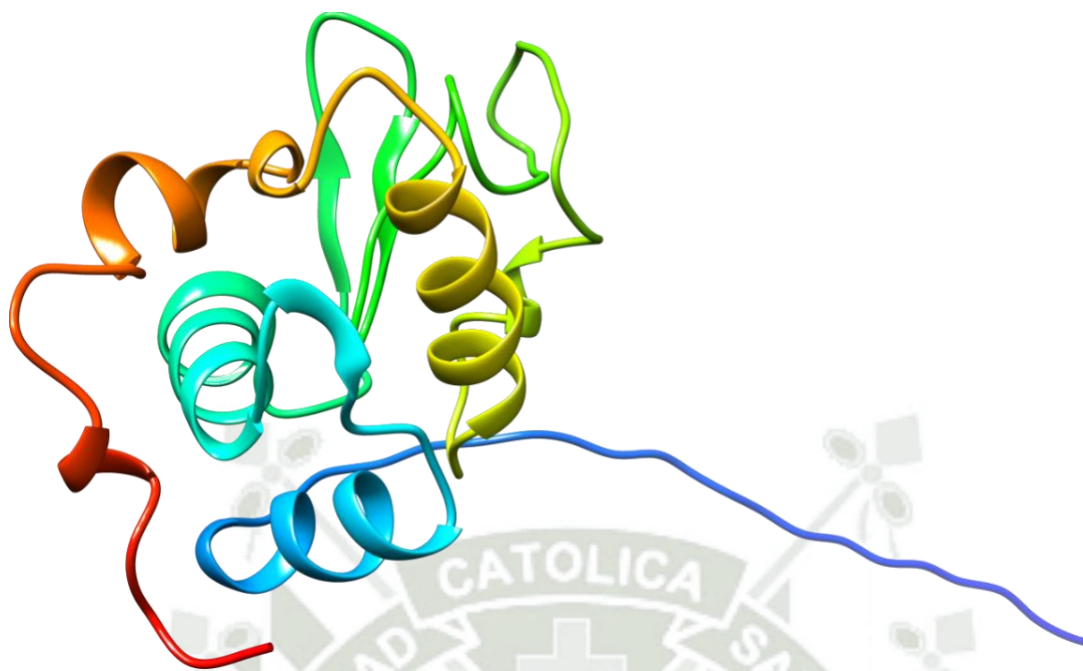


Figura 6. Estructura a temperatura 5°C.

El análisis de la estructura secundaria de la proteína 1DPX de 147 residuos aminoacídicos. Indica que, de los 147 residuos totales, 8 (el 5.4%) forman una estructura de cadena, 36 (el 24.6%) forman estructuras alfa hélice, 9 (el 6.1%) forman estructuras 3-10 hélice y los 94 residuos restantes (el 63.9% del total) adoptan otras estructuras secundarias no especificadas. En resumen, la proteína analizada tiene predominantemente estructuras secundarias no helicadas, con solo una pequeña proporción de residuos formando hélices alfa o 3-10. La mayoría de los residuos adoptan conformaciones extendidas o bucles (Figura 7).



proteína adquiere su conformación nativa a la temperatura dada. La representación gráfica muestra claramente cómo la proteína logra la termalización luego de superar las fluctuaciones y el pre-equilibrio iniciales en la Figura 8.

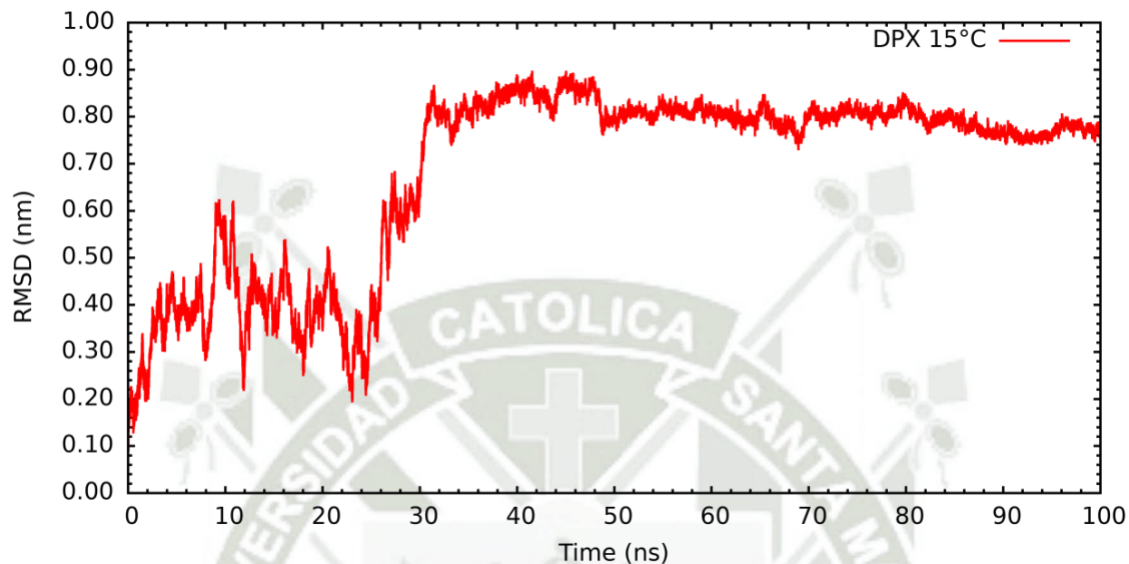


Figura 8. Análisis de Raíz de Desviación Media Cuadrática temperatura 15°C.

El análisis de la raíz cuadrada media de las fluctuaciones cuadráticas (RMSF) de los residuos durante la simulación de dinámica molecular (Figura 9) revela que las mayores contribuciones a la fluctuación se localizan en dos regiones de la proteína. Inicialmente, entre los residuos 1-20 en la cabeza de la proteína, y luego entre los residuos 60-90, se observan fluctuaciones notorias. A partir del residuo 100, los movimientos se vuelven más constantes, probablemente debido a rotación traslacional, lo cual es congruente con el análisis de RMSD. Estas fluctuaciones localizadas en la cabeza y en el segmento central de 60-90 residuos reflejan una flexibilidad conformacional inherente en esas regiones de la proteína. La menor fluctuación del resto de la cadena sugiere un plegamiento más rígido una vez que se alcanza el equilibrio, como se deduce del RMSD.

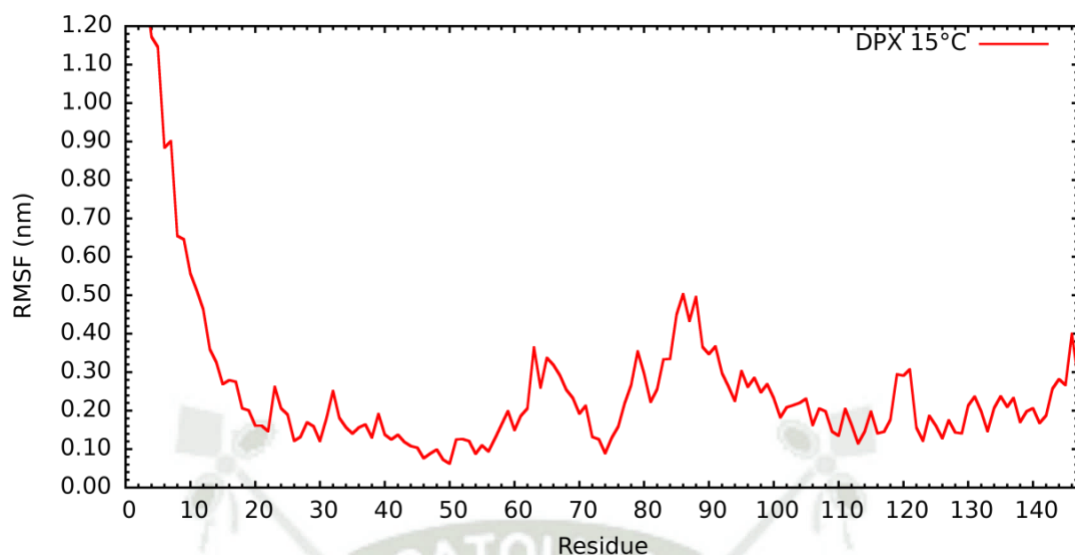


Figura 9. Análisis de Raíz de la Desviación Media Cuadrática de las Fluctuaciones temperatura 15°C.

El análisis del radio de giro de la proteína (Figura 10) muestra una dinámica de compactación en dos etapas. Inicialmente, hasta los 24ns no se evidencia compactación, sino una conformación relativamente extendida. A partir de los 24ns se inicia un proceso continuo de compactación, probablemente impulsado por un incremento en el número de puentes de hidrógeno. Esta tendencia compactante se mantiene constante hasta el final de la simulación. La transición desde una conformación desplegada a una estructura compacta refleja la adquisición de la conformación nativa termodinámicamente favorable.

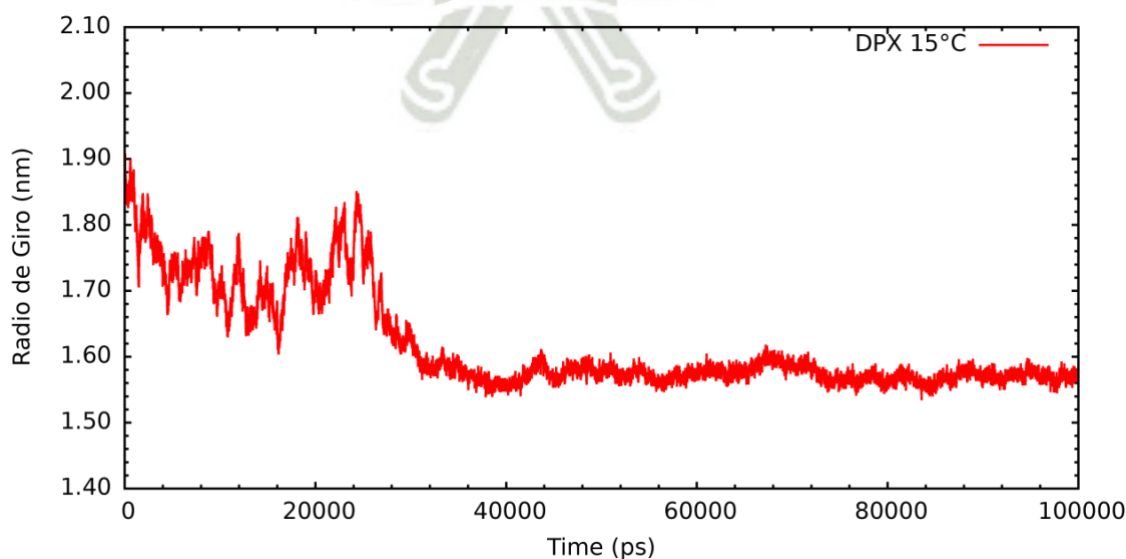


Figura 10. Análisis de Radio de Giro temperatura 15°C.

El análisis del radio de giro captura este proceso de plegamiento inducido por interacciones no covalentes fortalecidas con el tiempo. La consolidación de la estructura compacta en la segunda mitad de la simulación coincide con el equilibrio térmico deducido del RMSD.

El análisis de los puentes de hidrógeno (Figura 11) corrobora la dinámica de plegamiento deducidas del radio de giro. Entre 1-40ns se observa una ganancia y pérdida fluctuante de puentes de hidrógeno, reflejando una conformación inestable. A partir de los 40ns comienza una región de transición, con fluctuaciones entre formación y ruptura de enlaces de hidrógeno. Finalmente, alrededor de los 60ns se alcanza una meseta donde el número de puentes de hidrógeno permanece esencialmente constante hasta el final de la simulación. Esta estabilización de las interacciones no covalentes concuerda con la conformación plegada nativa. Así, el análisis conjunto del radio de giro y los puentes de hidrógeno describe un proceso continuo de compactación inducido por el fortalecimiento progresivo de las interacciones no covalentes que estabilizan la estructura terciaria. La consolidación final de los enlaces de hidrógeno se correlaciona con el estado de equilibrio térmico.

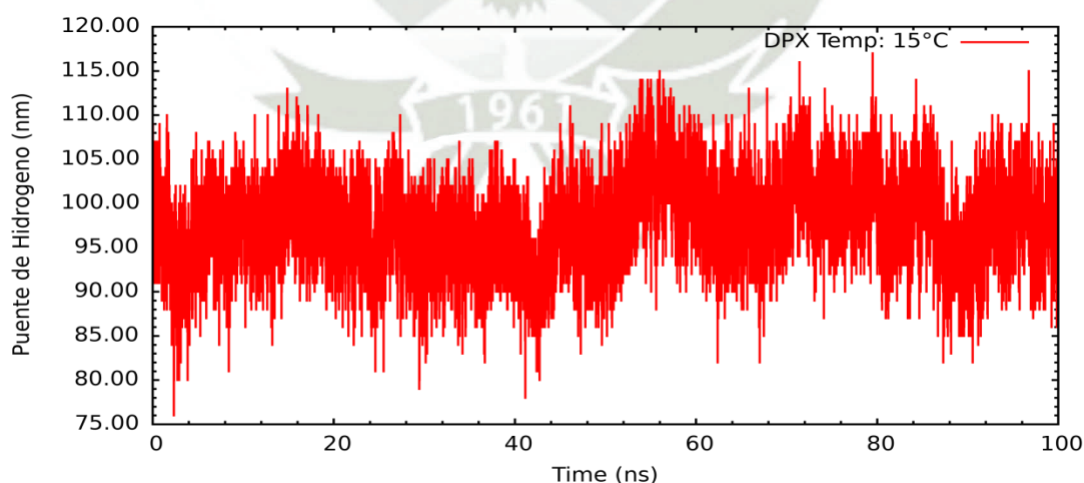


Figura 11. Análisis de Puente de Hidrógeno temperatura 5°C.

Cuando realizamos el análisis del diagrama de Ramachandran (ver figura 12), para la estructura final de la simulación de dinámica molecular a la temperatura de 15°C, podemos observar que

considerando todos los residuos excepto las glicinas y prolinas, tenemos que ciento tres (103) residuos se hallan en las regiones favorecidas lo que hace un 79.8% de los residuos considerados, mientras veintitrés residuos (23) se hallan en las regiones adicionalmente permitidas lo que hace el 17.8% de los residuos considerados. A todo esto, se han retirado tres (3) residuos de prolinas y glicinas terminales, y cabe considerar que un total de 13 glicinas han sido excluidas, las cuales se hallan señaladas como triángulos en la gráfica, y un total de tres (3) prolinas que también fueron retiradas.

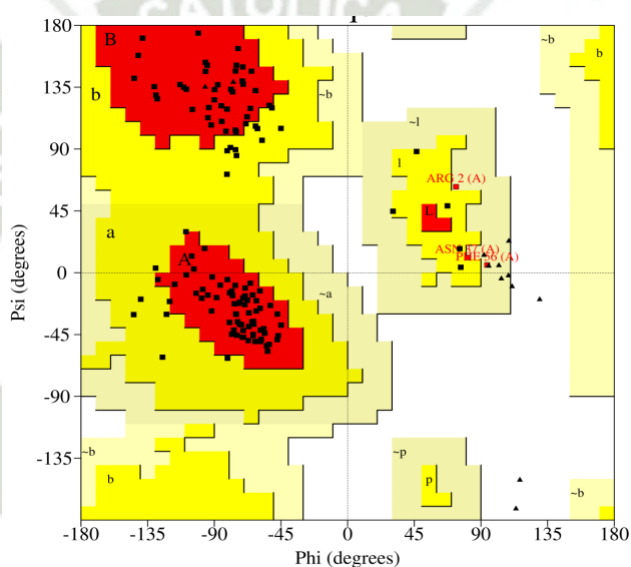


Figura 12. Análisis de Ramachandran temperatura 15°C.

La figura 13 corresponde a la estructura de la proteína 1DPX después de haber realizado una dinámica molecular a temperatura de 15°C con una trayectoria de 100ns.

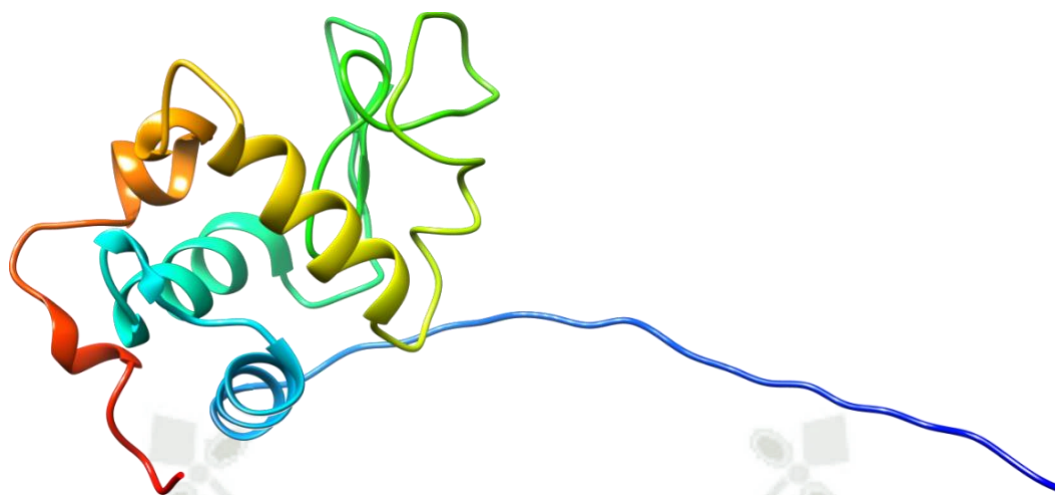


Figura 13. Estructura a temperatura 15°C.

El análisis de la estructura secundaria de la proteína 1DPX de 147 residuos aminoacídicos. Indica que, de los 147 residuos totales, 8 (el 5.4%) forman una estructura de cadena, 40 (el 27.2%) forman estructuras alfa hélice, 12 (el 8.2%) forman estructuras 3-10 hélice y los 87 residuos restantes (el 59.2% del total) adoptan otras estructuras secundarias no especificadas. En resumen, la proteína analizada tiene predominantemente estructuras secundarias no helicoidales, con solo una pequeña proporción de residuos formando hélices alfa o 3-10. La mayoría de los residuos adoptan conformaciones extendidas o bucles (Figura 14).



estabilización de la raíz cuadrada media de las desviaciones cuadráticas medias (RMSD) en la Figura 15.

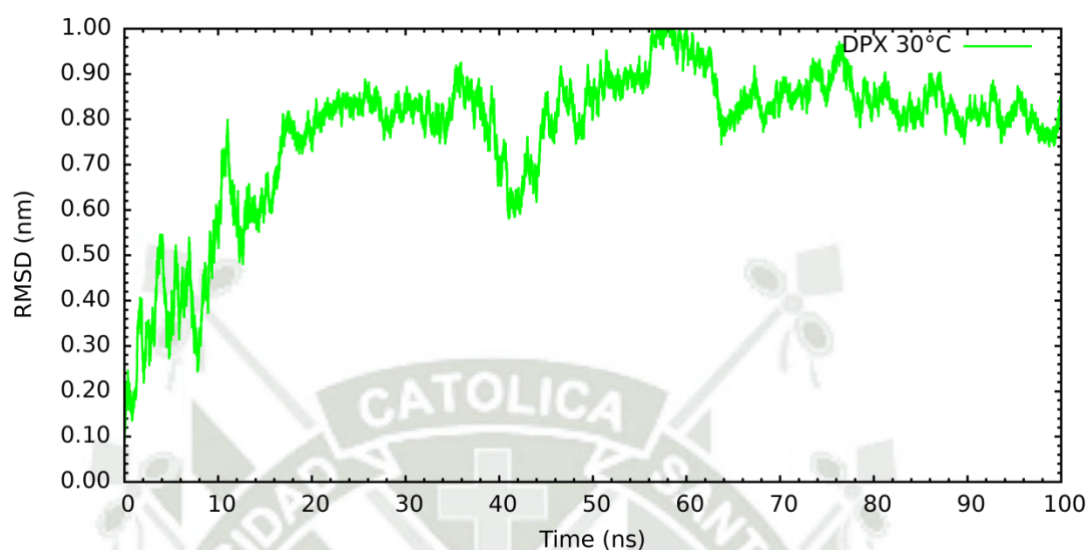


Figura 15. Análisis de Raíz de Desviación Media Cuadrática temperatura 30°C.

El análisis de la raíz cuadrada media de las fluctuaciones cuadráticas (RMSF) de los residuos durante la simulación de dinámica molecular (Figura 16), revela que la mayor contribución a la fluctuación se localiza principalmente en la región N-terminal de la proteína. Específicamente, entre los residuos 1-20 en la cabeza de la proteína, se observan las mayores fluctuaciones. En contraste, a partir del residuo 70 los movimientos se vuelven más constantes, probablemente debido a rotación traslacional, lo cual concuerda con el análisis de RMSD. Esta mayor flexibilidad conformacional de la región N-terminal refleja su naturaleza menos estructurada en comparación con el resto de la proteína. La disminución de las fluctuaciones después del residuo 70 sugiere una conformación más rígida y plegada en esa región, congruente con el estado de equilibrio térmico deducido del RMSD.

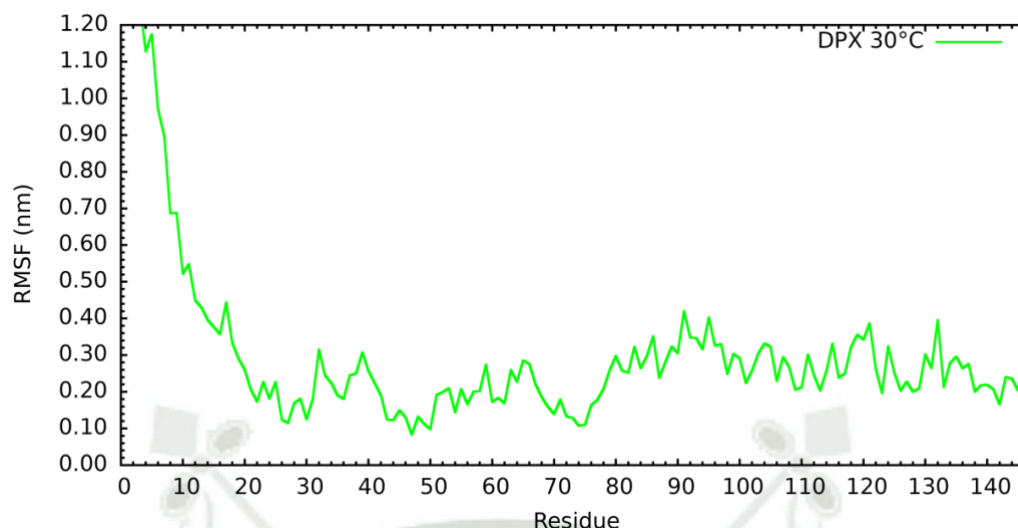


Figura 16. Análisis de Raíz de la Desviación Media Cuadrática de las Fluctuaciones temperatura 30°C.

El análisis del radio de giro (Figura 17) muestra una compactación completa de la proteína en dos etapas. Inicialmente, hasta los 15ns no hay evidencia significativa de compactación, con una conformación relativamente extendida. A partir de los 15ns comienza un proceso sostenido de reducción del radio de giro, indicando una transición hacia una estructura más compacta, probablemente impulsada por un aumento en el número de puentes de hidrógeno. Esta tendencia compactante continúa de forma estable hasta el final de la simulación, cuando se alcanza una conformación plenamente plegada. La dinámica de dos etapas desde una estructura desplegada hasta la forma nativa compacta refleja la adquisición termodinámicamente favorable de la conformación plegada.

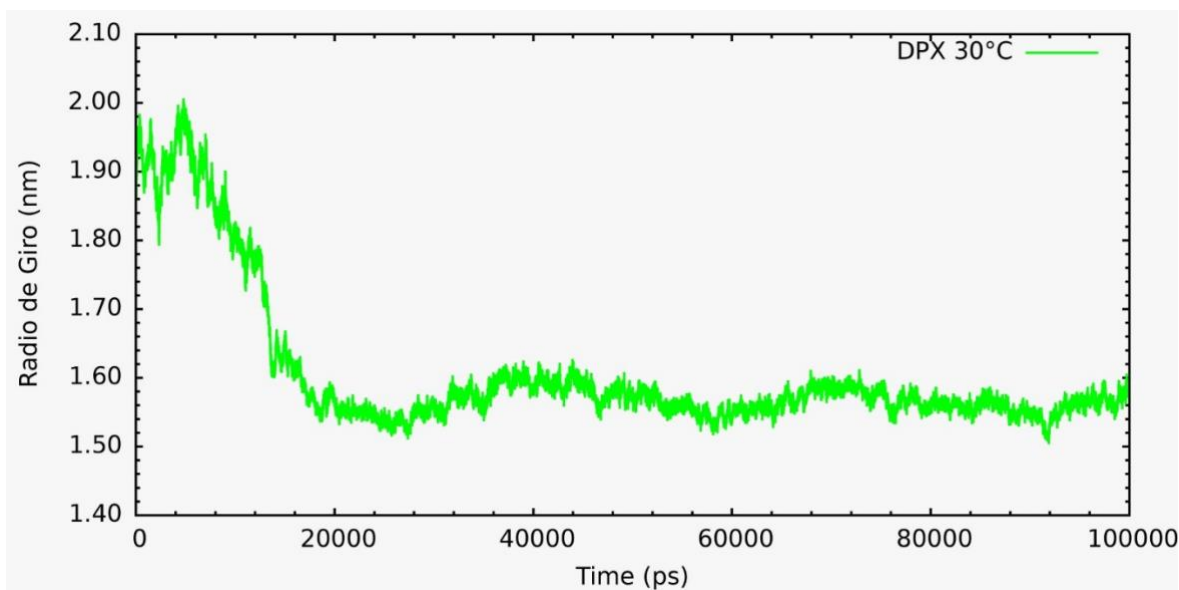


Figura 17. Análisis de Radio de Giro temperatura 30°C.

El análisis de los puentes de hidrógeno (Figura 18) corrobora elocuentemente la dinámica de plegamiento deducción del radio de giro. Inicialmente, entre 1-40ns, predomina un equilibrio fluctuante entre formación y ruptura de enlaces de hidrógeno, denotando una conformación proteica inestable y desplegada. A partir de ~40ns emerge una región de transición, con oscilaciones decrecientes en el número de puentes hidrógeno a medida que la estructura se estabiliza. Finalmente, alrededor de 70ns se alcanza un estado mesetario, donde los puentes de hidrógeno se mantienen esencialmente inalterados, señalando el advenimiento de la conformación plegada nativa.

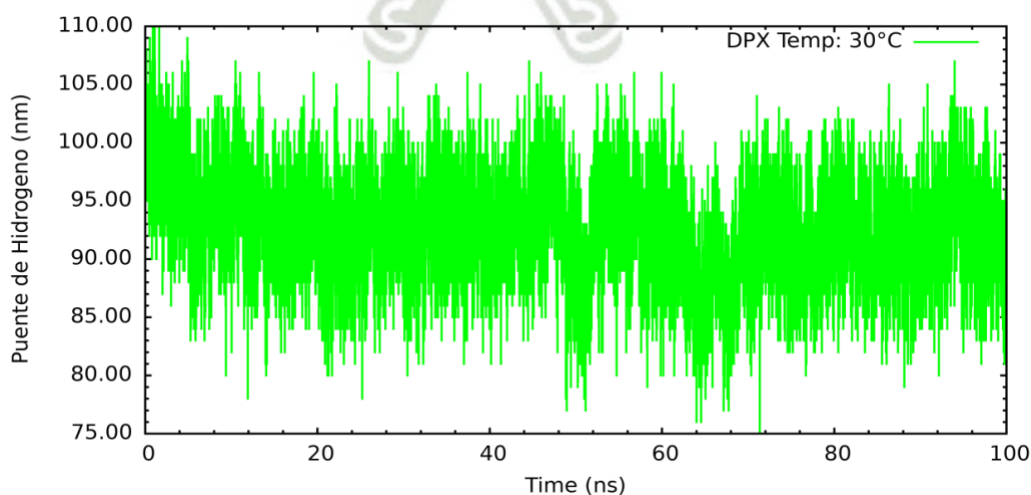


Figura 18. Análisis de Puente de Hidrógeno temperatura 30°C.

Cuando realizamos el análisis del diagrama de Ramachandran (ver figura 19), para la estructura final de nuestra simulación de dinámica molecular a la temperatura de 30°C, podemos observar que considerando todos los residuos excepto las glicinas y prolinas, tenemos que ciento cinco (105) residuos se hallan en las regiones favorecidas lo que hace un 81.4% de los residuos considerados, mientras veintidós residuos (22) se hallan en las regiones adicionalmente permitidas lo que hace el 17.8% de los residuos considerados. A todo esto, se han retirado dos (2) residuos de prolinas y glicinas terminales, y cabe considerar que un total de 13 glicinas han sido excluidas, las cuales se hallan señaladas como triángulos en la gráfica, y un total de tres (3) prolinas que también fueron retiradas.

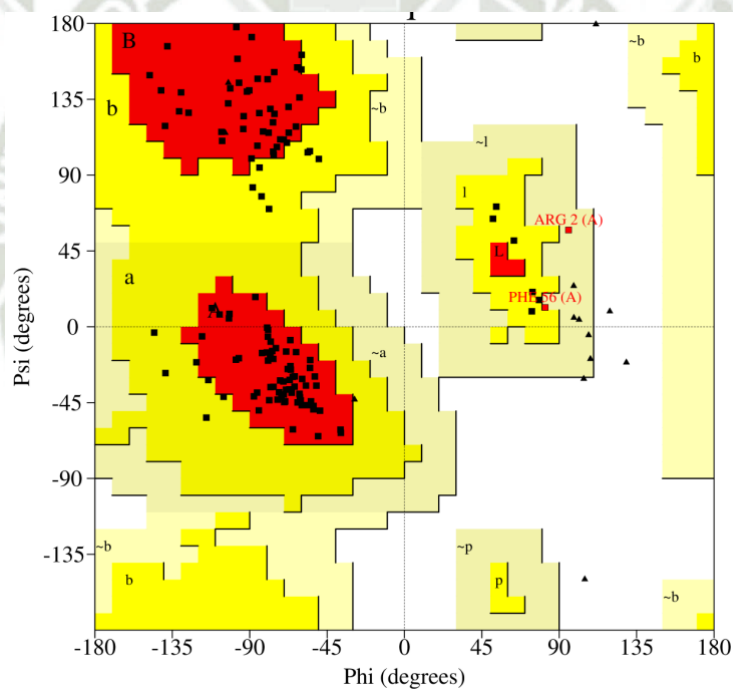


Figura 19. Análisis de Ramachandran temperatura 30°C.

La figura 20 corresponde a la estructura de la proteína 1DPX después de haber realizado una dinámica molecular a temperatura de 30°C con una trayectoria de 100ns.

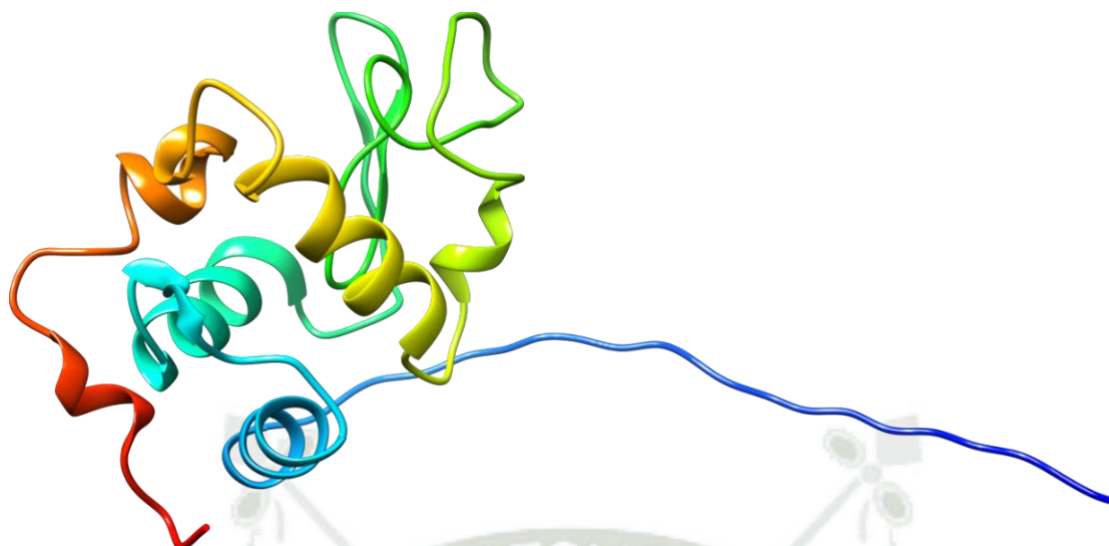


Figura 20. Estructura a temperatura 30°C.

El análisis de la estructura secundaria de la proteína 1DPX de 147 residuos aminoacídicos. Indica que, de los 147 residuos totales, 8 (el 5.4%) forman una estructura de cadena, 39 (el 26.5%) forman estructuras alfa hélice, 13 (el 8.8%) forman estructuras 3-10 hélice y los 87 residuos restantes (el 59.2% del total) adoptan otras estructuras secundarias no especificadas. En resumen, la proteína analizada tiene predominantemente estructuras secundarias no helicoidales, con solo una pequeña proporción de residuos formando hélices alfa o 3-10. La mayoría de los residuos adoptan conformaciones extendidas o bucles (Figura 21).

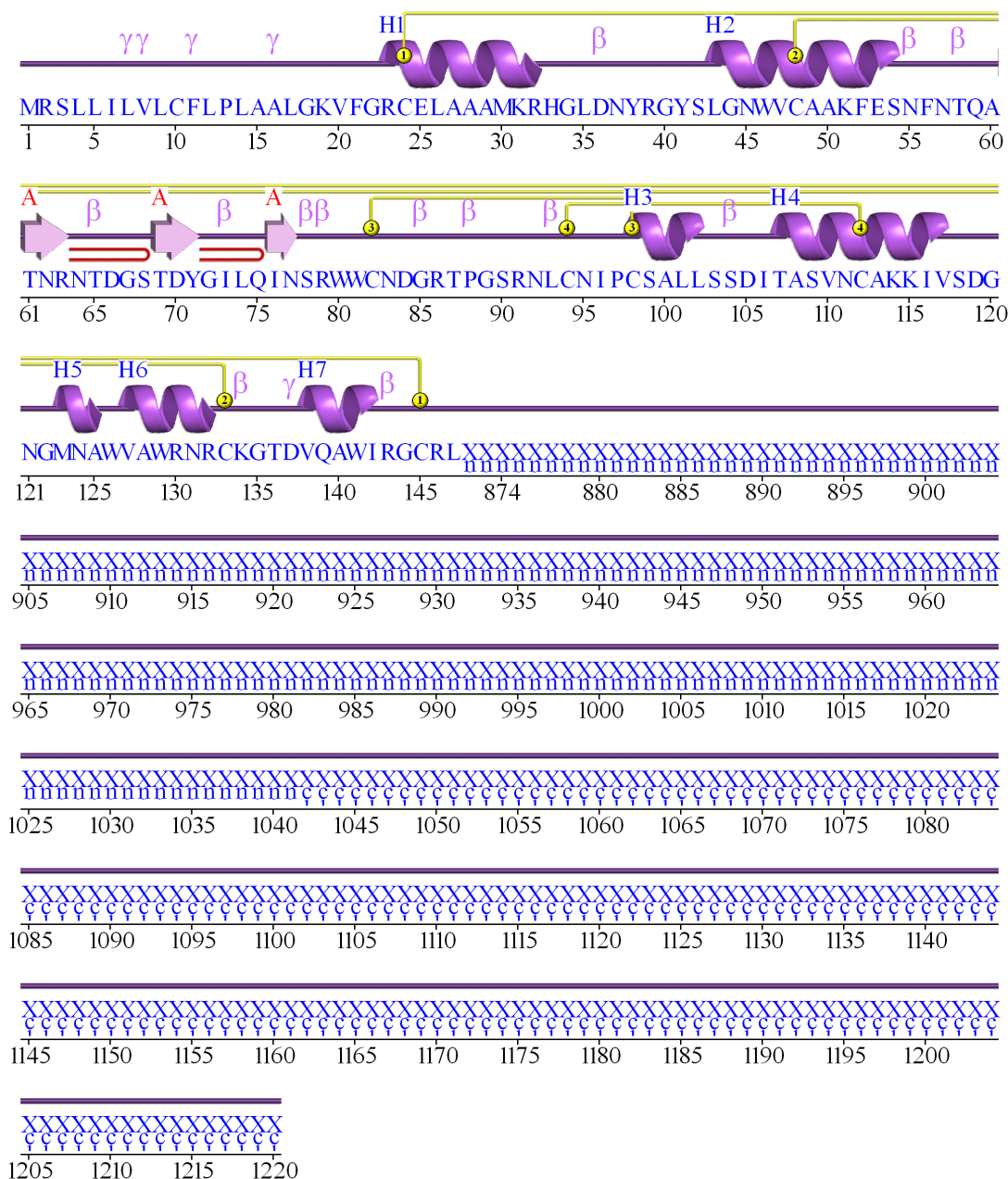


Figura 21. Estructura secundaria temperatura 30°C.

### Temperatura 33°

La simulación de dinámica molecular de la proteína a 33°C (306.15K) revela una progresión en tres etapas distintas hacia el equilibrio térmico. Inicialmente, entre 0 y 30ns, se observan amplias fluctuaciones conformacionales del backbone proteico, con valores altos de RMSD indicando una conformación desestructurada. Posteriormente, entre 30 y 60ns, se distingue una etapa de pre-equilibrio caracterizada por fluctuaciones de menor amplitud y una tendencia direccional en el RMSD, reflejando la convergencia hacia el estado nativo. Finalmente, después de 60ns se logra el

equilibrio termodinámico, evidenciado por la estabilización del RMSD con mínima variabilidad alrededor de un valor constante (figura 22).

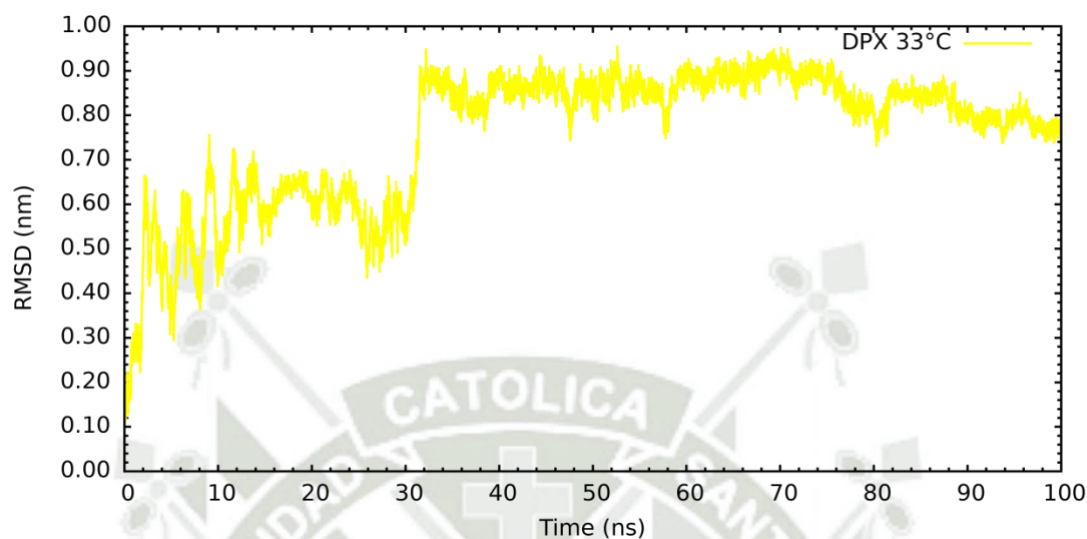


Figura 22. Análisis de Raíz de Desviación Media Cuadrática temperatura 33°C.

El análisis de RMSF (Figura 23) muestra que los residuos 1-20, correspondientes a la región N-terminal, exhiben los valores más altos de fluctuación cuadrática media. Esta flexibilidad conformacional incrementada es consistente con el carácter desestructurado de dicha región. En contraste, a partir del residuo 50 se observa una disminución sustancial de las fluctuaciones RMSF, sugiriendo la adquisición de una conformación más rígida y estructurada en esta porción de la cadena polipeptídica, probablemente debido a restricciones por empaquetamiento hidrofóbico y enlaces no-covalentes. La atenuación de las fluctuaciones RMSF en la región C-terminal concuerda con la conformación plegada nativa deducida del análisis RMSD. Así, el perfil RMSF refleja la transición desde una región flexible N-terminal hasta un núcleo estructurado C-terminal, consistente con el proceso de plegamiento.

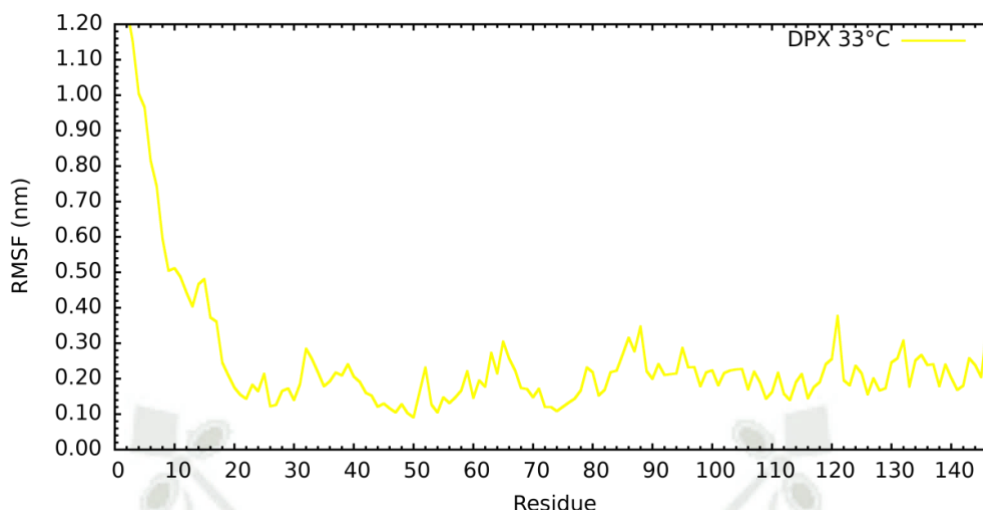


Figura 23. Análisis de Raíz de la Desviación Media Cuadrática de las Fluctuaciones temperatura 33°C.

La evolución temporal del radio de giro (Figura 24) revela un proceso de compactación proteica que transcurre en tres etapas cinéticas distintivas. Inicialmente, en la fase 0-20ns, predomina una meseta con ausencia de variaciones significativas, denotando una conformación extendida sin evidencia de elementos secundarios estables. Posteriormente, en la fase 20-45ns, se observa un pronunciado descenso del radio de giro, indicativo del inicio de la transición hacia un estado compacto y plegado, probablemente impulsado por el progresivo establecimiento de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Finalmente, de 45ns en adelante, el sistema alcanza un mínimo estacionario en el radio de giro, reflejando la consolidación de la estructura terciaria globular termodinámicamente favorable.

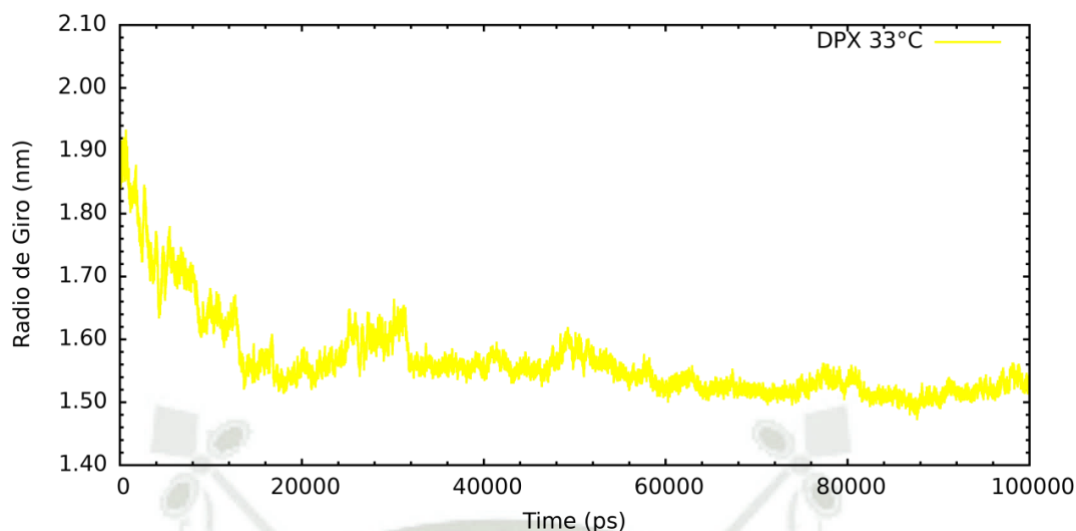


Figura 24. Análisis de Radio de Giro temperatura 33°C.

El análisis de los puentes de hidrógeno (Figura 25) corrobora elocuentemente la dinámica de plegamiento deducción del radio de giro. Predomina desde el inicio un equilibrio fluctuante entre formación y ruptura de enlaces de hidrógeno, denotando una conformación proteica inestable y desplegada. Alcanzando un estado mesetario, donde los puentes de hidrógeno se mantienen esencialmente inalterados, mostrando la conformación plegada nativa.

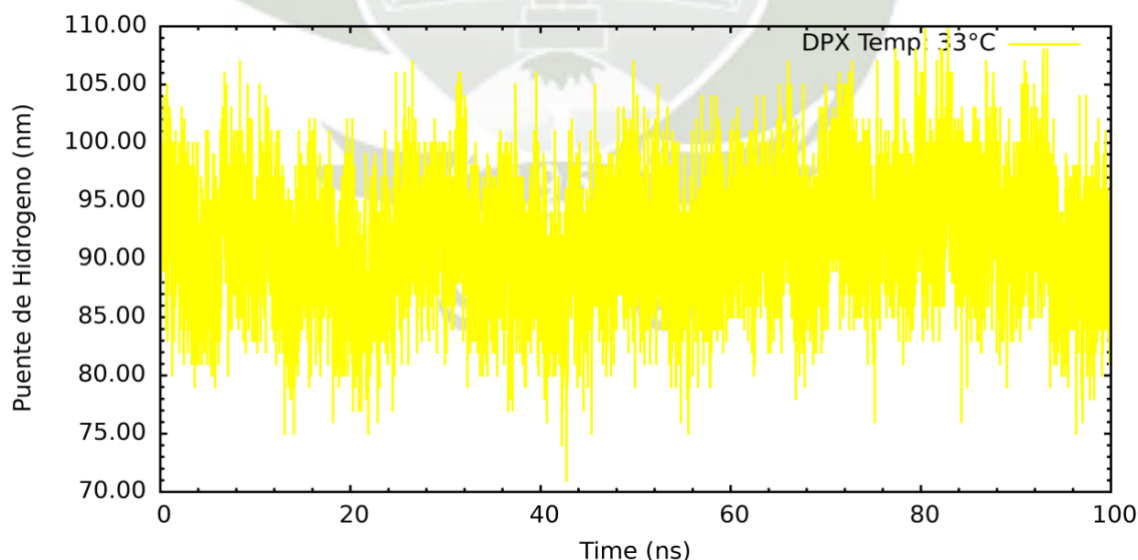


Figura 25. Análisis de Puente de Hidrógeno temperatura 33°C.

Cuando realizamos el análisis del diagrama de Ramachandran (ver figura 26), para la estructura final de nuestra simulación de dinámica molecular a la temperatura de 33°C, podemos observar

que considerando todos los residuos excepto las glicinas y prolinas, tenemos que ciento cuatro (104) residuos se hallan en las regiones favorecidas lo que hace un 80.6% de los residuos considerados, mientras veinticuatro residuos (24) se hallan en las regiones adicionalmente permitidas lo que hace el 18.6% de los residuos considerados. A todo esto, se han retirado dos (2) residuos de prolinas y glicinas terminales, y cabe considerar que un total de 13 glicinas han sido excluidas, las cuales se hallan señaladas como triángulos en la gráfica, y un total de tres (3) prolinas que también fueron retiradas.

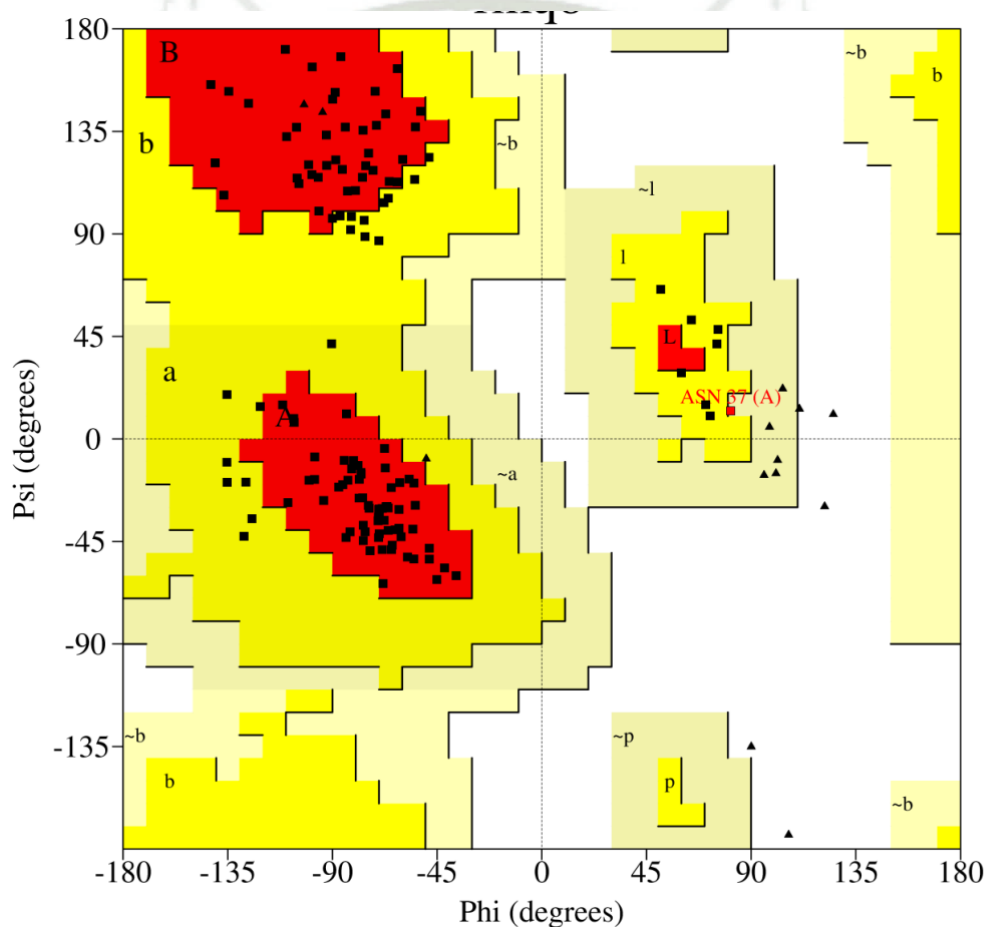


Figura 26. Análisis de Ramachandran temperatura 33°C.

La figura 27 corresponde a la estructura de la proteína 1DPX después de haber realizado una dinámica molecular a temperatura de 33°C con una trayectoria de 100ns.

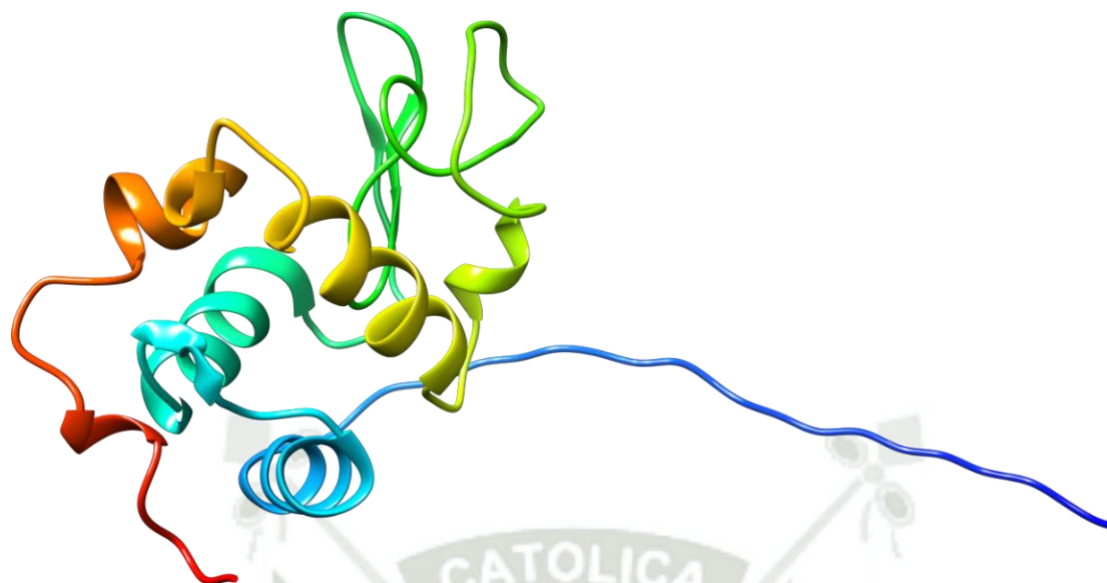


Figura 27. Estructura a temperatura 33°C.

El análisis de la estructura secundaria de la proteína (1DPX) de 147 residuos aminoacídicos. Indica que, de los 147 residuos totales, 12 (el 8.2%) forman una estructura de cadena, 40 (el 27.2%) forman estructuras alfa hélice, 11 (el 7.5%) forman estructuras 3-10 hélice y los 84 residuos restantes (el 57.1% del total) adoptan otras estructuras secundarias no especificadas. En resumen, la proteína analizada tiene predominantemente estructuras secundarias no helicoidales, con solo una pequeña proporción de residuos formando hélices alfa o 3-10. La mayoría de los residuos adoptan conformaciones extendidas o bucles (Figura 28).



RMSD, reflejando la convergencia hacia el estado nativo. Finalmente, después de 70ns se observa el equilibrio termodinámico, evidenciado por la estabilización del RMSD con mínima variabilidad alrededor de un valor constante (figura 29).

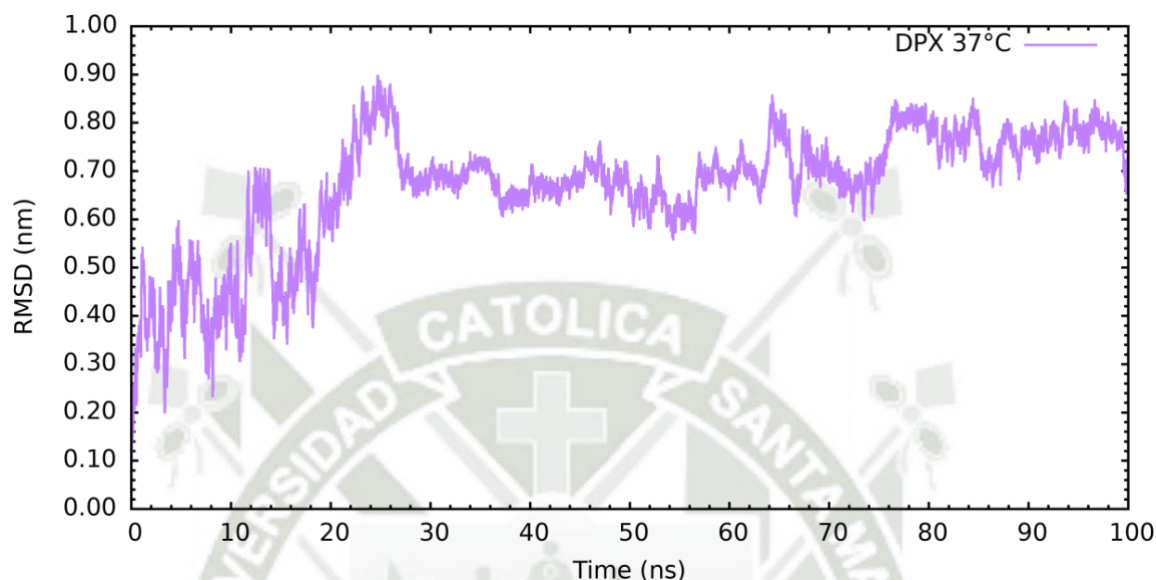


Figura 29. Análisis de Raíz de Desviación Media Cuadrática temperatura 37°C.

El análisis de RMSF (Figura 30) muestra que los residuos 1-20, correspondientes a la región N-terminal, exhiben los valores más altos de fluctuación cuadrática media. Esta flexibilidad conformacional incrementada es consistente con el carácter desestructurado de dicha región. En contraste, a partir del residuo 60 hasta el 90 se observa un incremento sustancial de las fluctuaciones RMSF, sugiriendo el movimiento conformacional para luego llegar a una estructura más estable. Finalmente, a partir del residuo 100 la atenuación de las fluctuaciones RMSF en la región C-terminal concuerda con la conformación plegada nativa deducida del análisis RMSD.

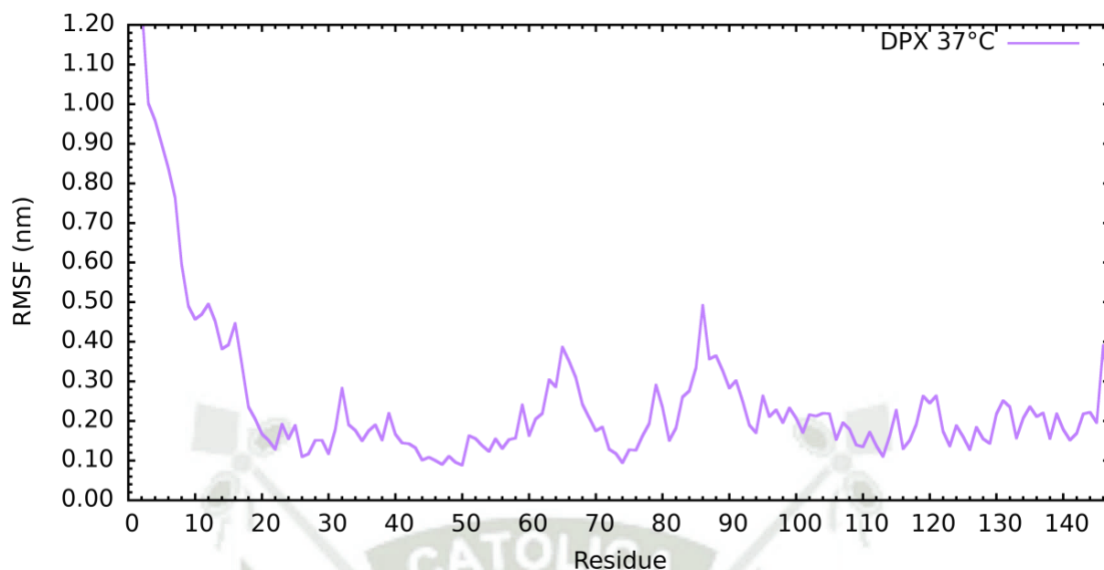


Figura 30. Análisis de Raíz de la Desviación Media Cuadrática de las Fluctuaciones temperatura 37°C.

El radio de giro (Figura 31) revela un proceso de compactación proteica que transcurre en dos etapas cinéticas distintivas. Inicialmente, en la fase 0-20ns muestra una transición hacia una estructura más compacta, Posteriormente, a partir de los 20ns se observa una transición hacia una estructura más compacta, probablemente impulsada por un aumento en el número de puentes de hidrógeno, reflejando la consolidación de la estructura terciaria globular termodinámicamente favorable.

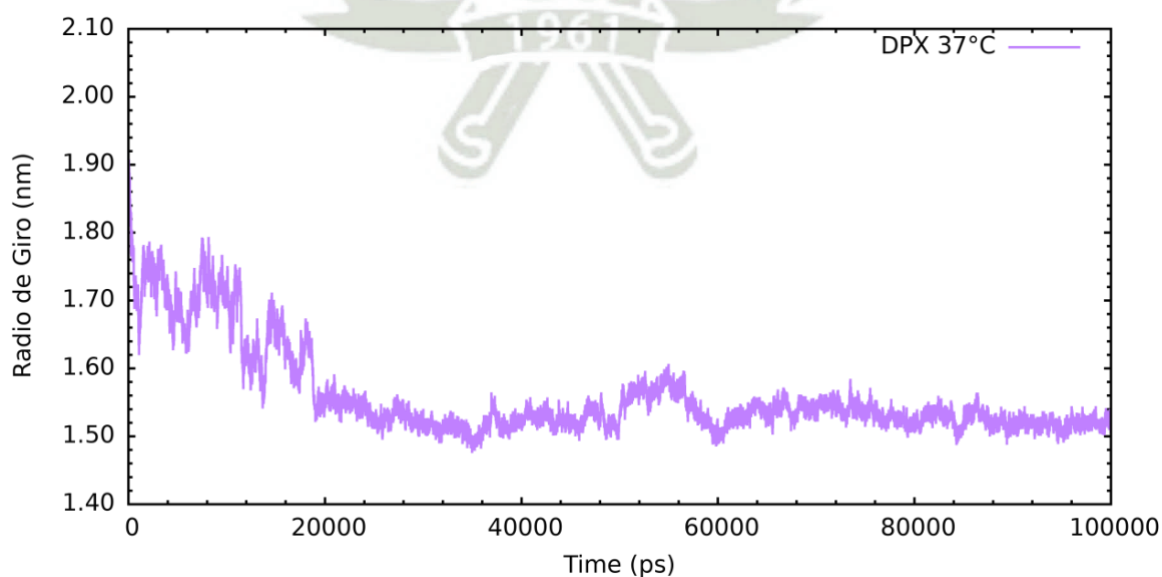


Figura 31. Análisis de Radio de Giro temperatura 37°C.

El análisis de los puentes de hidrógeno (Figura 32) muestra dos etapas, inicialmente entre 1-46ns se observa una ganancia y pérdida fluctuante de puentes de hidrógeno, reflejando una conformación inestable. A partir de los 46ns comienza una región de transición, con fluctuaciones notorias. Finalmente, alrededor de los 80ns se alcanza una meseta donde el número de puentes de hidrógeno permanece esencialmente constante hasta el final de la simulación.

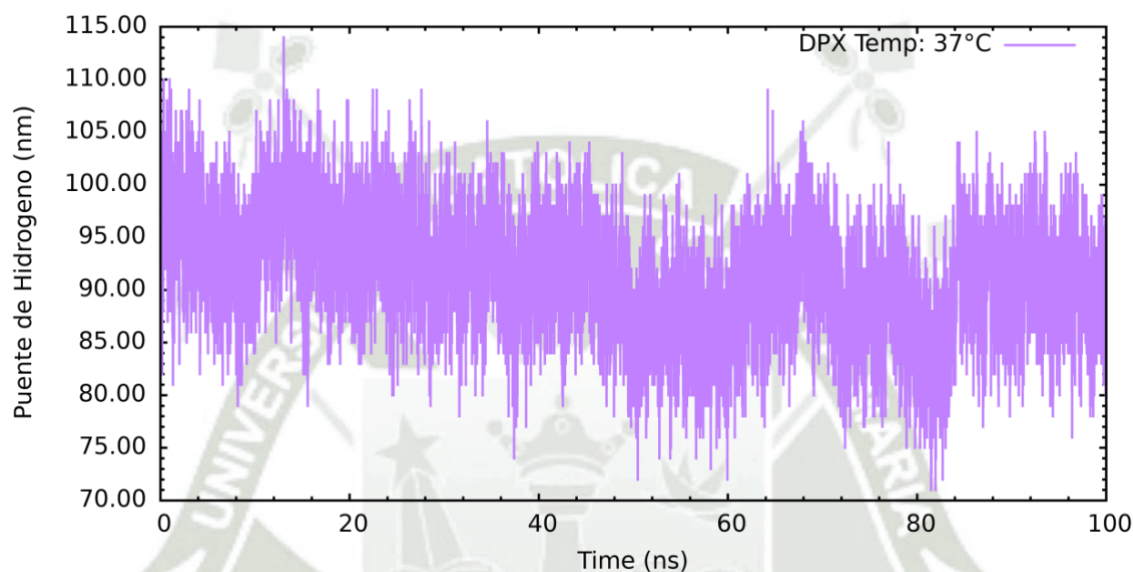


Figura 32. Análisis de Puente de Hidrógeno temperatura 37°C.

Cuando realizamos el análisis del diagrama de Ramachandran (ver figura 33), para la estructura final de nuestra simulación de dinámica molecular a la temperatura de 37°C, podemos observar que considerando todos los residuos excepto las glicinas y prolinas, tenemos que ciento dos (102) residuos se hallan en las regiones favorecidas lo que hace un 79.1% de los residuos considerados, mientras veintiséis residuos (26) se hallan en las regiones adicionalmente permitidas lo que hace el 20.2% de los residuos considerados. A todo esto, se han retirado dos (2) residuos de prolinas y glicinas terminales, y cabe considerar que un total de 13 glicinas han sido excluidas, las cuales se hallan señaladas como triángulos en la gráfica, y un total de tres (3) prolinas que también fueron retiradas.

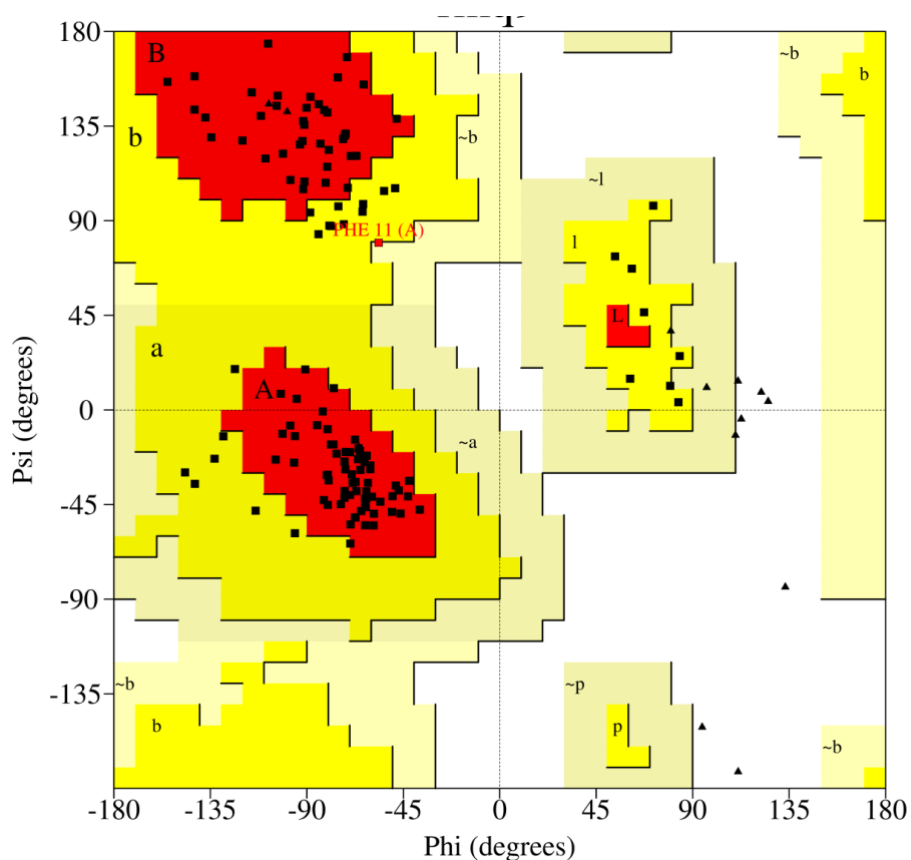


Figura 33. Análisis de Ramachandran temperatura 37°C.

La figura 34 corresponde a la estructura de la proteína 1DPX después de haber realizado una dinámica molecular a temperatura de 37°C con una trayectoria de 100ns.

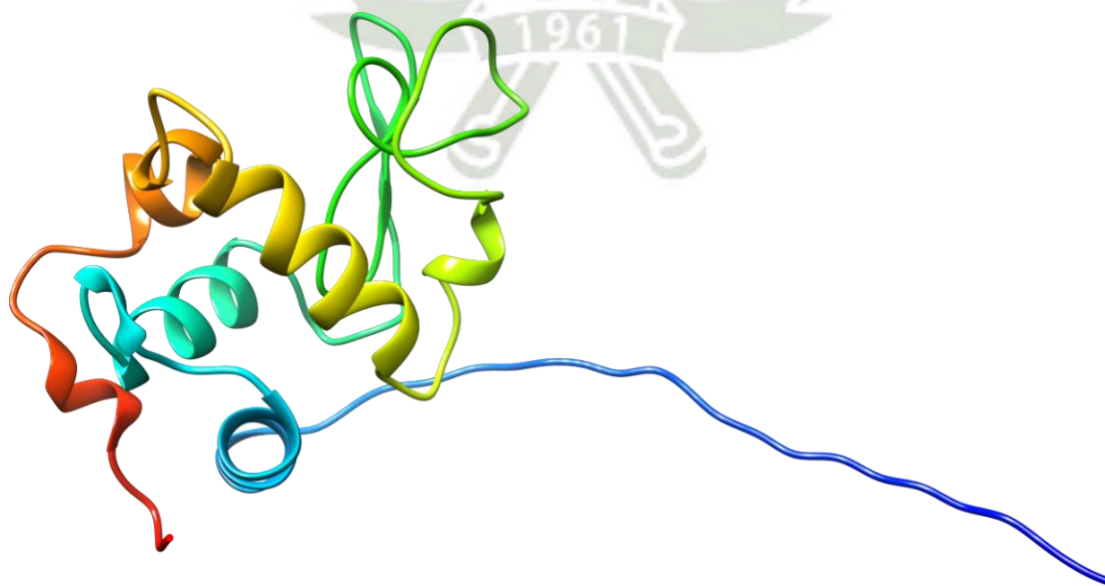


Figura 34. Estructura a temperatura 37°C.

El análisis de la estructura secundaria de la proteína 1DPX de 147 residuos aminoacídicos. Indica que, de los 147 residuos totales, 8 (el 5.4%) forman una estructura de cadena, 38 (el 25.9%) forman estructuras alfa hélice, 16 (el 10.9%) forman estructuras 3-10 hélice y los 85 residuos restantes (el 57.8% del total) adoptan otras estructuras secundarias no especificadas. En resumen, la proteína analizada tiene predominantemente estructuras secundarias no helicoidales, con solo una pequeña proporción de residuos formando hélices alfa o 3-10. La mayoría de los residuos adoptan conformaciones extendidas o bucles (Figura 35).

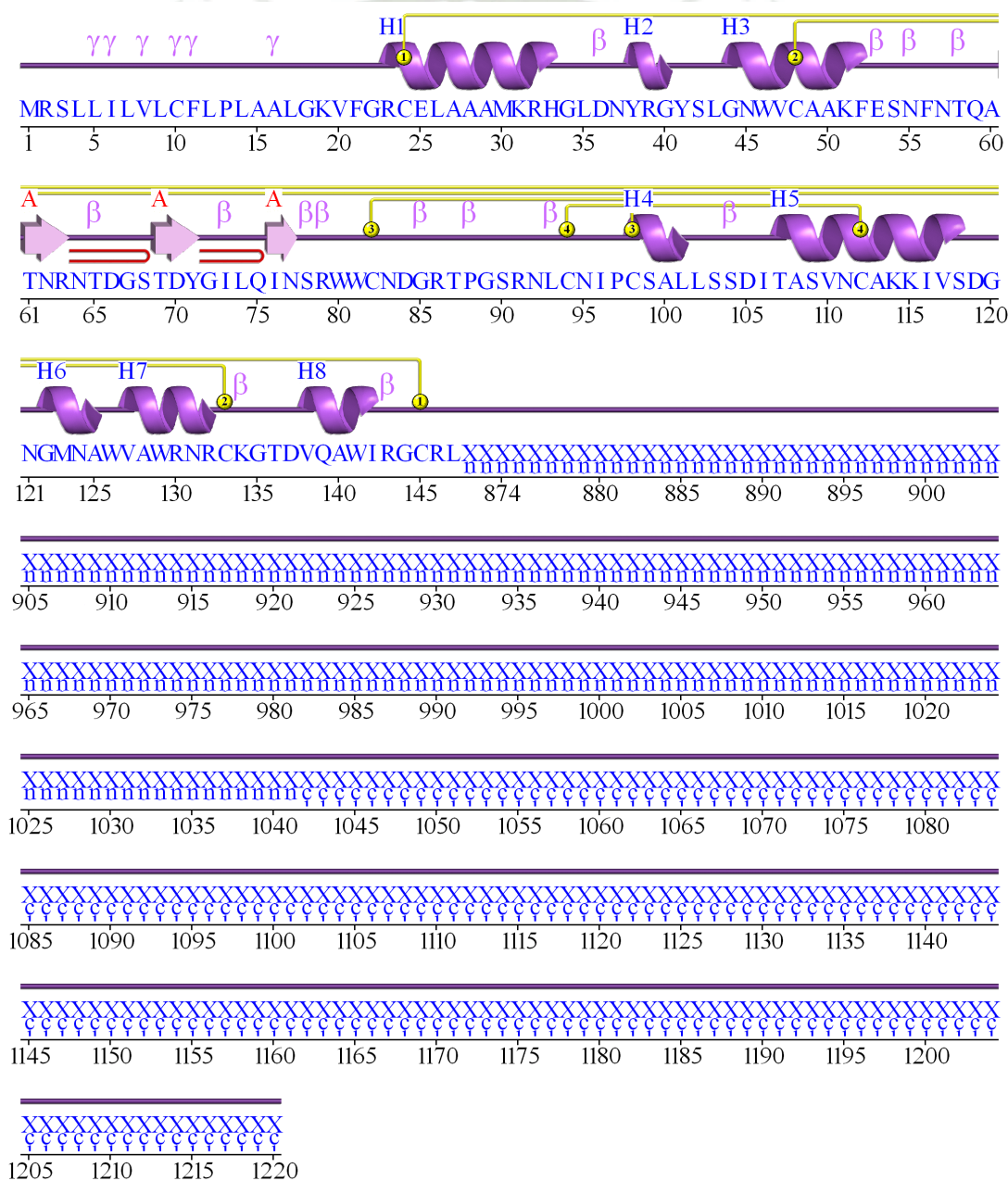


Figura 35. Estructura secundaria temperatura 37°C.

## Figuras resumen

### RMSD

Cuando se realizó el análisis de las raíces cuadradas de las desviaciones estándar de las distancias, en conjunto, podemos observar claramente que a 5°C y 15°C las estructuras llegan a la región de equilibrio a los 25ns y 30ns respectivamente, mientras cuando vemos que a 30°C la estructura es altamente fluctuante, mientras que a los 33°C la estructura llega al equilibrio a los 32ns, continuando hasta el final de la simulación molecular, mientras que a los 37°C a pesar que a los 26ns aparentemente llegaba a la región de equilibrio, a los 62ns inicia una fuerte fluctuación que se estabiliza a los 76ns, a partir del cual la estructura llega a su región de equilibrio, como se muestra en la figura 36.

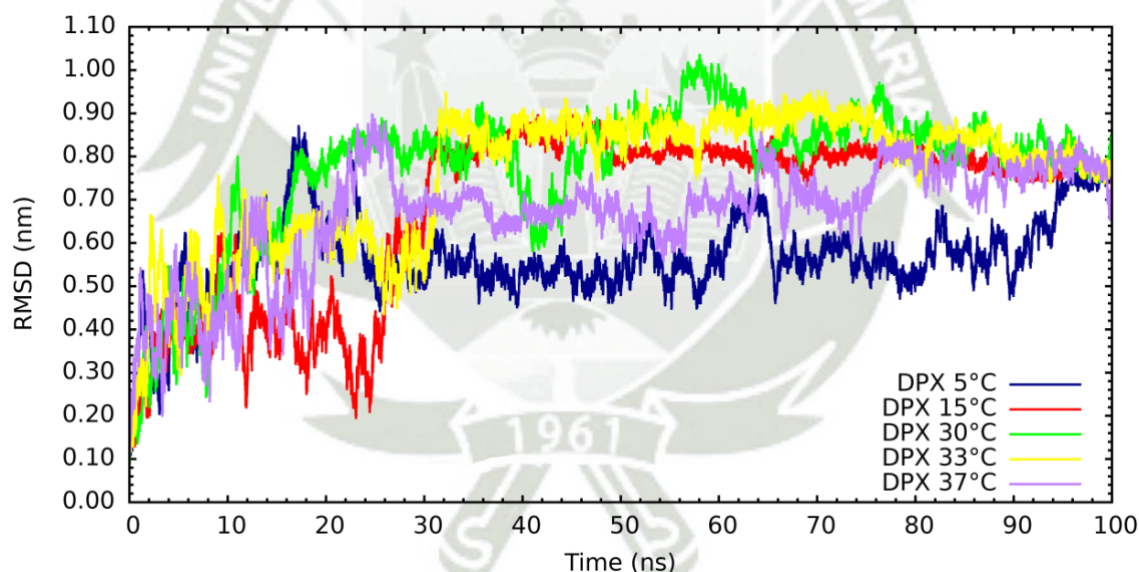


Figura 36. Comparación de temperaturas del Análisis de Raíz de Desviación Media Cuadrática.

### RMSF

Cuando se realizó el análisis el raíz cuadrada media de las fluctuaciones cuadráticas, en conjunto, podemos observar claramente que a 5°C las estructuras llegan tienen menos cambios conformacionales, mientras que a los 15°C sufre un cambio notorio, seguido de la proteína a los 37°C, 33°C y 30°C esto desde los 80 hasta los 100 residuos mostrando la atenuación de las

fluctuaciones RMSF en la región C-terminal que concuerda con la conformación plegada nativa, se observa que a partir de los 100 residuos la estructura llega a su región de equilibrio (Figura 37).

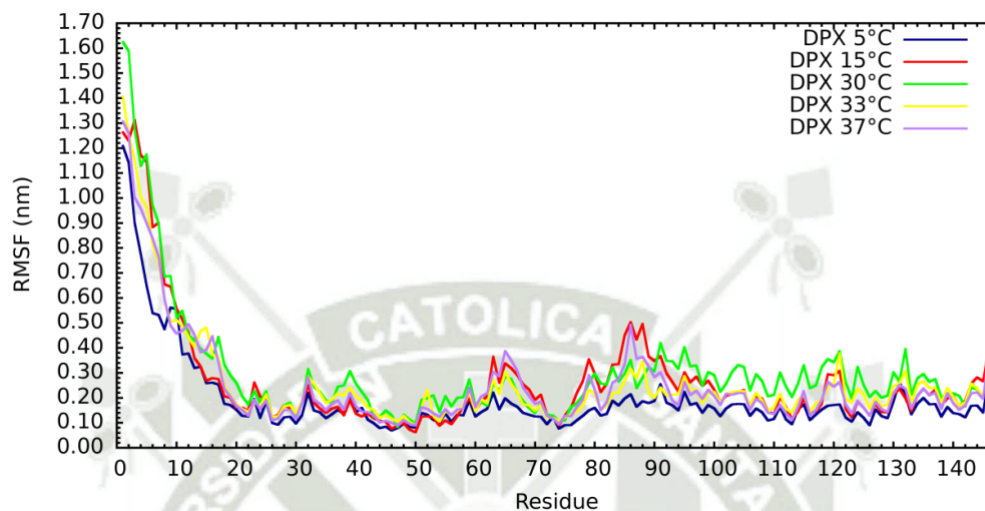


Figura 37. Comparación de temperaturas del Análisis de Raíz de la Desviación Media Cuadrática de las Fluctuaciones.

### Radio de giro

Cuando se realizó el análisis del radio de giro de la proteína (Figura 38) muestra una comparación de las dinámicas de compactación donde se puede observar notoriamente que a los 10ns la temperatura 30°C tiene una descompactación y a los 20ns la temperatura 15°C muestra lo mismo. En la temperatura 5°C se observa una compactación a lo largo de toda la simulación, mientras que, a 33°C y 37°C, en los 15ns y 25ns respectivamente, se observa poco movimiento. A partir de los 28ns se inicia un proceso continuo de compactación, probablemente impulsado por un incremento en el número de puentes de hidrógeno. Esta tendencia se mantiene constante en todas las temperaturas hasta el final de cada simulación.

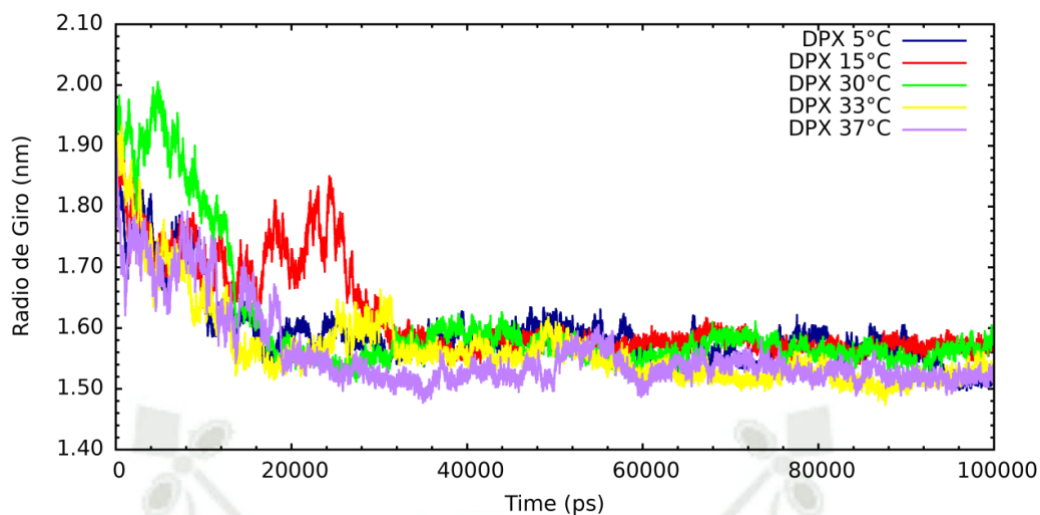


Figura 38. Comparación de temperaturas del Análisis de Radio de Giro.

### Puentes de Hidrógeno

El análisis de los puentes de hidrógeno (Figura 39) muestra en la temperatura de 15°C entre 50-60ns se observa una región de transición, con fluctuaciones notorias, una ganancia y pérdida fluctuante de puentes de hidrógeno, reflejando una conformación inestable. Las temperaturas entre 5°C, 30°C, 33°C y 37°C a partir de los 80ns se obtienen una meseta donde el número de puentes de hidrógeno permanece esencialmente constante hasta el final de las simulaciones.

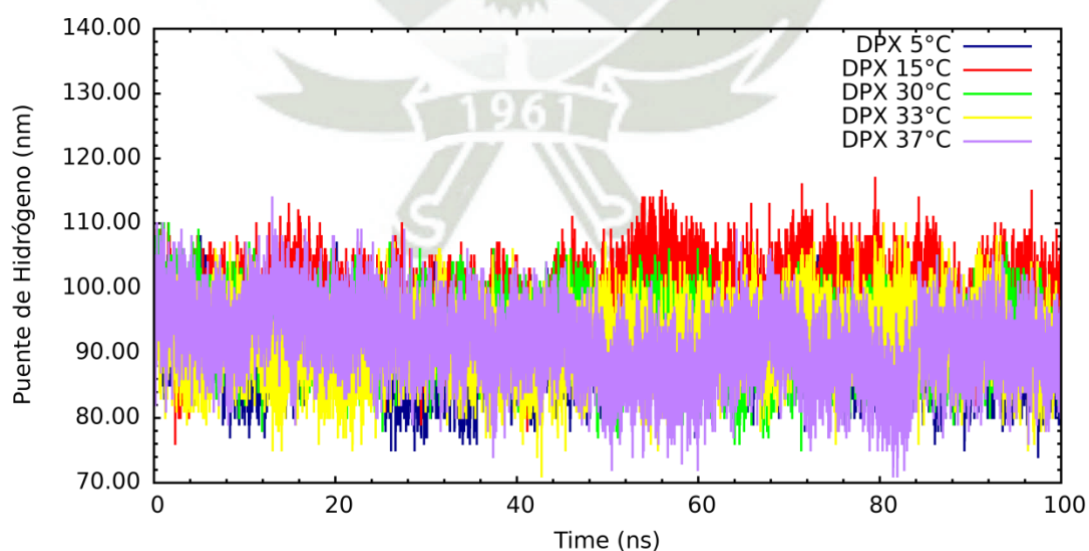


Figura 39. Comparación de temperaturas Análisis de Puente de Hidrógeno.

## CONCLUSIONES:

### Primera:

La lisozima de clara de huevo 1DPX es estable a diferentes temperaturas 5, 15, 30, 33 y 37 °C según los valores obtenidos raíz cuadrada media de las fluctuaciones cuadráticas, Radio de giro y Puentes de Hidrógeno, valores obtenidos después de una simulación de dinámica molecular en el programa Gromacs.

### Segunda:

Se concluye que a pesar de las fluctuaciones la proteína se mantiene estable a partir del Análisis de Raíz de Desviación Media Cuadrática. En las temperaturas 5°C y 15°C las estructuras llegan a la región de equilibrio a los 25ns y 30ns respectivamente, mientras a 30°C la estructura es altamente fluctuante hasta los 65ns que se estabiliza, a los 33°C la estructura llega al equilibrio a los 32ns, mientras que a los 37°C a pesar de que a los 26ns aparentemente llegaba a la región de equilibrio, a los 62ns inicia una fuerte fluctuación que se estabiliza a los 76ns.

### Tercero:

Según el análisis del radio de giro de la proteína esta se encuentra estable pero presenta a partir de los 28ns un proceso continuo de compactación, probablemente impulsado por un incremento en el número de puentes de hidrógeno. Esta tendencia se mantiene constante en todas las temperaturas hasta el final de cada simulación.

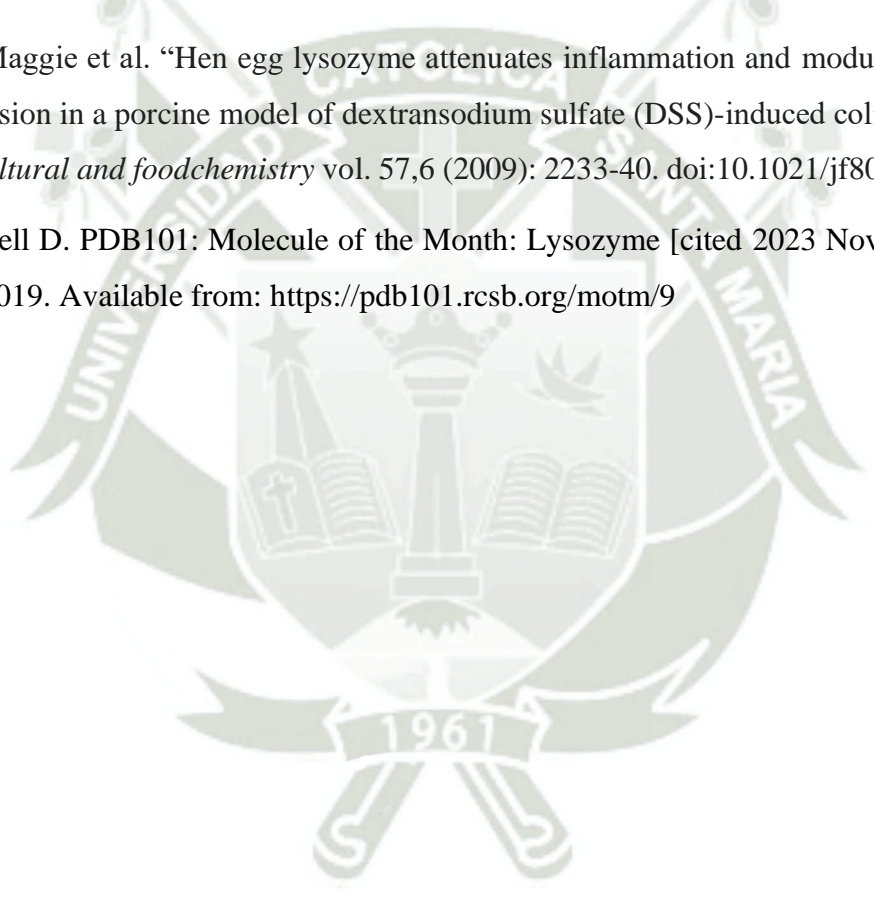
## RECOMENDACIONES:

Se sugiere realizar un Análisis a 60 grados centígrados, temperatura a la cual se desnaturalizan gran parte de las proteínas, para determinar la estabilidad de la lisozima de clara de huevo a la misma. Además se recomienda ampliar el tema con estudios experimentales en laboratorio.

**REFERENCIAS**

1. Oliver WT, Wells JE. Lysozyme as an alternative to growth promoting antibiotics in swine production. *Journal of Animal Science and Biotechnology* [Internet]. 2015 Aug 13 [cited 2024 May 10];6(1). Available from: <https://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-015-0034-z>
2. Nattress F. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. *International journal of food microbiology*. 2001 Oct 22;70(1-2):111–9.
3. Carrillo W. Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenicidad. *Actual nutr* [Internet]. 2013 [cited 2024 Mar 11];2(3):314–26. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-771547?lang=es>
4. Maroufi, et al . Structural studies of hen egg-white lysozyme dimer: Comparison with monomer [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2023 Nov 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18439436/>
5. Bhattacharya et al. Structural differences between native hen egg white lysozyme and its fibrils under different environmental conditions [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2023 Nov 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23786978/>
6. A;Wojciechowski P. Characteristics of hydration water around hen egg lysozyme as the protein model in aqueous solution. FTIR spectroscopy and molecular dynamics simulation [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2023 Nov 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23093378/>

7. AJ LS. Quantum Mechanics/molecular mechanics simulations show saccharide distortion is required for reaction in hen egg-white lysozyme [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [cited 2023 Nov 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30347479/>
8. Sterpone F, Ceccarelli M, Marchi M. Dynamics of hydration in hen eggwhite lysozyme. *J Mol Biol.* 2001;311(2):409-419. doi:10.1006/jmbi.2001.4860
9. Vocadlo, D J et al. “Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate.” *Nature* vol. 412,6849 (2001): 835-8. doi:10.1038/35090602
10. Lee, Maggie et al. “Hen egg lysozyme attenuates inflammation and modulates local gene expression in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis.” *Journal of agricultural and foodchemistry* vol. 57,6 (2009): 2233-40. doi:10.1021/jf803133b
11. Goodsell D. PDB101: Molecule of the Month: Lysozyme [cited 2023 Nov 17]. RCSB: PDB-101. 2019. Available from: <https://pdb101.rcsb.org/motm/9>



## ANEXOS:

### Anexo 1:

```

title = Lysozyme MD
;| Run parameters
integrator = md ; leap-frog integrator
nsteps = 50000000 ; 2 * 500000 = 1000 ps (1 ns)
dt = 0.002 ; 2 fs
; Output control
nstxout = 0 ; suppress bulky .trr file by specifying
nstvout = 0 ; 0 for output frequency of nstxout,
nstfout = 0 ; nstfout, and nstfout
nstenergy = 5000 ; save energies every 10.0 ps
nstlog = 5000 ; update log file every 10.0 ps
nstxout-compressed = 5000 ; save compressed coordinates every 10.0 ps
compressed-x-grps = System ; save the whole system
; Bond parameters
continuation = yes ; Restarting after NPT
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints = h-bonds ; bonds involving H are constrained
lincs_iter = 1 ; accuracy of LINCS
lincs_order = 4 ; also related to accuracy
; Neighborsearching
cutoff-scheme = Verlet ; Buffered neighbor searching
ns_type = grid ; search neighboring grid cells
nstlist = 10 ; 20 fs, largely irrelevant with Verlet scheme
rcoulomb = 1.0 ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw = 1.0 ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype = PME ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order = 4 ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16 ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling is on
tcoupl = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
tc-grps = Protein SOL Ion ; two coupling groups - more accurate
tau_t = 0.1 0.1 0.1 ; time constant, in ps
ref_t = 278.15 278.15 278.15 ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling is on
pcoupl = Parrinello-Rahman ; Pressure coupling on in NPT
pcoupltype = isotropic ; uniform scaling of box vectors
tau_p = 2.0 ; time constant, in ps
ref_p = 1.0 ; reference pressure, in bar
compressibility = 4.5e-5 ; isothermal compressibility of water, bar^-1
; Periodic boundary conditions
pbc = xyz ; 3-D PBC
; Dispersion correction
DispCorr = EnerPres ; account for cut-off vdW scheme
; Velocity generation
gen_vel = no ; Velocity generation is off

```



## Anexo 2:

```

title = OPLS Lysozyme NPT equilibration
define = -DPOSRES ; position restrain the protein
; Run parameters
integrator = md ; leap-frog integrator
nsteps = 50000 ; 2 * 50000 = 100 ps
dt = 0.002 ; 2 fs
; Output control
nstxout = 500 ; save coordinates every 1.0 ps
nstvout = 500 ; save velocities every 1.0 ps
nstenergy = 500 ; save energies every 1.0 ps
nstlog = 500 ; update log file every 1.0 ps
; Bond parameters
continuation = yes ; Restarting after NVT
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints = h-bonds ; bonds involving H are constrained
lincs_iter = 1 ; accuracy of LINCS
lincs_order = 4 ; also related to accuracy
; Nonbonded settings
cutoff-scheme = Verlet ; Buffered neighbor searching
ns_type = grid ; search neighboring grid cells
nstlist = 10 ; 20 fs, largely irrelevant with Verlet scheme
rcoulomb = 1.0 ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw = 1.0 ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
DispCorr = EnerPres ; account for cut-off vdW scheme
; Electrostatics
coulombtype = PME ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order = 4 ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16 ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling is on
tcoupl = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
tc-grps = Protein SOL Ion ; two coupling groups - more accurate
tau_t = 0.1 0.1 0.1 ; time constant, in ps
ref_t = 278.15 278.15 278.15 ; reference temperature, one for
each group, in K
; Pressure coupling is on
pcoupl = Parrinello-Rahman ; Pressure coupling on in NPT
pcoupltype = isotropic ; uniform scaling of box vectors
tau_p = 2.0 ; time constant, in ps
ref_p = 1.0 ; reference pressure, in bar
compressibility = 4.5e-5 ; isothermal compressibility of water,
bar^-1
refcoord_scaling = com
; Periodic boundary conditions
pbc = xyz ; 3-D PBC
; Velocity generation
gen_vel = no ; Velocity generation is off

```



### Anexo 3:

```

|title          = OPLS Lysozyme NVT equilibration
define         = -DPOSRES ; position restrain the protein
; Run parameters
integrator     = md      ; leap-frog integrator
nsteps        = 50000   ; 2 * 50000 = 100 ps
dt            = 0.002   ; 2 fs
; Output control
nstxout       = 500     ; save coordinates every 1.0 ps
nstvout       = 500     ; save velocities every 1.0 ps
nstenergy     = 500     ; save energies every 1.0 ps
nstlog        = 500     ; update log file every 1.0 ps
; Bond parameters
continuation   = no      ; first dynamics run
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints    = h-bonds ; bonds involving H are constrained
lincs_iter    = 1       ; accuracy of LINCS
lincs_order   = 4       ; also related to accuracy
; Nonbonded settings
cutoff-scheme = Verlet   ; Buffered neighbor searching
ns_type       = grid     ; search neighboring grid cells
nstlist       = 10      ; 20 fs, largely irrelevant with Verlet
rcoulomb      = 1.0     ; short-range electrostatic cutoff (in nm)
rvdw         = 1.0     ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
DispCorr      = EnerPres ; account for cut-off vdW scheme
; Electrostatics
coulombtype   = PME      ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
pme_order     = 4        ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16   ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling is on
tcoupl        = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
tc-grps       = Protein SOL Ion ; two coupling groups - more accurate
tau_t         = 0.1 0.1 0.1 ; time constant, in ps
ref_t         = 278.15 278.15 278.15 ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling is off
pcoupl        = no      ; no pressure coupling in NVT
; Periodic boundary conditions
pbc           = xyz     ; 3-D PBC
; Velocity generation
gen_vel       = yes     ; assign velocities from Maxwell distribution
gen_temp      = 278     ; temperature for Maxwell distribution
gen_seed      = -1     ; generate a random seed
    
```

