

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



DISEÑO DE UN PROTOTIPO DE NANOTRANSPORTADOR DIRIGIDO HACIA LA PROTEÍNA EGFABP1 DEL PARÁSITO ECHINOCOCCUS GRANULOSUS UTILIZANDO ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOINFORMÁTICA.

Tesis presentada por el Bachiller:

Zevallos Delgado, Christian

para optar el Título Profesional de:

Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Dr. Gómez Valdez, Badhin

**Arequipa – Perú
2018**

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20170000013193
N° Trámite en Fac. 330-2017
Fecha Recep. Fac. 21-03-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: ZEVALLOS DELGADO, Christian

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"DISEÑO DEL PROTOTIPO DE UN NANOTRANSPORTADOR EN BASE A ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS ORIENTADO A LA PROTEINA EgFABPI DEL Echinococcus granulosus EN BUSQUEDA DE UNA TERAPIA ALTERNATIVA A LA ENFERMEDAD HIDATIDICA UTILIZANDO HERRAMIENTAS DE BIOINFORMATICA"

DICTAMINADORES: 1) Dr. Jaime Cárdenas García 2) Mgter. Jaime Barreda del Carpio

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente
FIRMAS: (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA 7/4/17

ASESOR: Dr. Badhin Gómez Valdez

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMA FECHA 05-10-18

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dr. Jaime Cárdenas García 3) Mgter. Jaime Barreda del Carpio
2) Blgo. Carlos Eitel Iván Paz Aliaga

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, habiendo revisado el presente Borrador de Tesis intitulado: "DISEÑO DE UN PROTOTIPO DE NANOTRANSPORTADOR DIRIGIDO HACIA LA PROTEINA EgFABPI DEL PARASITO Echinococcus granulosus UTILIZANDO ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS MEDIANTE TECNICAS DE BIOINFORMATICA" y habiendo realizado las correcciones indicadas se considera APTO para que prosiga con el trámite en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

FIRMA (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA 13-11-18

JURADOS: PRESIDENTE DR. JAIME CÁRDENAS GARCÍA
VOCAL BLGO. CARLOS JUAN PAZ ALIAGA
SECRETARIO Mgter. JAIME BARREDA DEL CARIPIO

FECHA 19-11-2016 HORA 19:30 LOCAL C-402

FIRMA DEL DECANO FECHA 5 NOV 2016

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a Dios, que guía mi camino. A mi familia, a mis padres Javier y Gleny, a mis hermanos Sebastian y Gean Andre; y a mi mamá Luisa Jesus.



Agradecimientos

Agradecer a la Universidad Católica de Santa María, que por medio del Vicerrectorado de Investigación financió el proyecto del cual es parte esta tesis con Resolución N° 23783-R-2016. Mi eterna gratitud y agradecimiento a Dios, que guía mis pasos cada uno de mis días. A mi familia, a mis padres, hermanos y abuelos, con quienes compartí cada vivencia que forjó cada uno de mis triunfos y consoló en cada una de mis derrotas. A todos los integrantes del Centro de Investigación en Ingeniería Molecular, representado por el Dr. Badhin Gómez; quienes guiaron mi desarrollo como investigador. Mi más grande agradecimiento a Diego Valencia y Haruna Barazorda, quienes me encaminaron en el grandioso y sacrificado mundo de la investigación. A mis amigos, Diego Paz, Gretta y Luis Angel, por su verdadera amistad y apoyo incondicional.

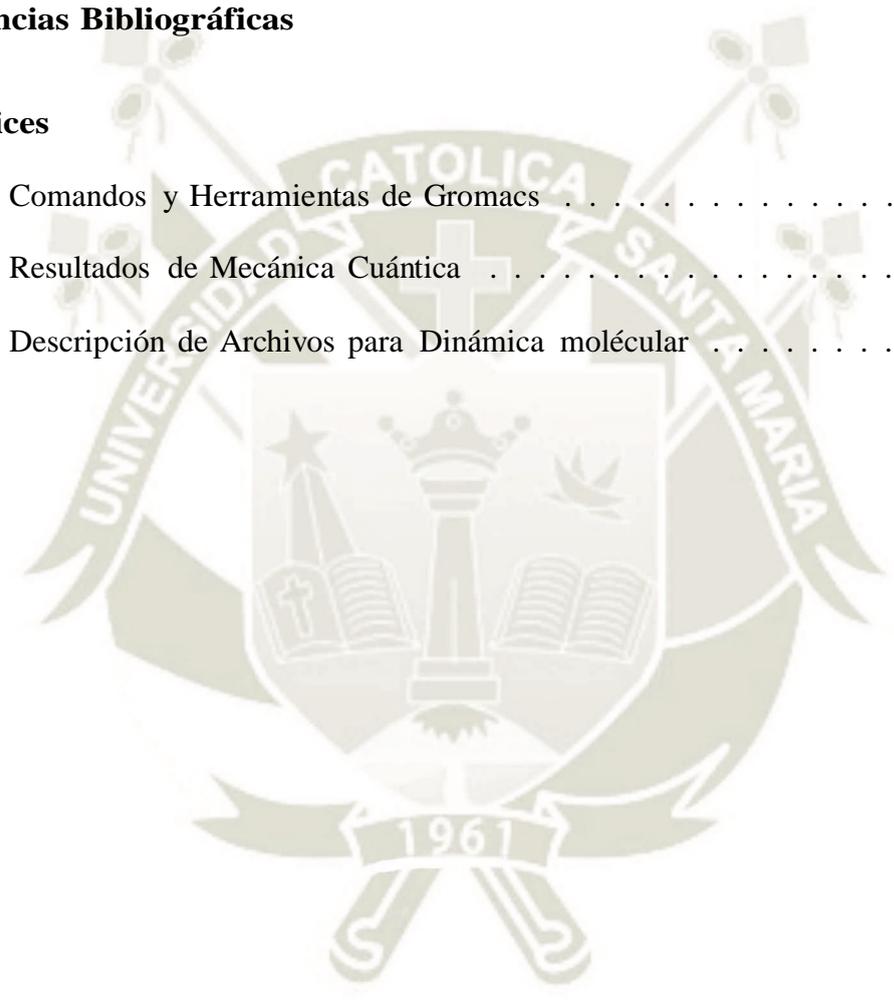
Contenido

Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Contenido	III
Índice de Figuras	VII
Índice de Tablas	XI
Glosario	XII
Resumen	XIV
Abstract	XV
Objetivos	
XVIII	Hipótesis
XIX	
1. Marco Teórico	1
1.1. Enfermedad Hidatídica	1
1.1.1. Morfología del <i>Echinococcus granulosus</i>	1
1.1.2. Ciclo de Vida del <i>Echinococcus granulosus</i>	3
1.1.3. Distribución geográfica de la hidatidosis	5

1.1.4.	Diagnóstico y tratamiento de la hidatidosis	7
1.1.5.	Prevención	9
1.2.	Proteínas de Unión de Ácidos Grasos (PUAG) de parásitos platelmintos	10
1.2.1.	PUAG en <i>Echinoccus granulosus</i>	11
1.3.	Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPI)	12
1.3.1.	Biosíntesis de Ácidos Grasos Polinsaturados	14
1.3.2.	Estructura del Ácido docosapentaenoico y el Ácido eicosapentaenoico	16
1.4.	Nanotransportadores	16
1.4.1.	Caracterización	17
1.4.2.	Tipos	18
1.4.3.	Usos	21
1.4.4.	Poliglicerol como nanotransportador	22
1.5.	Bioinformática	22
1.5.1.	Métodos Computacionales para el diseño de proteínas	24
1.5.2.	Modelamiento Molecular	24
1.5.3.	Mecánica Molecular	25
1.5.4.	Dinámica Molecular (DM)	27
1.5.5.	Herramientas de Validación de Estructuras Moleculares	27
1.5.6.	Termodinámica y Calculo de Energia Libre	28
1.5.7.	Mecánica Cuántica	29
1.5.8.	Acoplamiento Molecular - Docking	31
2.	Métodos y Detalles Computacionales	32
2.1.	Detalles Computacionales	32
2.1.1.	Hardware	32
2.1.2.	Software	32

2.2. Metodología	36
2.2.1. Obtención, Optimización y Análisis de la proteína EgFABP1	36
2.2.2. Obtención, optimización y análisis de los Ácidos Grasos Poliinsaturados	36
2.2.3. Diseño y construcción de nanotransportador	38
2.2.4. Acoplamiento Molecular	40
3. Resultados y Discusión	43
3.1. Obtención y Optimización de la Proteína EgFABP1	43
3.2. Análisis de cavidades de la Proteína EgFABP1	50
3.3. Optimización Cuántica de los Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPI) y Análisis de la Función de Fukui	54
3.4. Optimización Molecular de los Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPI)	55
3.5. Acoplamiento Molecular entre los Ácidos Grasos Poliinsaturados y la proteína EgFABP1	57
3.6. Potencial electrostático de la Interacción entre AGPI y la Proteína EgFABP1	60
3.7. Análisis de Dinámica Molecular Post Interacción entre los AGPI y la Proteína EgFABP1	62
3.8. Análisis de los valores de Energía Libre de Interacción entre los Ácidos Grasos Poliinsaturados y la Proteína EgFABP1	68
3.9. Construcción de Nanotransportador y Optimización Cuántica	69
3.10. Optimización Molecular de Nanotransportador	71
3.11. Análisis de la interacción entre Nanotransportador y la Proteína EgFABP1	75
3.12. Potencial electrostático de la Interacción de Nanotransportador y la Proteína EgFABP1	80
3.13. Análisis de la Dinámica Molecular Post-Interacción de Nanotransportador y la Proteína EgFABP1	81

3.14. Análisis de los valores de Energía Libre de Gibbs de la Interacción entre Nanotransportador y la Proteína EgFABP1	86
Conclusiones	87
Recomendaciones	89
Referencias Bibliográficas	90
Apéndices	107
.1. Comandos y Herramientas de Gromacs	108
.2. Resultados de Mecánica Cuántica	109
.3. Descripción de Archivos para Dinámica molecular	114



Índice de Figuras

1.1. Morfología del quiste hidatídico.	2
1.2. Ciclo de vida del parásito <i>Echinococcus granulosus</i>	4
1.3. Distribución geográfica mundial de la enfermedad hidatídica.	6
1.4. Distribución geográfica en el Perú de la enfermedad hidatídica.	7
1.5. Proteínas PUAG presentes en parásitos.	11
1.6. Estructura terciaria de la proteína EgABP1.	12
1.7. Clasificación de los AGPI	14
1.8. Ruta metabólica de síntesis de AGPI.	15
1.9. Clasificación de nanotransportadores.	18
1.10. Representación esquemática de mecánica molecular.	26
1.11. Ciclo termodinámico de la Energía libre de Gibbs	29
2.1. Moléculas de AGPI.	37
2.2. Diseño de nanotransportador de poliglicerol	39
2.3. Moléculas de fármacos Benzimidazoles.	39
2.4. Acoplamiento molecular en programa Autodock	41
2.5. Acoplamiento molecular en programa Hex	41
3.1. Estructura de la Proteína EgFABP1	44
3.2. RMSD de la proteína EgFABP1 a 200 ns en colectivo NVT.	45

3.3. RMSD de la proteína EgFABP1 a 50 ns en colectivo NPT.	46
3.4. Comparación de la estructura secundaria tras MD.	46
3.5. Radio de giro de la proteína EgFABP1 en colectivo NPT a 50 ns.	47
3.6. Diagrama de Ramachandran de la estructura de la proteína EgFABP1.	48
3.7. RMSF de la proteína EgFABP1 en colectivo NPT en 50 ns.	49
3.8. Cavidades de Superficie de la proteína EgFAB1	51
3.9. Comparación de superficies de EgFABP1 y EgFABP2	52
3.10. Estructura molecular optimizada de los AGPI.	54
3.11. Optimización molecular en medio acuoso.	55
3.12. RMSD de Optimización molecular de AGPI	56
3.13. Interacción de ALA y EgFABP1	57
3.14. Interacción de ARA y EgFABP1	58
3.15. Interacción de EPA y EgFABP1	58
3.16. Interacción de DHA y EgFABP1	59
3.17. Superficie de potencial electrostático de la proteína EgFABP1	60
3.18. Superficie de potencial electrostático en la proteína EgFABP1 tras acoplamiento molecular	61
3.19. RMSD tras Dinámica Molecular de AGPI y EgFABP1	62
3.20. RMSF de la interacción de la proteína EgFABP1 y los AGPI.	63
3.21. Análisis de interacción ALA-EgFABP1	64
3.22. Análisis de interacción ARA-EgFABP1	65
3.23. Análisis de interacción EPA-EgFABP1	66
3.24. Análisis de interacción DHA-EgFABP1	67
3.25. Diseño de Nanotransportador	69
3.26. Interacción de Nanotransportador y fármacos.	70
3.27. Radio de Giro de Nanotransportador	71

3.28. Optimización de Nanotransportador	72
3.29. Optimización de Nanotransportador-ABZ	73
3.30. Optimización de Nanotransportador-MBZ	74
3.31. Optimización de Nanotransportador-PRZ	75
3.32. Interacción entre el Nanotransportador y la proteína EgFABP1	77
3.33. Interacción entre el Nanotransportador-ABZ y la proteína EgFABP1	78
3.34. Interacción entre el Nanotransportador-MBZ y la proteína EgFABP1	79
3.35. Interacción entre el Nanotransportador-PRZ y la proteína EgFABP1	80
3.36. Superficie de potencial electrostático de la proteína EgFABP1 con Nano-transportador	81
3.37. RMSD de dinámica molecular EgFABP1-NAN	82
3.38. RMSF de dinámica molecular EgFABP1-NAN	83
3.39. Interacción de la proteína EgFABP1 con Nanotransportador.	84
3.40. Interacción de la proteína EgFABP1 con Nanotransportador-ABZ.	84
3.41. Interacción de la proteína EgFABP1 con Nanotransportador-MBZ.	85
3.42. Interacción de la proteína EgFABP1 con Nanotransportador-PRZ.	85
43. Tabla de Función de Fukui ALA	110
44. Tabla de Función de Fukui ARA	111
45. Tabla de Función de Fukui EPA	112
46. Tabla de Función de Fukui DHA	113
47. Archivo .mdp para minimización	114
48. Archivo .mdp para colectivo NVT	115
49. Archivo .mdp para colectivo NPT	116
50. Archivo .mdp para Dinámica de Langevin	117
51. Archivo aminoacids.rtp - ALA	119
52. Archivo aminoacids.rtp - ARA	120

53.	Archivo aminoacids.rtp - EPA	121
54.	Archivo aminoacids.rtp - DHA	122
55.	Archivo aminoacids.rtp - NAN	123
56.	Archivo aminoacids.rtp - ABZ	124
57.	Archivo aminoacids.rtp - MBZ	125
58.	Archivo aminoacids.rtp - PRZ	126
59.	Archivo ffbonded.itp de topología	127



Índice de Tablas

3.1. Valores del análisis de cavidades en la proteína EgFABP1	50
3.2. Función de Fukui de los átomos de los AGPI.	53
3.3. Valores Obtenidos del Acoplamiento Molecular entre AGPI y la proteína EgFABP1	57
3.4. Valores de ΔG obtenidos en la interacción de la proteína EgFABP1 y los AGPI	68
3.5. Valores de acoplamiento molecular entre el Nanotransportador y la proteína EgFABP1	76
3.6. Valores de ΔG obtenidos en la interacción de la proteína EgFABP1 y los Nanotransportador.	86

Glosario

1. **ABZ:** Albendazol.
2. **AGPI:** Ácido Graso Poliinsaturado.
3. **ALA:** Ácido α -linolénico.
4. **AMBER:** Campo de Fuerza de Construcción de modelos asistido con refinamiento energético.
5. **ARA:** Ácido araquidónico.
6. **BAR:** Radio de Aceptación de Bennett.
7. **B3LYP:** Funcional de correlación de intercambio B3 y la función de correlación de Lee Yang y Parr.
8. **CHARMM:** Campo de Fuerza de Química Mecánica Macromolecular en Harvard.
9. **DHA:** Ácido docosahexaenoico.
10. **DM:** Dinámica Molecular.
11. **DZVP:** Base doble zeta con polarización.
12. **EG95:** Vacuna Providean Hidatil EG95.
13. **EgFABP1:** Proteína de Unión de Ácidos Grasos de *Echinococcus granulosus*1.
14. **EgFABP2:** Proteína de Unión de Ácidos Grasos de *Echinococcus granulosus*2.
15. **ELISA:** Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.
16. **EPA:** Ácido eicosapentaenoico.

17. **ERP:** Efecto de Permeabilidad y Retención.
18. **ΔG :** Energía libre de Gibbs.
19. **GROMOS:** Campo de Fuerza de Simulación Molecular de Groningen.
20. **HFABP:** Proteína de Unión de Ácidos Grasos Cardíaca.
21. **HOMO:** Orbital Molecular Ocupado de Mayor Energía.
22. **LUMO:** Orbital Molecular de Menor Energía Desocupado.
23. **MBZ:** Mebendazol.
24. **NCBI:** Centro Nacional para la Información Biotecnológica.
25. **NTD:** Enfermedades Tropicales Desatendidas.
26. **NPT:** Colectivo isotérmico isobárico con Número de Átomos y Presión Constante.
27. **NVT:** Colectivo canónico con Número de Átomos y Volumen Constante.
28. **OMS:** Organización Mundial de La Salud.
29. **OPLS-AA:** Campo de Fuerza de Potenciales Optimizados para Simulaciones de Líquidos-Para todos los átomos.
30. **PDB:** Banco de Datos de Proteínas.
31. **PKS:** Polikétido Sintetasa.
32. **PRZ:** Praziquantel.
33. **PUAG:** Proteína de Unión de Ácidos Grasos.
34. **RMSD:** Desviación cuadrática media.
35. **RMSF:** Fluctuación Cuadrática Media.
36. **SASA:** Área de Superficie Accesible al Solvente.
37. **SENASA:** Servicio Nacional de Sanidad Agraria.
38. **SPC:** Modelo de Agua de Carga de Punto Simple.
39. **RG:** Radio de Giro.

Resumen

La enfermedad hidatídica se encuentra ampliamente diseminada por diversos continentes, y es clasificada como una Enfermedad Tropical Desatendida por la Organización Mundial de la Salud. Es causada principalmente por el parásito *Echinococcus granulosus* produciendo grave daño en la salud. Esta investigación se basó en el análisis de la interacción entre la Proteína de Unión de Ácidos Grasos (PUAG) del parásito *Echinococcus granulosus* (EgFABP1) y los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI): ácido α -linolénico (ALA), ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) con el objetivo de diseñar un nanotransportador. La estructura molecular de los AGPI fue optimizada geoméricamente utilizando herramientas de mecánica cuántica y analizada con la función Fukui, utilizando la funcional B3LYP y la base DZVP. Se realizó una minimización de energía y una dinámica molecular de la proteína utilizando el colectivo canónico (NVT), el colectivo isotérmico-isobárico (NPT), y el campo de fuerza OPLS-AA en el software GROMACS. Así mismo, las moléculas de ácidos grasos fueron optimizadas en mecánica molecular utilizando un colectivo NVT y el campo de fuerza OPLS-AA. La construcción del nanotransportador se realizó en forma de dendrímero, utilizando poliglicerol como núcleo y dos moléculas de DHA en segunda generación. La geometría del nanotransportador se optimizó utilizando el método semiempírico PM6. Se adoso moléculas de fármacos al nanotransportador las cuales fueron: albendazol (ABZ), mebendazol (MBZ) y praziquantel (PRZ). Los resultados de acoplamiento y posterior interacción en dinámica molecular demostraron que la mejor interacción fue con el DHA. El análisis del acoplamiento e interacción en dinámica molecular demostraron que la proteína EgFABP1 posee una alta atracción por el nanotransportador, siendo la interacción más estable cuando se encuentra cargado con PRZ.

Palabras clave: *Echinococcus granulosus*, Ácidos Grasos Poliinsaturados, Nanotransportador, Dinámica molecular, Mecánica Cuántica.

Abstract

The hydatid disease is widely disseminated in several continents, and is part of the group of Neglected Tropical Diseases by the World Health Organization. Hydatid disease is caused mainly by the parasite *Echinococcus granulosus* producing serious damage to health due to the formation of cysts in humans. This investigation was based on the analysis of the interaction between the Fatty Acid Binding Protein (FABP) of the parasite *Echinococcus granulosus* (EgFABP1) and the polyunsaturated fatty acids (PUFA): α -linoleic acid (ALA), arachidonic acid (ARA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) with the aim of designing a nanocarrier structure with high interaction capacity. The molecular structure of the polyunsaturated fatty acids was geometrically optimized using quantum mechanics techniques and analyzed with the Fukui function, using the functional B3LYP and the DZVP base. An energy minimization and a molecular dynamics of the protein using the canonical collective (NVT), the isothermal-isobaric collective (NPT), and the OPLS-AA force field in the GROMACS software. Likewise, the fatty acid molecules were optimized in molecular mechanics using a collective NVT and the OPLS-AA force field. The construction of the nanocarrier was carried out in the form of a dendrimer, using polyglycerol as the nucleus and two molecules of DHA in the second generation. The geometry of the nanocarrier was optimized using the semi-empirical PM6 method. Drug molecules (albendazole (ABZ), mebendazole (MBZ) and praziquantel (PRZ)) were attached to the nanocarrier. The results of coupling and subsequent interaction in molecular dynamics showed that the best interaction was with DHA. The analysis of coupling and interaction in molecular dynamics showed that the EgFABP1 protein has a high attraction for the nanocarrier, and when it is loaded with PRZ, the interaction is more stable than with the other drugs.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, Polyunsaturated Fatty Acids, Nanocarrier, Molecular dynamics, Quantum mechanics.

Introducción

La enfermedad hidatídica o equinococosis es una enfermedad zoonótica principalmente causada por el parásito *Echinococcus granulosus*; y se distribuye geográficamente en diversos continentes¹. En nuestro país representa una enfermedad ampliamente diseminada sobre todo en la sierra central y sur². Esta enfermedad parasitaria suele ser asintomática en las primeras etapas posterior al contagio y detectable posteriormente al notar la presencia de quistes hidatídicos principalmente en los pulmones o el hígado^{3,4}.

Las Proteínas de Unión de Ácidos Grasos (PUAG) de parásitos vienen siendo blancos terapéuticos atractivos para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades como la equinococosis⁵. El rol que desempeñan estas proteínas está inmerso en el crecimiento, proliferación y sobrevivencia del parásito dentro del hospedero; siendo una de sus funciones más importantes la de obtener ácidos grasos del hospedero para beneficio del parásito⁶. En el parásito *Echinococcus granulosus* una de las proteínas más estudiadas es la Proteína de Unión de Ácidos Grasos 1 (EgFABP1)⁷. El rol de la EgFABP1 en la interacción parásito-hospedero es la de conducir a los ácidos grasos del hospedero hacia el parásito, debido a que el mismo no es capaz de sintetizar las moléculas de ácidos grasos de forma *de novo*. *Echinococcus granulosus* se apropia de los ácidos grasos del hospedero, con los que es capaz de realizar su propio metabolismo y utilizarlos para construir sus propias estructuras celulares, o como precursores de otras moléculas⁸.

Actualmente se implementan nuevas alternativas de tratamiento y diagnóstico de enfermedades parasitarias utilizando las propiedades de biomateriales a nanoescala, aplicación llamada nanomedicina⁹. Con el tiempo se ha venido desarrollando nuevos tipos de nanoestructuras, capaces de aumentar la especificidad de los fármacos, incrementando su eficiencia y acción¹⁰. De los diversos tipos de nanotransportadores, uno de los más eficientes es el de tipo dendrímico, que son polímeros en forma ramificada¹¹. Una alternativa

para la composición de una nanoestructura se basa en el uso de moléculas no inmunogénicas; como el uso de ácidos grasos poliinsaturados en el desarrollo de nanotransportadores contra la enfermedad hidatídica ¹², ya que son un conjunto de moléculas orgánicas muy importantes para la salud de los seres humanos, y que tienen una gran afinidad con la proteína EgFABP1 ⁷.

La bioinformática es un extenso campo multidisciplinario que aporta información relevante al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico, pues proporciona información para el diseño eficiente de biomoléculas con capacidades específicas, como transportar fármacos. Para el diseño de estas nuevas estructuras, la bioinformática estructural estudia las interacciones moleculares determinando la estabilidad y espontaneidad de la formación de complejos, características significativas para el desarrollo de futuros procedimientos terapéuticos ^{13,14}. Es así que los métodos bioinformáticos permiten evaluar el uso de ácidos grasos poliinsaturados para diseñar un prototipo de nanotransportador contra el parásito *Echinococcus granulosus* utilizando a la proteína EgFABP1 como objetivo de interacción.

Objetivos

Objetivo General

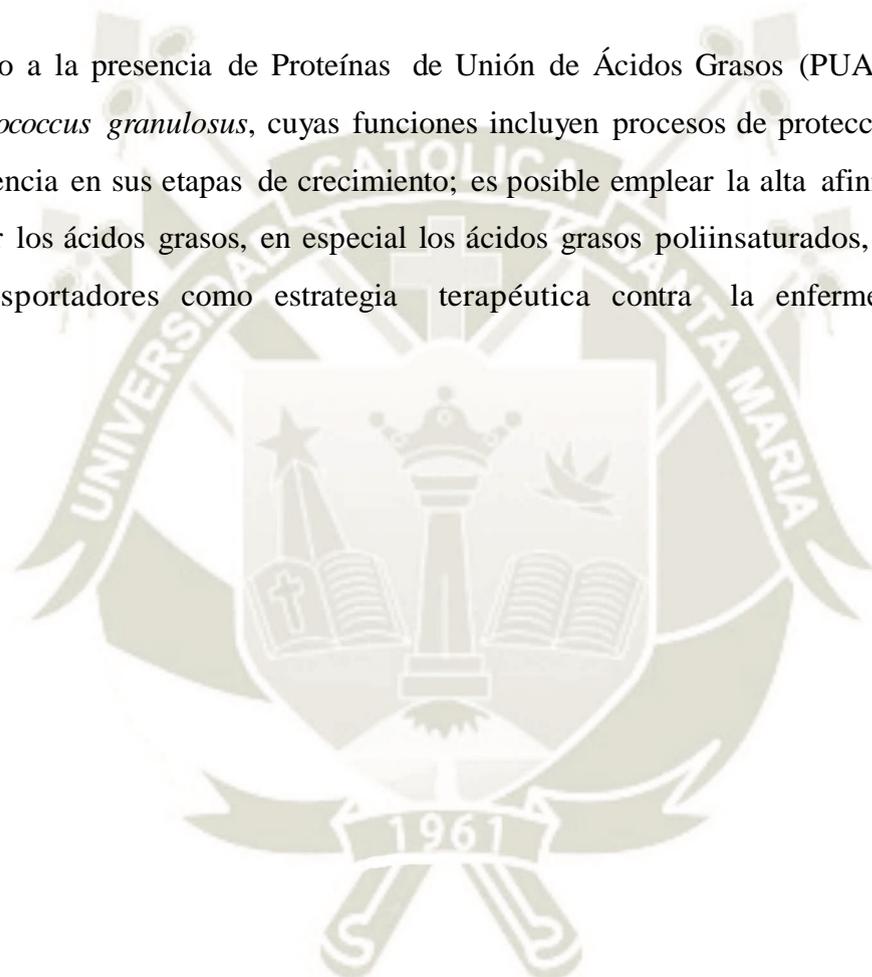
Diseñar un prototipo de nanotransportador dirigido hacia la proteína EgFABP1 del parásito *Echinococcus granulosus* utilizando Ácidos Grasos Poliinsaturados mediante técnicas de bioinformática.

Objetivos Especificos

1. Analizar la estabilidad molecular y la capacidad estructural de interacción de la proteína EgFABP1 de *Echinococcus granulosus* mediante Mecánica Molecular.
2. Analizar la estructura molecular y la reactividad local de los Ácidos Grasos Poliinsaturados a través de métodos de Mecánica Cuántica y Mecánica Molecular.
3. Diseñar y construir el prototipo de nanotransportador utilizando la estructura molecular de los Ácidos Grasos Poliinsaturados mediante Mecánica Cuántica y Mecánica Molecular.
4. Estudiar la formación de complejos entre la proteína EgFABP1 con las moléculas de Ácidos Grasos Poliinsaturados y el nanotransportador mediante el Acoplamiento Molecular y la Dinámica Molecular.

Hipótesis

Debido a la presencia de Proteínas de Unión de Ácidos Grasos (PUAG) en el parásito *Echinococcus granulosus*, cuyas funciones incluyen procesos de protección, desarrollo y sobrevivencia en sus etapas de crecimiento; es posible emplear la alta afinidad de esta proteína por los ácidos grasos, en especial los ácidos grasos poliinsaturados, para desarrollar nanotransportadores como estrategia terapéutica contra la enfermedad hidatídica.



Capítulo 1

Marco Teórico

1.1. Enfermedad Hidatídica

La enfermedad hidatídica o equinococosis es una de las 17 Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTD) reconocidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ¹⁵. Esta enfermedad posee una distribución cosmopolita y representa un problema de salud en muchos países sudamericanos como Perú, Chile, Argentina, Uruguay y Brasil; y países de la región Mediterránea, del Asia Central, y el este de África. Esta enfermedad zoonótica es causada por los estados larvales de los céstodos del género *Echinococcus* ¹⁶. El principal causante de esta enfermedad es la especie *Echinococcus granulosus*, el cual posee un complejo ciclo de vida que envuelve a dos hospederos, los hospederos definitivos, usualmente carnívoros, que albergan parásitos adultos en sus intestinos delgados; y los hospederos intermediarios que suelen ser los humanos y herbívoros ¹⁷. Estos helmintos son capaces de mantener la infección por un largo periodo de tiempo a pesar de los mecanismos de defensa del hospedero, a través de elaboradas estrategias como inmunomodulación, defensas antioxidantes y resistencia a enzimas proteolíticas ¹⁸.

1.1.1. Morfología del *Echinococcus granulosus*

Echinococcus posee ciertas características únicas que lo diferencian del otro género en la familia Taenia. En la fase adulta raramente miden más de 7 mm, no tiene intestino y todo el intercambio metabólico tiene lugar a través de la cubierta exterior sincitial,

denominado tegumento.

El *Echinococcus* adulto posee un órgano adjunto especializado, el escólex, que tiene cuatro músculos y dos filas de anzuelos, uno grande y otro pequeño sobre el rostellum. El cuerpo o estróbilo, es segmentado y consiste en un número de unidades reproductivas (proglótides), las cuales varían en número de dos a seis, no posee órganos del sistema circulatorio, respiratorio y digestivo¹⁹. Es hermafrodita y posee conductos reproductivos que se abren a un lado lateral común; además posee un poro genital cuya posición depende de la especie y la cepa. Posee un cirrus prominente que puede ser horizontal o inclinado anteriormente y el vitellarium es globular. El útero se dilata después de la fertilización, ocupando finalmente la mayor parte del segmento terminal cuando los huevos están completamente desarrollados²⁰, como se observa en la Figura 1.1.

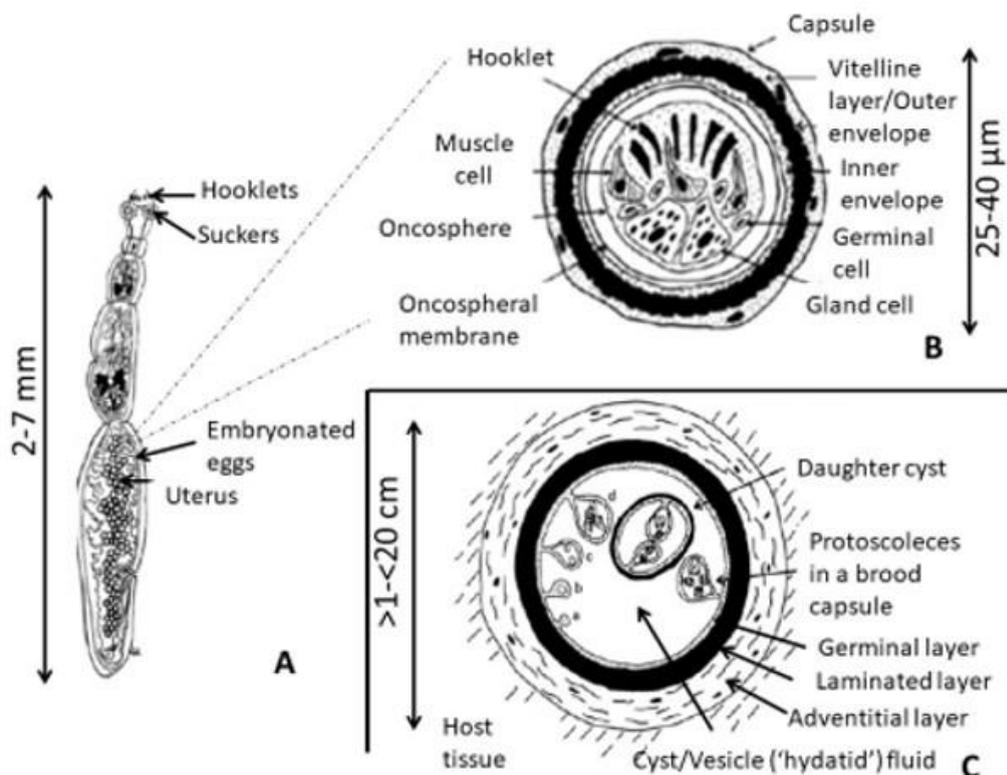


Figura 1.1: Morfología del parásito *Echinococcus granulosus* en sus diferentes estadios de crecimiento. En A y B, se observa el desarrollo alcanzado por el parásito en crecimiento, en C se observa el desarrollo del parásito en un quiste hidatídico²¹.

Los huevos del *Echinococcus granulosus* son ovoides (30 µm – 40 µm de diámetro), consisten en un embrión hexacanto (oncosfera = primera etapa de la larva) rodeada por varios envoltorios, formándose el embrióforo queratinizado, que tiene mas resistencia. La cápsu-

la externa desaparece rápidamente una vez que los huevos son liberados dentro huésped. Los metacestodos (segunda etapa larval) consisten en una cámara de aire con una capa laminada exterior acelular y una capa germinal nucleada interior, que puede dar lugar al brote de cápsulas de crías asexualmente. Los protoscolex surgen de la pared interior de las cápsulas de cría. Los *Echinococcus* requieren dos hospederos mamíferos para completar su ciclo de vida; los segmentos que contienen los huevos (proglótidos fecundados) o huevos libres son pasados en las heces de un hospedero definitivo a un hospedero intermediario, donde la etapa de metacestodo y protoscolex se desarrolla. El ciclo es completado si es que el hospedero intermediario es consumido por un carnívoro. Los huevos son altamente resistentes a factores ambientales y pueden permanecer infecciosos por muchos meses o hasta aproximadamente un año en un ambiente de bajas temperaturas (4°C a los 15°C). Los huevos de *Echinococcus* son susceptibles a la desecación, además en una humedad relativa de 25% estos son eliminados en 4 días y en 0% solamente en un día²².

Una vez formado el quiste hidatídico, la pared es definida por una estructura que comprende una delgada capa interna de células (capa germinal) y un laminado exterior masivo; esta estructura peculiar está formada por un enmallado de mucinas rica en galactosa glicanos, adicionalmente, en *Echinococcus granulosus* y no en otras especies del género, contiene nanodepositos de calcio inositol hexakisfosato²³. El quiste está lleno de fluido hidatídico que contiene protoscolices y proteínas derivadas del hospedero, rodeado por una pared de dos capas²⁴. La mayor es de 3mm de espesor, permeable a macromoléculas, y la otra es la capa laminada que representa un área muy grande de adsorción de proteínas difusibles. El establecimiento de los parásitos y la formación del quiste hidatídico, se da en una zona no infiltrada rodeada de una cápsula de colágeno derivada del huésped²⁵.

1.1.2. Ciclo de Vida del *Echinococcus granulosus*

El ciclo de vida del parásito *Echinococcus granulosus* inicia al interactuar con el hospedero intermediario, representado por un gran número de mamíferos, al adquirir la infección por la ingestión o aspiración de los huevos que usualmente se encuentran en las heces provenientes de rebaños de mamíferos. Debido a la acción de las enzimas en el estómago y el intestino delgado, la oncosfera es liberada del embrioforo queratinizado. La

bilis activa la oncosfera, la cual penetra en la pared del intestino delgado. La penetración es ayudada por los movimientos de gancho y posiblemente por secreciones de la oncosfera; que logra acceder a uno de los vasos linfáticos o vénulas mesentéricas por donde son posiblemente transportadas al hígado, donde algunas son retenidas, otras alcanzan los pulmones, y unas cuantas pueden ser transportadas a los riñones, el bazo, el cerebro, músculos, y otros órganos, Figura 1.2.

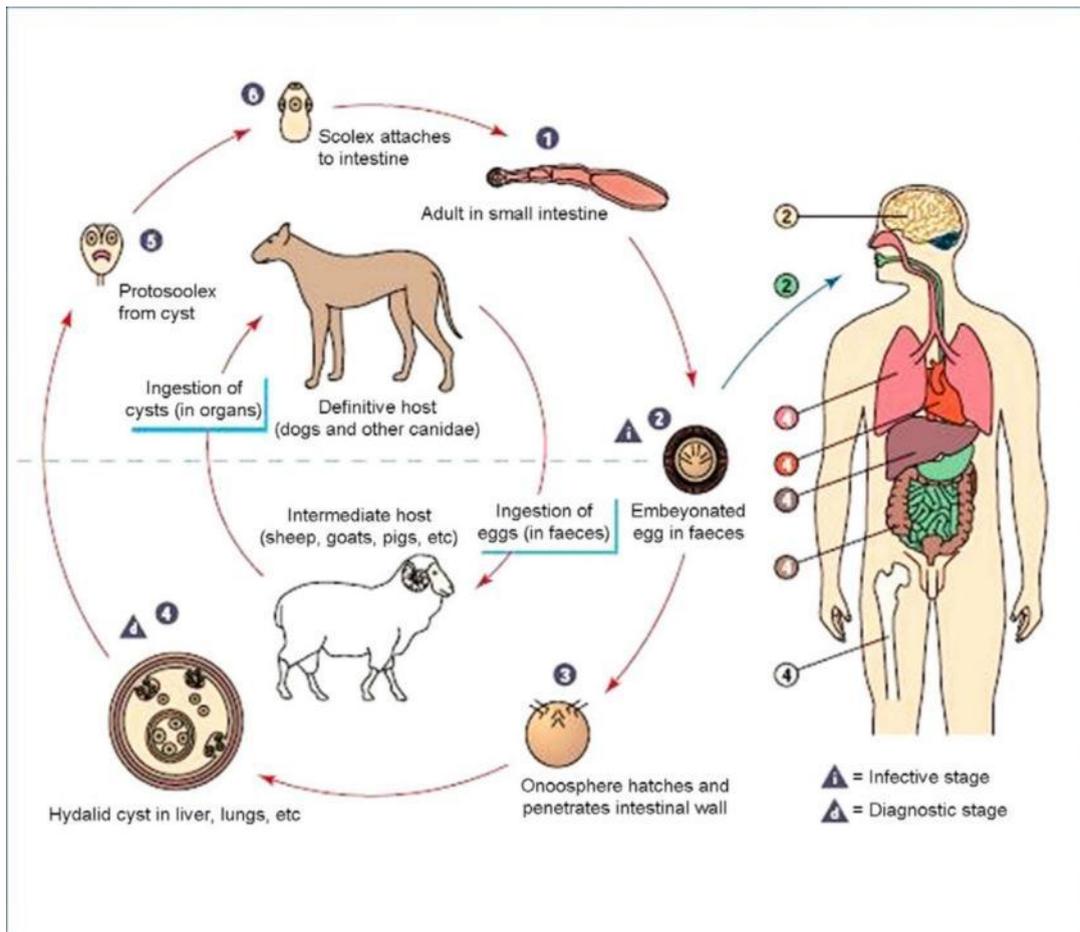


Figura 1.2: Diagrama del ciclo de vida del parásito *Echinococcus granulosus*. Etapas de diagnóstico (d) y Etapas de infección (i). Se observan los órganos donde el parásito se aloja²².

Una vez que la oncosfera ha alcanzado su locación final, se desarrolla hacia la etapa de metacestodo. Una de las actividades importantes en la infección del *Echinococcus* es que el parásito se escuda detrás de una barrera celular formada principalmente de mucinas, llamada capa laminar²⁶. El tiempo de desarrollo es variable y puede tomar varios meses antes de que los protoscolex sean producidos (metacestodes fértiles). Existen miles de protoscolex dentro de un solo quiste de *E. granulosus*, cada uno de los protoscolex es

capaz de desarrollarse en un helminto adulto sexualmente maduro¹⁵. Si la estructura del embrión no es detectada y detenida por los macrófagos, pierde su configuración estructural de los ganchos y sufre la formación de una vesícula central, transformándose en un quiste hidatídico. El tiempo necesario para su formación va desde algunos meses hasta varios años, con un crecimiento de 1 a 5 cm por año. Su crecimiento está en relación a los años en que el hospedero posee, de acuerdo a ello, pueden desarrollarse hasta 16 años en los caballos y hasta 50 años en el hombre. Existen también dentro de la calificación de estos parásitos quistes infértiles o acefaloquistes, que no forman protoscolex y no continúan con el ciclo biológico normal²⁷.

1.1.2.1. Metabolismo del *Echinococcus granulosus*

Tradicionalmente, se cree que los nutrientes que obtienen los quistes hidatídicos son difundidos desde los tejidos que rodean el quiste; sin embargo, se han observado algunos microcanales alrededor del quiste, indicando que estos deben obtener sus nutrientes a través de estos en el tejido del hospedero que rodea al quiste hidatídico. Existe una nueva aproximación para la terapia del quiste a partir de estos microcanales de un tamaño aproximado de 10 μm .²⁸ La más importante propiedad de la capa laminada del parásito es la de absorber proteínas, lo que implica la secreción de productos de la reacción local del hospedero que se tienden a acumular en las paredes del quiste²⁹.

1.1.3. Distribución geográfica de la hidatidosis

La equinococosis cística cuenta con un estimado de 2 a 3 millones de casos globales junto con la equinococosis alveolar humana; de los cuales 0.3 a 0.5 millones de casos se da en el hemisferio norte, y es responsable de por lo menos de \$3 mil millones de pérdida cada año³⁰. *Echinococcus granulosus* posee un rango geográfico mundial en todos los continentes incluyendo áreas polares, templadas, subtropicales y tropicales en por lo menos 100 países³¹. Esta enfermedad es considerada una de las mayores enfermedades desatendidas. La incidencia anual puede variar de 1 a 200 personas por cada 100,000 habitantes en varias regiones endémicas³². Las mayores tasas están observadas en África, China, al este y sur de Europa, las costas mediterráneas, Sudamérica y mayormente en regiones rurales, donde resalta la distribución en países sudamericanos. La equinococosis

cística es endémica en el Mediterráneo incluyendo los países de del suroccidente de Asia; como Irán que es considerado una área hiperendémica ³³, como se observa en la Figura 1.3.

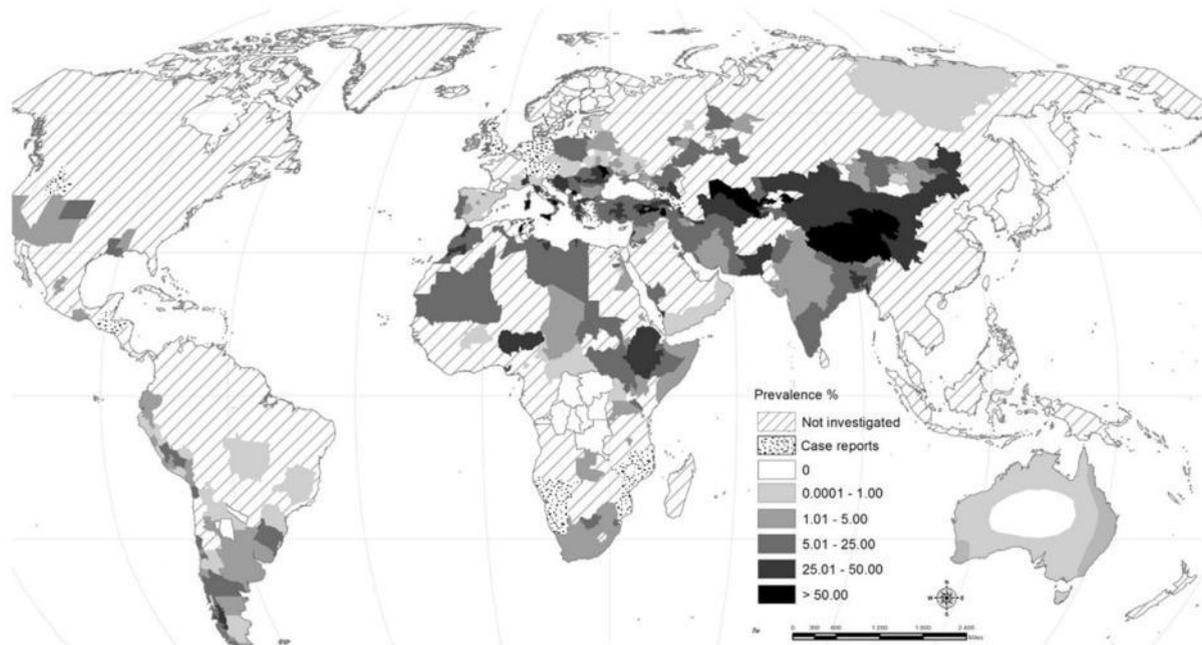


Figura 1.3: Distribución geográfica de la enfermedad hidatídica, donde se observa la mayor distribución en la región central de Asia.¹

En el Perú, la enfermedad hidatídica se encuentra ampliamente distribuida sobre todo en las regiones de la sierra central, como Pasco, Huancavelica, y Junín, en Cusco y en la sierra sur como Arequipa y Puno; como se observa en la Figura 1.4. También se observa la prevalencia de esta enfermedad en ciudades de la costa como Lima³⁴. Se experimenta una tasa de contagio de 14 a 34 casos por cada 100000 habitantes, observándose hasta 2000 casos anuales³⁴. Además, la mayor diseminación se da sobre la sierra, región que posee el 98% de ganado en nuestro país, donde la tasa de prevalencia de la infección en animales alcanza hasta un 75% y que representa una pérdida económica de 179 millones de dólares². En la última década se evidenció la presencia de SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria) en los centros de beneficio, donde se inspecciona y evalúa la calidad de la carne para evitar mayores contagios³⁵.



Figura 1.4: Distribución de la enfermedad hidatídica en el Perú ³⁶.

1.1.4. Diagnóstico y tratamiento de la hidatidosis

Los protocolos para el tratamiento de la equinocosis cística de la Organización Mundial de la Salud (OMS) están basados en la clasificación de ultrasonidos estandarizados, siendo una indicación de alta especificidad³⁷. En nuestro país, el diagnóstico de esta enfermedad se da por medio de exámenes imagenológicos como ultrasonografía, rayos x y tomografía; complementados por pruebas serológicas como ELISA de IgG, aglutinación por látex y Western blot³⁸. Los procesos de diagnóstico en pacientes individuales varía de acuerdo a diferentes pasos, como: confirmación por imágenes e identificación de las características de la estructura del quiste sospechoso, confirmación por la detección de anticuerpos por inmunodiagnósticos (ELISA, inmunoblot, detección de 5 anticuerpos), material de biopsia que puede ser examinado determinando la presencia de fluido hi-

datídico, protoscolex o ganchos. Un método directo es encontrar las características del protoscolex o los ganchos de *E. granulosus* en la aspiración de especímenes del fluido hidatídico utilizando técnicas de microscopia¹⁵.

Las manifestaciones clínicas de la equinocosis cística están raramente presentes hasta que los quistes crecen y afectan los órganos y tejidos. 60 al 88 % de los pacientes con quistes menores de 7.5cm en diámetro manifiestan síntomas no discernibles como dolor muy leve³⁹. El hombre es infectado luego de la ingestión de los huevos del parásito que provienen de fuentes como agua, plantas u hospederos definitivos (perros). Cada huevo, contiene una oncosfera, que formará un quiste unilocular que se desarrollara especialmente en el hígado y en los pulmones, desarrollando su ciclo de vida⁴⁰. Existen varias opciones para su tratamiento: remoción quirúrgica, tratamientos percutáneos, y quimioterapia con compuestos de benzimidazol¹², fármacos antihelmínticos efectivos contra nematodos, cestodos y trematodos cuya acción está basada en la alteración de las funciones celulares como resultado de su unión con la tubulina del parásito y generando la disrupción del equilibrio dinámico de la unión de tubulina-microtubulos²⁴; la mejor opción se da de acuerdo a las características del paciente y a las características de quiste (número, tipo, tamaño, locación, presencia de complicaciones).

Para la quimioterapia, el albendazol es el fármaco generalmente utilizado⁴; sin embargo las concentraciones de la droga no son óptimas, y son mucho menores que las del plasma debido a la gruesa pared del quiste. Aumentar las dosis de benzimidazoles podría causar efectos como diarreas, vómitos, náuseas y resultar en la muerte del paciente; por otra parte, en más de un tercio de casos se observa que la pared de los quistes son resistentes a los tratamientos⁴¹. A través del tiempo se han ido obteniendo muchas alternativas de tratamiento, generalmente de conocimiento popular como el extracto de Zataria, capaz de tener un efecto inhibitorio sobre este parásito⁴².

El praziquantel (PRZ), derivado de pirazinoiso-quinolina heterocíclica, es considerablemente menos tóxico que el albendazol. Los efectos de PRZ en los tejidos del quiste son diferentes que los obtenidos por los benzimidazoles, ya que PRZ causa efectos sobre la capa germinal, y las estructuras exteriores y el citoplasma distal permanece inalterado⁴³.

1.1.5. Prevención

El entendimiento de la sobrevivencia del parásito a la respuesta inmunológica del hospedero permite el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento y control de la equinococosis y enfermedades autoinmunes. Considerando la complejidad y las diferencias de las interacciones hospedero – parásito en los diferentes periodos de la infección, es mejor determinar las etapas de la infección antes de la administración de vacunas o drogas, y de tomar aproximaciones combinadas para eliminar las infecciones de las especies de *Echinococcus*. Es comprensible que luego de la inmunización con una vacuna basada en el antígeno específico de oncosfera, la protección puede fallar debido a que la oncosfera ya ha crecido previamente. La inmunidad innata es esencial para eliminar las infecciones de parásitos durante las etapas previas a la infección, pero las funciones normales de las células inmunes relacionadas como los macrófagos, eosinófilos y los presentadores de antígenos no están relacionados con la equinococosis. Las rutas metabólicas de glucosa y lípidos son blancos prometedores debido a la capa laminada rica en carbohidratos del tegumento del *Echinococcus*, que es crítica en la invasión y la evasión⁴⁴.

La vacuna EG95 es efectiva en la protección de animales que pastan, y son susceptibles a la infección de *Echinococcus granulosus*. Esta vacuna ha sido registrada para su uso comercialización en China y Argentina. El anticuerpo ha demostrado ser el mejor vehículo para la protección del ganado en contra de este parásito⁴⁵. El anticuerpo se une al tegumento de la oncosfera, y en presencia del complemento, se produce daño irreparable resultando en la lisis de la misma⁴⁶. Las limitaciones del uso de la vacuna EG95 se encuentran en la variabilidad genética del parásito *Echinococcus granulosus*, lo que afecta la especificidad del anticuerpo y el desarrollo de una única vacuna que evite el crecimiento del parásito.

1.2. Proteínas de Unión de Ácidos Grasos (PUAG) de parásitos platelmintos

Los platelmintos no pueden sintetizar sus propios lípidos *de novo*, por lo que ellos dependen de tomar los lípidos de su hospedero, y las proteínas de unión de ácidos grasos son las encargadas de transportar estas moléculas dentro de los parásitos⁴⁷. Como se observa en la Figura 1.5, se evidencia la presencia de este tipo de proteínas en nematodos y platelmintos. Recientemente se han descubierto, por su rol inmunodominante en los distintos tipos de infecciones, una gran variedad de proteínas que unen lípidos producidas por los helmintos. Si bien no se conocen realmente las funciones de estas, se podría pensar que están involucradas directamente en la captación de lípidos, así como en funciones internas referidas al metabolismo lipídico, desempeñando un papel importante en el mantenimiento y protección de estructuras presentes en estados larvales, mediante la unión a derivados tóxicos del metabolismo lipídico. En estadios adultos, estas proteínas podrían estar involucradas en la modulación del entorno tisular local del hospedador y la evasión de su sistema inmune, a través del secuestro de moléculas mediadoras⁴⁸

Estas PUAG se caracterizan por su masa de 14-15 kDa, constituidas por 127 a 134 aminoácidos conformados en 10 láminas β en forma de barril limitado por dos α hélices. El mayor rol de estas proteínas es facilitar la entrada de lípidos en las células y/o subsecuentemente el transporte intracelular y compartimentación, así como remover los ácidos grasos de los depósitos intracelulares. A pesar de que las PUAG comparten del 20 al 70 % de identidad a nivel de aminoácidos entre las especies de invertebrados, su estructura es altamente conservada, caracterizada por una cavidad formada por diez láminas antiparalelas y dos hélices. Avances importantes en el entendimiento de los roles funcionales e individuales de las PUAG han surgido recientemente⁸.

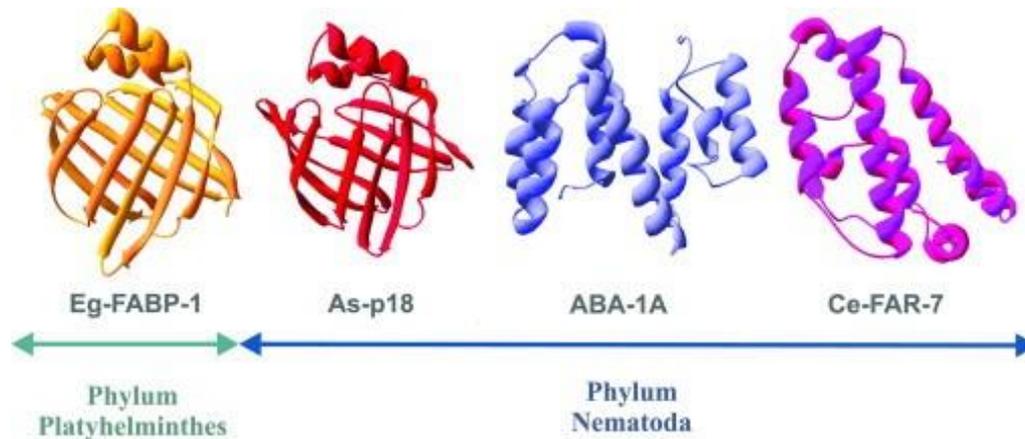


Figura 1.5: Estructura de las PUAGs presentes en nematodos y platelmintos ⁴⁹.

1.2.1. PUAG en *Echinococcus granulosus*

El análisis del genoma de *Echinococcus spp.* y otros parásitos relacionados han confirmado la falta de genes envueltos en la síntesis de lípidos *de novo* (como ácidos grasos y esteroides), purinas y la mayoría de aminoácidos. Los lípidos no solamente representan un sustrato energético importante; sino que son parte de la producción de otro tipo de macromoléculas como la lipoproteína Antígeno B (AgB) producida ampliamente por este parásito y acumulada en los fluidos hidatídicos ⁵⁰.

Dos proteínas han sido identificadas en el *Echinococcus granulosus* la EgFABP1 y EgFABP2; ambas expresadas en el mismo estado larval, lo que sugiere que ambas pueden poseer diferentes funciones en el parásito o ser expresadas de manera diferente. Ambas proteínas fueron expresadas de forma recombinante pero solo la proteína EgFABP1 fue estable y pudo ser cristalizada ⁸, como se observa en la Figura 1.6. Se piensa que estas proteínas están implicadas en un posible rol de captura y transporte de ácidos grasos de forma intracelular, en la regulación del metabolismo de lípidos, en la protección de acción deletérea de los ácidos grasos libres de cadena larga y en la diferenciación celular. Los ácidos grasos insaturados poseen una afinidad favorecida por esta proteína sobre los fosfolípidos, los ácidos grasos derivados de CoA y prostaglandinas. La proteína EgFABP1 podría ser asociada a la ruta de metabolismo de los derivados araquidónicos ⁶. Esta proteína ha sido encontrada en el líquido hidatídico del quiste y en la secreciones del protoscolex, es por ello que se le tiene un gran interés en el rol potencial en la interacción de fármacos como un candidato para el desarrollo de vacunas ⁷.



Figura 1.6: Estructura terciaria de la proteína EgFABP1 del parásito *Echinococcus granulosus*⁵¹.

1.3. Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPI)

Los ácidos grasos pueden ser clasificados de acuerdo a la longitud de la cadena y el número de dobles enlaces. Los ácidos grasos de cadena larga contienen más de 12 átomos de carbono, y los ácidos grasos que contiene más de 22 átomos de carbono son llamados como ácidos grasos de cadena muy larga como el ácido docosanóico (C22:0), tetracosanóico (C24:0), y hexacosanóico (C26:0). En el cerebro, el ácido palmítico y el ácido esteárico son los ácidos grasos saturados más importantes (son aquellos ácidos que no contiene dobles enlaces en su estructura). Los AGPI que contienen múltiples dobles enlaces entre los átomos de carbono, pueden ser clasificados en dos familias dependiendo de la posición

de los dobles enlaces en la terminación metil. Los dos más predominantes en el cerebro son el ácido araquidónico omega-6 (ARA) y el ω -3 ácido docosahexaenoico (DHA). Otros ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico (LNA), el ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido α -linolénico (ALA), no son totalmente detectados en el cerebro debido a que se encuentran en muy baja concentración comparados con el ARA y el DHA.

En el cerebro los ácidos grasos pueden ser no esterificados (libres) o esterificados a lípidos como los triglicéridos, colesterol y los fosfolípidos; que predominantemente se encuentran en forma esterificada a fosfolípidos en las membranas plasmáticas ⁵².

Los ácidos grasos poliinsaturados contienen uno o más dobles enlaces en su estructura, y se encuentran generalmente en los tejidos animales y en plantas. Los ácidos grasos de cadena larga n-3 se encuentran predominantemente concentrados en pescados, y en los aceites vegetales los de cadena larga n-6. Dos diferentes rutas sintéticas existen para la construcción de los ácidos grasos de cadena larga n-3 y n-6. El n-6 o también llamado ácido araquidónico (ARA) es producido en las membranas de animales y es precursor de varios compuestos bioactivos como las prostaglandinas, los tromboxanos, y los leucotrienos. El ácido eicosapentanoico (EPA) o n-3 posee un enlace doble más ⁵³. Existe considerable evidencia de que los ácidos grasos esenciales como el ácido linoleico y el ácido linolénico y sus metabolitos inhiben la acción en el crecimiento de células tumorales *in vitro* e *in vivo*. Los metabolitos de cadena larga como el EPA y el DHA no solo incrementan la producción de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, también poseen efectos antiinflamatorio y citotóxico sobre células tumorales ⁵⁴. Las estructuras moleculares de los ácidos grasos poliinsaturados se observan en la Figura 1.7.

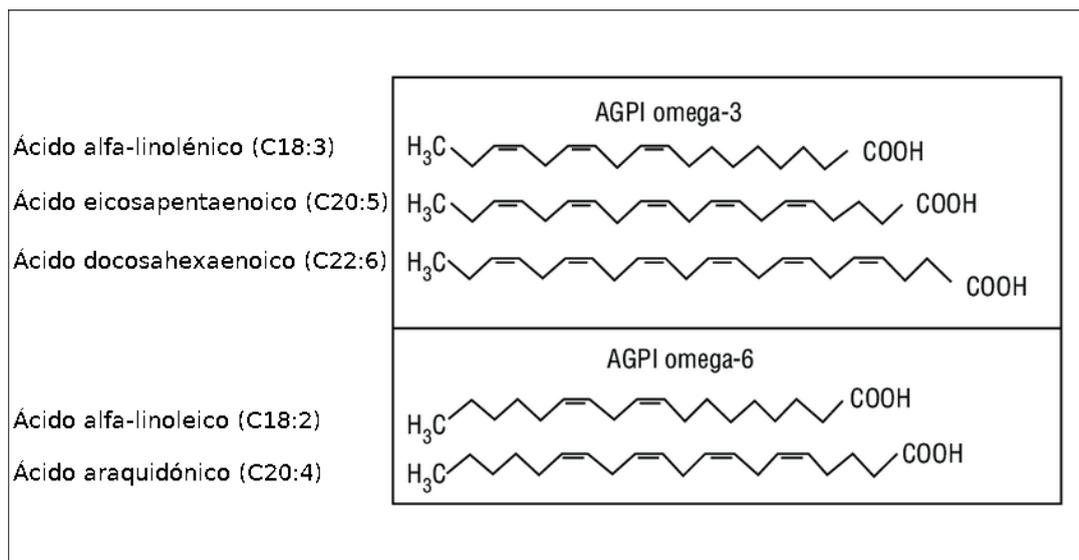


Figura 1.7: Ácidos grasos poliinsaturados. Estructura molecular de los AGPI según su clasificación entre ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y ácidos grasos poliinsaturados ω -6⁵⁵.

1.3.1. Biosíntesis de Ácidos Grasos Poliinsaturados

Existen dos mecanismos para la biosíntesis de estas moléculas, uno aeróbico, que ocurre en animales y algunos microorganismos eucariotas, y otro anaeróbico el cual ocurre en bacterias y otro grupo de eucarióticos, como se muestra en la Figura 1.8. El DHA se sintetiza en el retículo endoplasmático utilizando ácidos grasos poliinsaturados como precursores mediante el mecanismo aeróbico denominado así por su requerimiento de oxígeno molecular. La biosíntesis involucra la desaturación y elongación de la cadena hidrocarbonada, procesos en los que intervienen los sistemas enzimáticos Δ 6, Δ 5 y Δ 4 desaturasa para llegar hasta DHA. Estas enzimas participan en la primera etapa de síntesis de EPA. La identificación de estas enzimas ha permitido corroborar el mecanismo de la biosíntesis en mamíferos y en diferentes microorganismos. Se ha sugerido que la síntesis de DHA es independiente de la Δ 4 desaturasa la que ocurriría por una retro conversión de C24 a través de una β oxidación. En general los ácidos grasos poliinsaturados se sintetizan comenzando por un ácido graso monoinsaturado, el ácido oleico (C18:1 ω 9). La elongación de la cadena tiene lugar cuando dos átomos de carbono pasan desde el donador (acetil CoA o malonil CoA) a la cadena del ácido graso. En la ruta de los ω 3, la desaturación produce ácido linoleico y el ácido α -linolénico. El primer doble enlace es introducido entre el carbono 12 y 13 del ácido oleico, dando origen al ácido linoleico. El segundo doble

enlace se introduce entre los carbonos 15 y 16 del ácido linoleico formándose el ácido α -linolénico. Secuencias de pasos de elongación y desaturación de estas moléculas permiten la síntesis de DHA. El segundo mecanismo de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados es el denominado PKS, también llamado poliketido sintetasa, que incluye un gran número de enzimas, su nombre es debido a que no utiliza oxígeno molecular pero se puede llevar a cabo bajo condiciones aerobias⁵⁶. ARA es un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos n-6, precursor de leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos, y son colectivamente llamados eicosanoides. Se encuentra en los fosfolípidos de membrana a través de todo el cuerpo y particularmente abundante en el cerebro, músculos y el hígado⁵⁷.

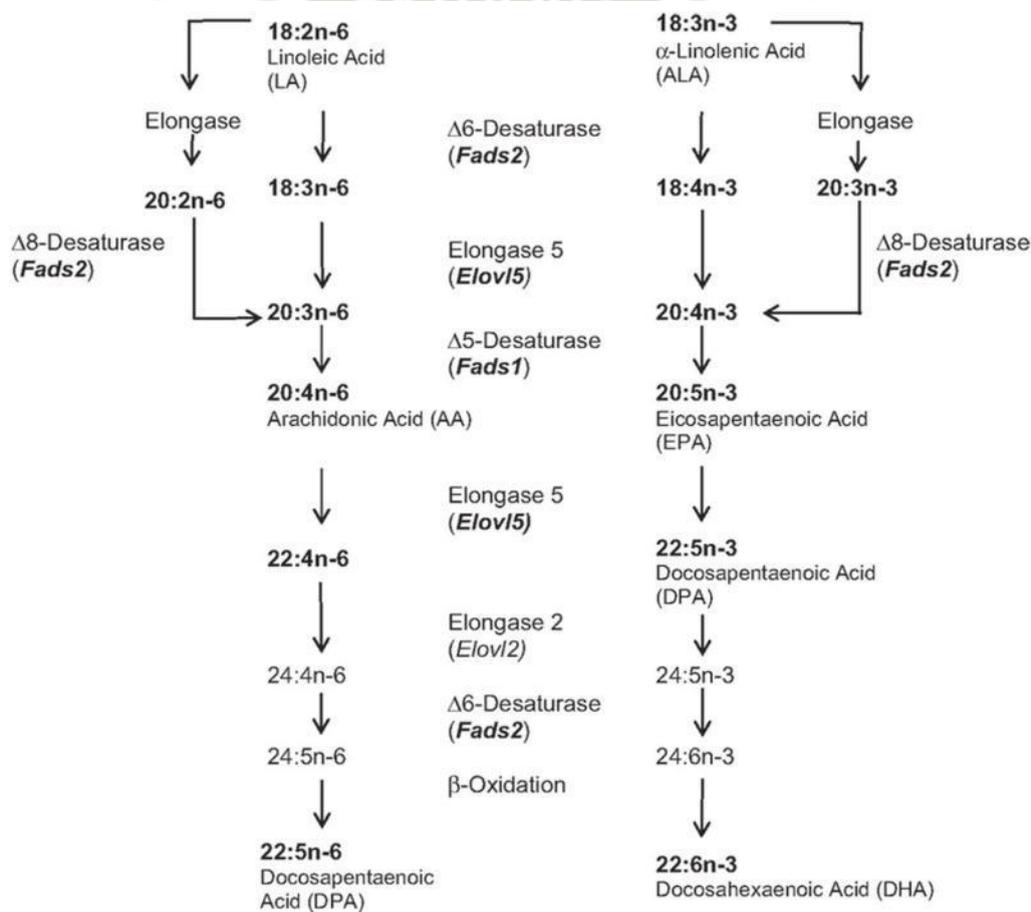


Figura 1.8: Representación esquemática de la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados

1.3.2. Estructura del Ácido docosapentaenoico y el Ácido eicosapentaenoico

La conformación espacial del DHA es diferente de la de EPA como resultado de longitud de esqueleto de carbonos y el grado de saturación. EPA es una cadena larga de ácido graso poliinsaturado, de 20 carbonos y dobles enlaces. DHA es una cadena más larga de 22 carbonos y 6 dobles enlaces. El ω -3 AGPI es derivado del ácido α -linolénico (18:3) que es precursor de EPA y DHA. El ácido α -linolénico no puede ser sintetizado por el cuerpo humano y como debe de ser, es enteramente obtenido en la dieta. Incrementar el ácido α -linolénico tomado por un periodo de semanas puede tomar meses en incrementar la proporción de EPA en el plasma, eritrocitos, y leucocitos; pero no existe incremento de DHA. La conversión de ácido α -linolénico a EPA ocurre pero es limitado en hombres y la transformación de DHA es muy lenta; pero en mujeres la conversión a cadenas largas ω -3 AGPI es mayor debido al efecto regulatorio del estrógeno. Los AGPI poseen una alta contribución a las propiedades físicas de las membranas, incluyendo la organización, la permeabilidad iónica, la elasticidad y la formación de microdominios⁵⁹

1.4. Nanotransportadores

La nanotecnología implica la ingeniería de los sistemas funcionales a una escala molecular; como sistemas caracterizados, son muy importantes en el desarrollo de materiales para la ciencia y sobre todo para la biomedicina. El área más activa de la nanotecnología es la nanomedicina, la que aplica a la misma a altas intervenciones médicas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades⁶⁰. Los nanomateriales recaen sobre rangos similares a las proteínas y a la estructuras de muchas macromoléculas encontradas en células vivas. Los nanomateriales toman una ventaja importante en la maquinaria celular y facilitan la entrega de drogas⁶¹, con una forma de entrega dirigida y controlada de moléculas bioactivas; lo cual es un prerequisite para su óptima eficacia⁶². Los sistemas de nano entrega ofrecen muchas ventajas sobre las dosis convencionales, sobre los sistemas de entrega intracelular en los sitios de infección, reduciendo las concentraciones y la frecuencia de las dosis así como la liberación de los fármacos, disminuyendo los efectos colaterales y aumentando la conformidad de los pacientes⁶³.

Recientemente se ha descrito la utilidad de las nanopartículas como vehículos para poder repartir más eficientemente diferentes sustancias, como drogas terapéuticas en diferentes escenarios como el tratamiento del cáncer o enfermedades autoinmunes, no solo sobre el sitio directo de entrega como los antígenos, si no también prolongar la exposición de estos antígenos al sistema inmunitario⁶⁴. Los nanotransportadores pueden liberar fármacos de forma controlada y potencialmente aumentar la eficacia de las drogas, reduciendo el efecto sistemático, e implementando la adherencia al régimen de los pacientes debido a la reducción de la frecuencia de administración⁶⁵. Para lograr su propósito los nanotransportadores son diseñados para localizar selectivamente y acumularse en tumores tomando ventaja de la anormal vasculatura de los tumores sólidos, muchos de estos poseen paredes con aberturas capilares, a través de las cuales estas moléculas pueden atravesar el tumor⁶⁶. Estos transportadores incrementan la solubilidad y biodisponibilidad de drogas poco solubles⁹.

1.4.1. Caracterización

Varias nanoformas han sido implementadas a través de los años, como sistemas de entrega de fármacos; variando desde sustancias biológicas, como gelatina y fosfolípidos para liposomas, a sustancias químicas como varios polímeros y metales que contienen nanopartículas. Los polímeros conjugados con drogas, que poseen varios tamaños, no son normalmente considerados como nanopartículas⁶⁷. Es conocido que los nanotransportadores son generalmente restringidos a los vasos sanguíneos del exterior del tumor, y difícilmente son capaces de penetrar el tejido del mismo, debido a que su ambiente extracelular está cubierto de una matriz densa de células estrechamente unidas, haciendo a los nanotransportadores pequeños (menores a 10 nm) importantes ya que podrían transportar fármacos dentro del tejido del tumor y liberarlos dentro de las células tumorales⁶⁸. Además, los nanotransportadores pueden ser acumulados preferentemente en tumores, sitios inflamatorios e infecciones en virtud del efecto de permeabilidad y retención (ERP). El efecto ERP asocia las características del sitio – especificidad, no asociadas con los tejidos y órganos normales, resultando en la selectividad del blanco⁶⁹. De acuerdo a ello, se pueden apreciar diferentes características muy importantes como las de incrementar la estabilidad de las drogas hidrofóbicas y su biodistribución⁶¹

1.4.2. Tipos

Se describen diferentes tipos de nanotransportadores con alta eficiencia, como los que se muestran en la Figura 1.9. De los más utilizados destacan los siguientes:

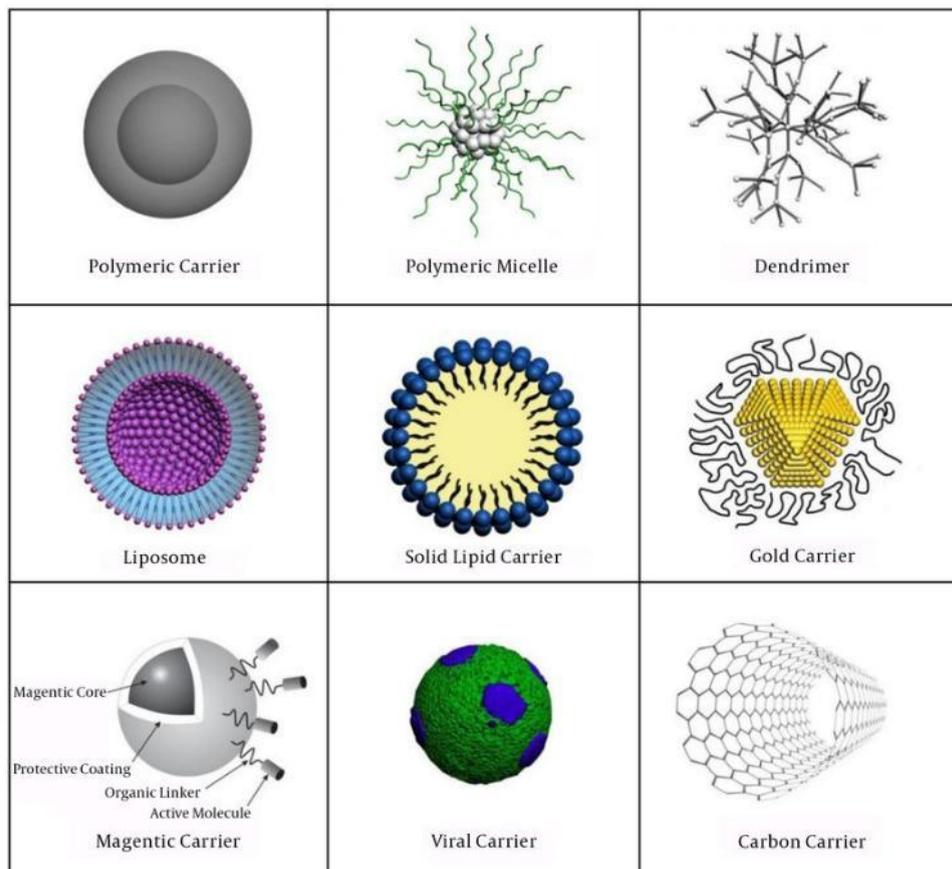


Figura 1.9: Tipos de nanotransportadores y diseño de sus estructuras⁷⁰.

- Nanocristales: el desarrollo de herramientas tecnológicas en las que se da la oportunidad de convertir una droga existente con baja solubilidad en solución, en una droga a nanoescala. Esta estrategia reduce el tamaño de la partícula de las drogas a escala nanométrica estabilizándola, de forma en la que se incrementa el área de superficie y con ello se incrementa la solubilidad y la disolución; consecuentemente incrementa la concentración en plasma.
- Nanoplateformas orgánicas
 - Liposomas: los liposomas son vesículas artificiales auto-ensambladas desarrolladas de fosfolípidos anfifílicos. Los liposomas poseen propiedades biológicas

atractivas, incluyendo la biocompatibilidad general, la biodegradabilidad, aislamiento de drogas del ambiente que lo rodea y la habilidad de contener drogas hidrofóbicas e hidrofílicas¹⁴. Las nanoestructuras de transporte basadas en lípidos son un sistema de entrega muy prometedor con un sistema de tamaño menor a 200 nm, debido a que incrementan la solubilidad en el agua, la estabilidad y biodisponibilidad de compuestos. Muchos de estos lípidos son necesarios para la salud de los seres humanos, como los ácidos grasos poliinsaturados que poseen roles como neuroprotectores, antiinflamatorio, con actividad antioxidante y disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares⁷¹.

- Nanopartículas poliméricas: Son partículas coloidales con un rango de 10 a 1000 nm, que pueden ser esféricas o ramificadas. Pueden ser fabricadas usando polímeros sintéticos biodegradables, como poliacrilatos y polímeros naturales como gelatina, quitosan, alginato. Pueden ser clasificados en tres categorías de acuerdo al mecanismo de incorporación del fármaco; el primero usando conjugación por enlaces covalentes, el segundo es mediado por interacciones hidrofóbicas entre el fármaco y el nanotransportador, y el tercero utilizando hidrogeles en la que se da la encapsulación hidrofílica del fármaco.
- Nanopartículas basadas en proteínas: se utiliza para fármacos hidrofóbicos, como los taxanos, usada en variedad de terapias para tumores⁷²
- Dendrímeros: los dendrímeros son macromoléculas sintéticas ramificadas que forman una estructura en forma de árbol. La composición química y el peso molecular de los dendrímeros puede ser precisamente controlados, y es fácilmente predecible la biocompatibilidad y la farmacocinética^{73,74}. Pueden poseer estructuras internas en forma de cavidades de perfil hidrofóbico o hidrofílico, y sus grupos terminales pueden ser modificados con diferentes fracciones moleculares con el objetivo de disminuir su citotoxicidad, implementar su biodisponibilidad y optimizar el transporte de fármacos^{75,76}. Existen numerosas metodologías para sus síntesis, y su única estructura química que los convierte en una alternativa fiable a los poliedros tradicionales, y con ellos se observa una amplia gama de aplicaciones^{11,77}. Las estructuras dendríticas basadas en poliglicerol altamente biocompatible son arquitecturas ideales para terapias anti cáncer, debido a que son solubles, concentrados en tamaño, funcionales

y provistos de ligandos multivalentes en la superficie^{78,79}. Los dendrímeros, que son estructuralmente uniformes son capaces de transportar fármacos eficientemente, con un diámetro de varios nanómetros. Son capaces de penetrar dentro de los tumores, pero requieren algunas modificaciones estructurales que le permitan interactuar con las paredes del quiste y su introducción dentro del mismo^{68,80}. El entendimiento de las interacciones de los dendrímeros como vectores de entrega con las biomembranas es importante para la optimización funcional, también para la reducción de una posible citotoxicidad^{81,82}. Los dendrímeros pueden ser utilizados para intensificar la solubilidad de los fármacos y su biodisponibilidad y actuar como modificadores de liberación y plataformas para los fármacos. Las interacciones entre los fármacos y los dendrímeros puede ser subdividida de tres diferentes tipos: encapsulación interna, interacción electrostática externa, u conjugación covalente. La encapsulación física, las interacciones hidrofóbicas, la atracción electrostática y las interacciones hidrofóbicas están envueltas en la encapsulación de fármacos. Estas interacciones juegan roles importantes en manejar la formación de complejos fármaco – dendrímero⁸³. En las estructuras dendríticas el número de grupos terminales se incrementa exponencialmente con un incremento en las generaciones del dendrímero. Dendrones es el término utilizado para designar a los dendrímeros que no poseen un núcleo, de donde un dendrímero puede ser preparado de la unión de varios dendrímeros siguiendo diferentes estrategias de unión⁸⁴. Estas estructuras presentan diferentes ventajas:

- Un índice de baja polidispersión, ya que a medida que aumenta la densidad de las ramas, la mayor parte de las ramas se disponen alrededor de un núcleo de menor densidad en forma de esferas y la densidad de la superficie externa es mayor y la mayor parte del espacio cerca al núcleo permanece vacío, por ello sirve para el atrapamiento del fármaco⁸⁵.
- Posee una permeabilidad mejorada, con la que son capaces de cruzar barreras como las membranas celulares, permitiendo también alcanzar las células objetivo dentro de un tumor más efectivamente¹⁰
- Mayor capacidad de carga, con la que pueden transportar un amplio rango de moléculas orgánicas e inorgánicas⁸⁶

- Alto potencial de solubilización, incrementando la solubilidad, la biodistribución, y la eficacia en un mayor número de terapias.
- Amplio efecto de retención y permeabilidad incrementada.
- Alta estabilidad, debido a su pequeño tamaño dentro de un rango de 1 a 100 nm lo que las hace susceptibles a ser tomadas por el retículo endoplasmático.
- Alta uniformidad y pureza son bien definidos, de un rango uniforme.
- Baja inmunogenicidad
- Son una plataforma multifuncional, que permite encontrar blancos específicos en un tejido específico, además presenta baja citotoxicidad y una buena biodegradabilidad⁸⁷
- Plataformas inorgánicas: los metales nobles, como las nanopartículas de oro, han surgido para la entrega de drogas y genes y poseen un complemento útil⁶¹.

1.4.3. Usos

Se describen diversos usos en la actualidad de los nanotransportadores como biomateriales importantes en el desarrollo de la biomedicina, con los que se obtiene muchos beneficios, avances en los tratamientos permitiendo el uso de nuevas terapias utilizando nuevos fármacos, reduciendo dramáticamente los efectos secundarios e incrementando la efectividad⁸⁸. Son un punto importante es el desarrollo de vacunas y el tratamiento del cáncer; las vacunas han tomado un auge importante sobre todo sobre las enfermedades infecciosas desatendidas, entre ellas la malaria en la que se desarrolló el tratamiento utilizando nanotransportadores como vehículo para aumentar la eficacia del tratamiento en contra del *Plasmodium spp*⁸⁹. Además, son importantes para el desarrollo de nanoestructuras en forma de nanoenvolturas de estructuras proteicas que han sido exploradas como potenciales transportadores en biomedicina. Se forman por autoensamblaje de subunidades de proteínas, estas estructuras poseen tres superficies que pueden ser ingenierizadas: la interior, la exterior en la subunidad intermedia. Las moléculas de diagnóstico y las terapéuticas han sido cargadas en el interior de estas nanoenvolturas, donde las superficies exteriores han sido diseñadas con el fin de ser biodisponibles y con habilidades de unión⁹⁰.

1.4.4. Poliglicerol como nanotransportador

La molécula de glicerol (1,2,3 propanotriol o también llamado glicerina), es molécula orgánica que posee diverso número de aplicaciones, desde la industria farmacéutica hasta la obtención de biodiesel como fuente de energía⁹¹. En el desarrollo nanotecnológico se ha utilizado el glicerol de forma ramificada, observándose una gran capacidad de transporte y facilidad de unirse covalentemente con otras moléculas. Se han obtenido diversas estructuras de glicerol hiper ramificado o poliglicerol, el cual es capaz de transportar diversos fármacos, así como también el uso de este tipo de estructuras para poder obtener ciclodextrinas capaces de transportar drogas, pigmentos, proteínas, DNA y RNA; bajo condiciones fisiológicas. Además, se ha observado la alta capacidad de síntesis de estos compuestos, un buen ajuste de la propiedades requeridas, una alta capacidad de carga, y buena solubilidad en solución acuosa⁹².

1.5. Bioinformática

La bioinformática ha venido siendo una herramienta importante en el campo de la ingeniería, como biología sintética que sigue los protocolos de ingeniería en el diseño y fabricación⁹³. La bioinformática, es un campo multidisciplinario que proviene de las combinaciones de diferentes campos de la ciencia como la biología, las ciencias computacionales, la estadística, la química, la matemática y muchas otras⁹⁴. En los últimos años se han utilizado estos conceptos en el área de la biotecnología, biología computacional, bioquímica y muchas otras en las que se puede organizar, analizar guardar información, discutir sobre algunos algoritmos que pueden ser implementados sobre la información bioinformática, y como ser capaces de descubrir, diagnosticar y proponer terapias en diferentes enfermedades, en ocasiones utilizando diferentes herramientas para la completa elucidación de la superficie de una proteína⁹⁵. Está directamente relacionado con la ingeniería molecular, la cual engloba un conjunto de manipulaciones biosintéticas en la genética molecular^{96,97}, e identificar los cambios específicos en las secuencias de aminoácidos, lo que podría sobrevenir en cambio de las propiedades funcionales de una proteína⁹⁸. La secuencia de aminoácidos de una proteína puede ser fácilmente determinada desde la secuencia nucleotídica en la información genética, la estructura primaria solo puede determinar una

estructura en su ambiente nativo. El conocimiento de una estructura de aminoácidos es vital en el entendimiento de las funciones de una proteína y el diseño de fármacos o el diseño de enzimas^{99,100}. Se distinguen diferentes objetivos de la bioinformática:

- Organizar la información biológica de una manera más fácil que ayude a los biólogos y científicos a guardar y a acceder a la información existente¹⁰¹.
- Desarrollar y diseñar herramientas de software que facilitan el análisis y manejo de información¹⁰².
- El uso de esta información biológica en el análisis e interpretación de los resultados de una manera mucho más precisa¹⁰³.
- Asistir a los investigadores en la industria farmacéutica para entender las estructuras de las proteínas, lo cual es importante en el desarrollo de fármacos¹⁰⁴
- Colaborar con los investigadores en el campo de la ciencia de la salud, para comprender la estructura de los genes que ayudaría en detectar y diagnosticar enfermedades como el cáncer¹⁰⁵

Los métodos de optimización poseen un gran número de aplicaciones en la ciencia y en la ingeniería. La optimización numérica ha sido usada para el diseño de modelos de rutas metabólicas en propiedades particulares que mejoran los flujos y son de interés biotecnológico¹⁰⁶.

Las simulaciones atómicas de dinámica molecular permiten estimar las energías libres de unión como también determinar las interacciones que contribuyen al cálculo de estas energías en escala atómica⁷⁵, con el fin de sobreponerse a las diferentes desventajas que se pueden ver en el desarrollo experimental¹⁰⁷.

1.5.1. Métodos Computacionales para el diseño de proteínas

Las funciones de una proteína están determinadas por la estructura tridimensional de la misma. Para entender el mecanismo del funcionamiento de una proteína, se realizan grandes esfuerzos para entender su estructura. Experimentalmente, la estructura de una proteína plegada puede ser revelada por varios métodos como la cristalografía de rayos X,

NMR, la microscopía cryo-electron, y dispersión de rayos X de ángulo pequeño; cada una de estas técnicas provee diferentes niveles de resolución. Los biólogos estructurales han producido una gran información de la estructura de proteínas y han hecho que sea accesible de diversas formas como bases de datos. Como el conocimiento de las relaciones de estructura - función crecen, las aproximaciones computacionales y los métodos bioinformáticos que pueden predecir cómo los cambios conformacionales afectan las propiedades o funciones de las proteínas se han convertido componente indispensable en su estudio. El diseño computacional de proteínas generalmente envuelve dos aproximaciones: uno de ellos es el diseño basado en plantillas, donde una proteína preexistente de una estructura conocida es utilizada como una referencia de inicio de la geometría espacial que le confiere atributos en una proteína como estabilidad y especificidad. La otra es la aproximación *de novo* la cual está basada en usar principios fundamentales de fisicoquímica que gobiernan las interacciones entre los residuos de una proteína.

1.5.2. Modelamiento Molecular

Se debe comprender al modelamiento molecular como una herramienta importante para explicar diferentes comportamientos de las moléculas y sobre todo el de proponer nuevos fármacos o métodos terapéuticos. Las macromoléculas poseen diferentes comportamientos en relación al desarrollo con su entorno, por lo que se propuso el uso de la mecánica molecular o mecánica clásica capaz de simular el comportamiento atómica de estas moléculas; pero de manera más compleja, la mecánica cuántica es capaz de interpretar las interacciones electrónicas entre los átomos que conforman una molécula y sobre todo de mayor interés las interacciones con un fármaco¹⁰⁸. Los métodos de mecánica cuántica poseen la ventaja sobre los métodos de mecánica molecular que solo incluyen los efectos de la transferencia de cargas, polarización, la ruptura de enlaces y su formación desde el principio. En adición, lo métodos mecánico cuánticos computan la estructura electrónica de un sistema molecular, el cual puede ser usado para la derivación de datos espectroscópicos

1.5.3. Mecánica Molecular

Los métodos de mecánica molecular, también llamados los métodos de campos de fuerza, unen la diferencia entre mecánica cuántica y mecánica continua y son extensamente usada para estudiar los efectos mesoscópicos en varios sistemas, incluyendo el modelado de materiales energéticos, y sistemas biológicos. En mecánica molecular, las moléculas son descritas como modelos de bolas y resortes, donde los átomos están unidos a través de enlaces químicos¹¹⁰. Esta estrategia le permite sobreponerse al problema de cálculo de la energía electrónica a través de la ecuación de Schrödinger. En este método también se omite los aspectos del movimiento nuclear, lo cual significa que la dinámica de los átomos es tratada desde el punto de vista de la mecánica clásica en base a la segunda ley de Newton¹¹¹. Los conceptos básicos asumidos por los métodos de mecánica molecular, mostrados en la Figura 1.10, pueden ser descritos de la siguiente forma:

- Cada átomo (incluyendo sus electrones y núcleo) está representado como una partícula con una masa característica y radio.
- Un enlace químico es representado por un resorte, con una constante de fuerza característica determinada por el potencial de energía de la interacción entre dos átomos químicamente unidos.
- Las funciones de energía potencial describen fenómenos intramoleculares (extensión, torsión, y flexión de enlaces) y los fenómenos intermoleculares como las interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals.
- Las funciones de energía potencial (campos de fuerza) descansan sobre los parámetros empíricos de datos experimentales o de otros cálculos.

El entendimiento de las interacciones entre el péptido y su superficie posee un enorme potencial en las aplicaciones biotecnológicas, pero su caracterización a nivel atómico está más allá de la resolución de las técnicas experimentales, por esta razón, la mecánica molecular es utilizada para modelar las interacciones a un nivel atómico¹¹⁰.

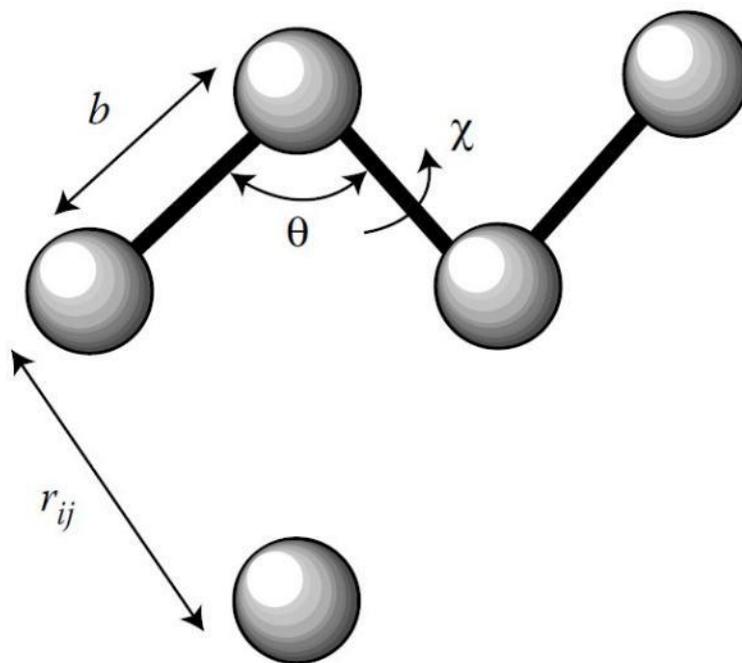


Figura 1.10: Representación esquemática de una molécula en mecánica molecular, donde θ representa el ángulo entre tres átomos, b la distancia del enlace de dos átomos, χ el ángulo diédrico entre cuatro átomos, y r representa las interacciones no enlazantes entre dos átomos¹¹²

1.5.3.1. Función de Energía Potencial

Un campo de fuerza es la función de energía potencial y la colección de parámetros que han sido optimizados para ser usados en esta función. Esta función y los parámetros son usados juntos para evaluar la energía potencial y fuerzas de las moléculas en una simulación. En general, esta función comprende términos de vínculo que describe las contribuciones de los enlaces, los ángulos de valencia, diedros o ángulos de torsión, y en algunos casos, ángulos de torsión fuera de plano (o ángulos diedros impropios) a la energía potencial y las fuerzas, y los términos no enlazantes que describe las contribuciones electrostáticas y de Van der Waals. Los métodos de mecánica molecular existen en un variado grupo de campos de fuerza disponibles que puede incluir AMBER¹¹³, CHARMM¹¹⁴, GROMOS¹¹⁵, y OPLS-AA¹¹⁶.

1.5.4. Dinámica Molecular (DM)

Las simulaciones de DM y Monte Carlo han sido herramientas importantes en el campo de la química computacional y permiten a los investigadores calcular numerosas propiedades termodinámicas de interés como las energías libres de solvatación, la unión de ligando, y el plegamiento de proteínas. Estas técnicas computacionales continúan la experiencia aumentando el éxito en reproducir y de predecir las propiedades experimentalmente medidas¹¹⁷. La dinámica molecular es la técnica computacional más ampliamente usada para estudiar el equilibrio de estructuras e interacciones de sistemas biológicos. Provee predicciones de diferentes variaciones y cambios de configuración en las estructuras de un sistema biológico, el cual puede ser relacionado con la variación de las funciones que desarrolle¹¹⁸. La dinámica molecular clásica considera a los átomos como esferas sólidas y a los enlaces como resortes. Esto permite a los átomos en un sistema que solo oscile entre distancias específicas. La dinámica molecular clásica está basada en la ecuación del movimiento de Newton¹¹⁹. Con los recientes avances en poder computacional como sus simulaciones, ahora pueden ser usadas en el desarrollo de nanomedicinas, para poder entender de mejor manera las interacciones de este tipo de moléculas y sus interacciones con sus proteínas objetivos¹²⁰.

1.5.5. Herramientas de Validación de Estructuras Moleculares

En el trabajo estructural de proteínas es necesario llevar a cabo diferentes procesos de validación, siendo así uno de los más importantes dentro de la Biología Estructural los diagramas de Ramachandran, y en los procesos de MD el uso de la Desviación Media Cuadrática (RMSD), las Fluctuaciones Medias Cuadráticas (RMSF) y el Radio de Giro (RG). Estas herramientas permiten la evaluación de la calidad estructural utilizando criterios y estándares ampliamente utilizados.

El diagrama de Ramachandran provee un método independiente de evaluación conformacional de la calidad estructural de la proteína. Este análisis confronta la distribución de las torsiones por aminoácidos, y evalúa los ángulos psi y phi, que son importantes para la real conformación de una proteína. Con esta herramienta se evalúa la estructura de una proteína y permite determinar si la distribución de los aminoácidos es permitida.

El diagrama de Ramachandran es ampliamente utilizado en Biología Estructural para la determinación de los ángulos de torsión en estructuras de proteínas provenientes de métodos como la cristalografía de rayos X.

Dentro de los métodos de evaluación y validación de estructuras en MD se utiliza el RMSD y RMSF. El RMSD evalúa y compara los cambios estructurales que va experimentando las moléculas a través del tiempo de dinámica con la estructura inicial, de tal forma que describe los cambios conformacionales globales. El RMSF identifica los aminoácidos dentro de la estructura que son más susceptibles a experimentar mayor movimiento o fluctuación sobre sí mismo durante la dinámica. Una de las herramientas más importante es el RG pues mide la capacidad de compactación de la estructura de la proteína sobre si misma, además es una herramienta sugerida para medir la compactación de un sistema como los nanotransportadores en forma de dendrímeros, pues describen la estabilidad del sistema.

1.5.6. Termodinámica y Calculo de Energia Libre

En las simulaciones de dinámica molecular es importante el estudio de las propiedades termodinámicas en el sistema de estudio. Estas propiedades se pueden encontrar distribuidas en la presión, la energía, la capacidad calorífica isobárica e isocórica. Se utilizan diferentes ecuaciones de estado que permitan calcular otras propiedades termodinámicas del sistema ¹²¹.

La energía libre es una de las propiedades termodinámicas más importantes ha calcularse dentro el diseño de nuevos biomateriales, pues esta propiedad ocupa un papel fundamental en los procesos químicos. Esta propiedad permite evaluar la afinidad relativa del acoplamiento molecular entre dos macromoléculas, y la espontaneidad con la que las interacciones se llevarán a cabo. Existen dos tipos de energía libre (Energía libre de Helmholtz y de Gibbs), siendo la energía libre de Gibbs la más empleada pues esta se utiliza bajo condiciones de temperatura y presión constante.

La energía libre es un concepto central en la termodinámica en los estudios bioquímicos y físicos de sistemas. Los valores de energía libre relativas son de mayor interés que las absolutas, como la de energía libre de solvatación y la energía libre de unión, como se muestra en el ciclo termodinámico de la energía libre de Gibbs en la Figura 1.11. Para

realizar el cálculo computacional de esta propiedad termodinámica, dos casos deben de ser considerados: transiciones alquímicas, y las transiciones indexadas por una reacción coordinada.

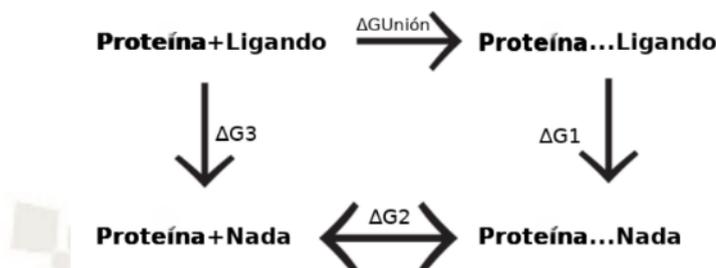


Figura 1.11: Ciclo termodinámico del Cálculo de la Energía libre de Gibbs aplicada a la Interacción Proteína-Ligando. Donde ΔG_1 es la Energía libre de solvatación, ΔG_2 Energía libre de acomplejamiento

Las transiciones alquímicas hace referencia al hecho de que la naturaleza de las partículas puede ser manipulada por cambios en los parámetros que describen las interacciones moleculares. Para un valor dado del parámetro de acoplamiento λ , el sistema es descrito por un operador Hamiltoniano (H). Un estado de transición alquímico transforma a las molécula de $\lambda=0$ al estado $\lambda=1$.

Uno de los métodos más empleados en el cálculo de energía de interacción entre una proteína y un ligando es el Radio de Aceptación de Bennet (BAR). Este método calcula las diferencias de energía potencial de dos estados en ambas direcciones para obtener estimaciones de energía libre transformando dos tipos de interacciones no enlazantes, las interacciones de Coulomb y las de Van der Waals. Esta transformación está determinada por una función de desacoplamiento, la cual indica el nivel de los cambios que han tomado lugar entre los estados .

1.5.7. Mecánica Cuántica

La mecánica cuántica está basada en el estudio de la composición de las moléculas, formadas por un núcleo y electrones; en donde se determina fundamentalmente el movimiento electrónico bajo la influencia de campos electromagnéticos ejercido por las cargas nucleares o electrónicas. Los cimientos de la física moderna se basan en los métodos mecánico cuanticos ab initio, semiempíricos y la Teoría Funcional de la Densidad.

El principal uso de cálculos *ab initio* está dado en el cálculo de geometrías, energías, frecuencias vibracionales, espectros, y propiedades relacionadas con la distribución electrónica. Este tipo de cálculos poseen aplicaciones teórico prácticos como las interacciones enzima sustrato, reacciones de equilibrio y espectroscopia.

Los métodos semi empíricos se basan en cálculos *ab initio*, pero sin las consideraciones de rigurosidad al momento de ejecutar los cálculos reduciendo el número de integrales que deben de ser calculadas. Dentro de los cuales se describe su uso para la optimización geometría de las moléculas, de una manera mucho más rápida con una precisión tolerable; pero con una precisión energética menor a comparación que los otros métodos.

La Teoría Funcional de la Densidad está basada en los teoremas de Hohenberg-Khong, los cuales describen propiedades de estado fundamental de los átomos o una molécula determinada por su función de la densidad electrónica. Existen diversas propiedades que pueden analizadas utilizando la Teoría Funcional de la Densidad como la electronegatividad, el potencial químico, la dureza y blandura y la función de Fukui.

Las geometrías moleculares son muy importantes en el diseño de nuevos materiales, y particularmente el diseño de nuevos fármacos. Esta optimización geométrica está referida a la definición de las distancias de enlaces, los ángulos entre átomos, y los ángulos formados por los diedros¹²².

1.5.7.1. Función de Fukui

La función de Fukui permite el análisis molecular de la reactividad local, y está relacionada al estudio de los orbitales de frontera de la densidad electrónica que juegan un rol importante en la selectividad química. La Función de Fukui explica esto en términos de alta energía requerida para interpretar el gobierno de ataques nucleofílicos y electrofílicos¹²³. Esta función está determinada de tres formas: f^+ que es asociada con el orbital molecular de menor energía desocupado (Lowest Unoccupied Molecular Orbital-LUMO), y mide la reactividad con un agente donador, f^- que está asociada con el orbital molecular ocupado de mayor energía (Highest Occupied Molecular Orbital - HOMO), y mide la reactividad hacia un agente aceptor, y el promedio o f^0 que mide la actividad hacia un radical¹²⁴.

1.5.8. Acoplamiento Molecular - Docking

Uno de los más grandes retos de la química computacional y de la bioinformática es predecir la afinidad de unión de pequeñas moléculas a macromoléculas ¹²⁵. El acoplamiento molecular – docking es una herramienta poderosa para la predicción teórica de la conformación óptima y la orientación de pequeñas moléculas dentro de los sitios activos de una proteína. Las posiciones obtenidas pueden ser usadas para la estimación de energías de unión, las cuales indican los efectos inhibitorios del diseño, y por otro lado puede ser utilizado para el diseño *in silico* de fármacos ¹²⁶.

El acoplamiento molecular consta de dos pasos cruciales mutuamente interrelacionados: la búsqueda del algoritmo, la cual es dirigida a identificar la conformación y orientación de un ligando en un sitio activo, y la segunda es la función de puntuación o scoring, la cual es utilizada para evaluar la energía del ligando en la posición del sitio activo. La energía de unión estimada debe ser subsecuentemente usada para la predicción cualitativa de la afinidad del ligando al sitio activo del objetivo dado (usualmente una proteína) ¹²⁷. Por otro lado, la fidelidad de esta predicción depende críticamente de los primeros pasos, que son la habilidad del algoritmo de acoplamiento de identificar (y subsecuentemente) y de situar al ligando correctamente ¹²⁸. Una función de puntuación típica consiste en términos de intra e intermoleculares, donde el último representa la enumeración de la función de puntuación con mayor demanda computacional ¹²⁹. Basado en el cambio conformacional del ligando y de la proteína, se observan dos categorías de los procesos de docking que son utilizadas:

- Docking rígido: en este tipo de acoplamiento, la proteína es considerada como rígida mientras que el ligando es permitido de cambiar de conformación y orientación para evaluar la posición de unión y su afinidad. El ligando produce todas las traslaciones y rotaciones posibles, alteraciones factibles y establecimiento de la mínima energía de unión en la cavidad de la proteína.
- Docking flexible: también conocido como acoplamiento suave donde ambos, la proteína y el ligando se les permite una flexibilidad conformacional para producir mejores interacciones proteína ligando ¹³⁰.

Capítulo 2

Métodos y Detalles Computacionales

2.1. Detalles Computacionales

2.1.1. Hardware

- Workstation con 64 GB de memoria RAM y 3 discos duros de 1, 4 y 6 TB.
- 16 Procesadores Intel R Core™ i7-5960X CPU @ 3.00GHz
- 1 tarjeta Gráfica NVIDIA GeForce GTX 1080

2.1.2. Software

▪ Programas

- **UCSF Chimera 1.1.2** ¹³¹ (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>): Es un programa dedicado a la visualización de moléculas orgánicas, desde moléculas pequeñas hasta estructuras macromoleculares como proteínas, ADN, ARN, péptidos y moléculas inorgánicas. Además es capaz de realizar análisis estructural como superficies hidrofóbicas, interacciones de puentes de hidrógeno y análisis de la superficie de potencial electrostático utilizando APBS ¹³² y PBD2PQR ^{133,134}.
- **MOLDEN-5.7** ¹³⁵ (<http://www.cmbi.ru.nl/molden/>): Visualizador de moléculas a escala atómica y electrónica, siendo capaz de visualizar orbitales mole-

culares y Potencial Electrostático. Este programa fue diseñado para el análisis de estructuras obtenidas tras optimizaciones cuánticas, debido a que posee el soporte de análisis de datos de archivos obtenidos en Gaussian y deMon2k.

- **LigPlot+**¹³⁶ (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>): Visualizador capaz de analizar las interacciones de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas entre macromoléculas, como proteínas y ligandos pequeños como fármacos. El reconocimiento de los puentes de hidrógeno está mediado por las distancias más cortas entre los átomos del ligando o fármaco con el receptor o proteína.
- **GNUPLOT-5.0**¹³⁷ (<http://www.gnuplot.info/>): Programa diseñado para la visualización de funciones matemáticas y de datos en general. Este software es ampliamente utilizado en el análisis de datos obtenidos tras una dinámica molecular.
- **Autodocktools 1.5.6**¹³⁸ (<http://autodock.scripps.edu/>): Visualizador y ejecutor de los programas Autodock y Autogrid, con los que funciona de forma integrada.
- **Hex-8.0**^{139,140} (<http://hex.loria.fr/>): Programa diseñado para realizar predicciones de acoplamiento entre dos macromoléculas, o una macromolécula y un ligando pequeño. Los algoritmos utilizados en Hex-8 consideran la totalidad del sistema como cuerpos rígidos, haciendo su predicción muy eficiente para moléculas de gran tamaño, pero de menor tamaño carecen de exactitud.
- **Autodock 4.2.6 y Autogrid 4.2.6**¹³⁸ (<http://autodock.scripps.edu/>): Conjunto de programas diseñados para efectuar acoplamientos entre una macromolécula y un ligando pequeño. Este software fue diseñado para efectuarse por pasos. El primero de ellos es el Autogrid que identifica porciones de la molécula receptora y la va separando por cuadrículas, y establece los parámetros de las mismas. La segunda parte está establecida por el Autodock, el cual ejerce el acoplamiento basado en la información anterior, de forma en la que el ligando es libre de realizar torsiones o rotaciones con el fin de obtener la mejor posición para su interacción.
- **GROMACS 2016.3**^{141,142} (<http://autodock.scripps.edu/>): Este progra-

ma fue diseñado para realizar simulaciones de dinámica molecular y minimización de energía. Se basa en el uso de la mecánica molecular para llevar a cabo estas simulaciones, con lo que es capaz de analizar propiedades termodinámicas en el sistema de trabajo. Utiliza un conjunto de campos de fuerza, que proporcionan la información energética de las moléculas, tanto enlazante como no enlazante; así como información topológica como la posición de los átomos, la medida de las distancias de enlaces, la medida de ángulos y sus diedros.

- **Gaussian09** ¹⁴³ (<http://gaussian.com/>): Programa diseñado para realizar análisis de mecánica cuántica utilizando métodos ab initio, semiempíricos, y de Teoría Funcional de la Densidad. Este programa permite obtener optimizaciones geométricas de moléculas, frecuencias vibracionales, y cálculos de energía.
- **GaussView 5.0** ¹⁴⁴ (<http://gaussian.com/gaussview6/>): Programa dedicado a la visualización de moléculas que van a ser utilizadas para su posterior análisis mecánico cuántico. Además posee la capacidad de realizar cálculos de potencial electrostático, la densidad electrónica y los orbitales moleculares ocupados de mayor energía (HOMO) y el orbital molecular desocupado de menor energía (LUMO).
- **deMon2k 4.3.6** ¹⁴⁵ (<http://www.demon-software.com>): Programa dedicado a realizar cálculos de Mecánica Cuántica y Mecánica Molecular. El uso de la Mecánica Cuántica en este programa se basa en la Teoría Funcional de la Densidad. Se pueden calcular la energía, optimizaciones geométricas, propiedades termodinámicas y es capaz de soportar archivos para su visualización.
- **fpocket 2.0** ¹⁴⁶ (<http://fpocket.sourceforge.net/>): Programa dedicado a la detección de cavidades en la superficie de una proteína considerando algoritmos de Teselación de Voronoi e interacción de α -esferas con la misma, y además considera la superficie accesible y el volumen de cada una de las cavidades elegidas.

▪ Servidores Web

- **MolProbity** ¹⁴⁷ (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>): Servidor dedicado a la visualización de los diagramas de Ramachandran y su posterior análisis;

como herramienta de validación de estructuras tanto para su uso en Cristalografía de Rayos X, así como en el trabajo de simulación de proteínas.

- **OPLS-AA topology generator**¹⁴⁸(<http://erg.biophys.msu.ru>): Servidor dedicado a la parametrización de campos de fuerza OPLS-AA, en las que se coloca el archivo *.pdb, que posee la información espacial de los átomos en una molécula, y la compara con sus base de datos, identifica de qué molécula se trata, y escribe la información necesaria para ser introducida en el archivo aminoacids.rpt dentro del campo de fuerza.
 - **PDBsum**¹⁴⁹(www.ebi.ac.uk/pdbsum): Servidor dedicado al análisis de interacción ligando-receptor, y de estructura terciaria y secundaria de proteínas.
- **Bases de datos**
- **Protein Data Bank-PDB**¹⁵⁰(<https://www.rcsb.org/>): Servidor utilizado como base de datos de estructuras tridimensionales de moléculas orgánicas e inorgánicas, sobre todo proteínas, ADN, ARN, virus y anticuerpos; que son obtenidas por los métodos: Cristalografía de Rayos X, Criomicroscopía electrónica, y Resonancia Magnética Nuclear. En esta base de datos se describen como fueron obtenidas las estructuras así como sus características de unión a ligandos específicos e información propia de Biología Estructural.
 - **Pubchem**¹⁵¹(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) : Base de datos donde se ubican las estructuras moleculares de gran cantidad de fármacos, moléculas de interés biológica e industrial. En esta se encuentra la información de cada una de ellas, de estudio relacionados, y sus características fisicoquímicas.

2.2. Metodología

2.2.1. Obtención, Optimización y Análisis de la proteína EgFABP1

La estructura que de la proteína EgFABP1 se descargó de la base de datos PDB con la extensión *.pdb, y se consideró las características cristalográficas, como la presencia

de ligandos y/o solvente, la completitud de la estructura, así como la presencia de cambios estructurales en alguno de los aminoácidos. La optimización molecular se realizó utilizando el programa Gromacs (Véase Anexos - Comandos y Herramientas de Gromacs), donde se definió el sistema de trabajo, en donde se consideró la presencia explícita de moléculas de agua de modelo SPC y la presencia de iones. El sistema neutralizado y conformado por proteína - agua - iones fue minimizado con 10000 pasos utilizando el algoritmo Steepest-Descent. Luego se llevó a cabo una dinámica molecular considerándose las condiciones periódicas de contorno, en colectivo canónico (NVT), a una temperatura de 36,5°C ejecutada por el algoritmo Noose-Hover; utilizando el campo de fuerza OPLS AA y con un tiempo de ejecución de 200 ns. Posteriormente para obtener una estructura mucho más estable y de mejor calidad estructural, se llevó a cabo una dinámica molecular de 50 ns en colectivo isotérmico - isobárico (NPT), a una temperatura de 36,5°C utilizando el termostato Berendsen, especificando la presión con el valor de tau-p de 1.0.

El análisis de cavidades de la proteína EgFABP1 se llevó a cabo utilizando el programa fPocket 2.0, para lo que se consideró la estructura obtenida luego de la dinámica molecular, este análisis permitió evaluar las regiones de la superficie de la proteína donde es probable que se acoplen los ligandos de acuerdo a las características estructurales y energéticas de los aminoácidos que conforman la cavidad de interés.

2.2.2. Obtención, optimización y análisis de los Ácidos Grasos Poliinsaturados

La estructura de los ácidos grasos para este estudio se obtuvieron de acuerdo a los resultados obtenidos en estudios previos realizados por la Adriana Esteves et al.⁸, donde se determinó la afinidad de la proteína EgFABP1 por los ácidos grasos poliinsaturados ω -6 (ácido linoleico y ácido araquidónico). De acuerdo a ello se decidió continuar el estudio de interacción, considerando a las tres moléculas ω -3 (α -linolénico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA)) y solamente una de las moléculas de ω -6 (ácido araquidónico (ARA)). Estas estructuras fueron descargadas de la base de datos PubChem, como se observa en la Figura 2.1.

La estructura se descargó con la extensión *.sdf (Propia de Pubchem), se transformó a extensión *.xyz en el programa Gaussview, y se convirtió a extensión *.inp en el programa

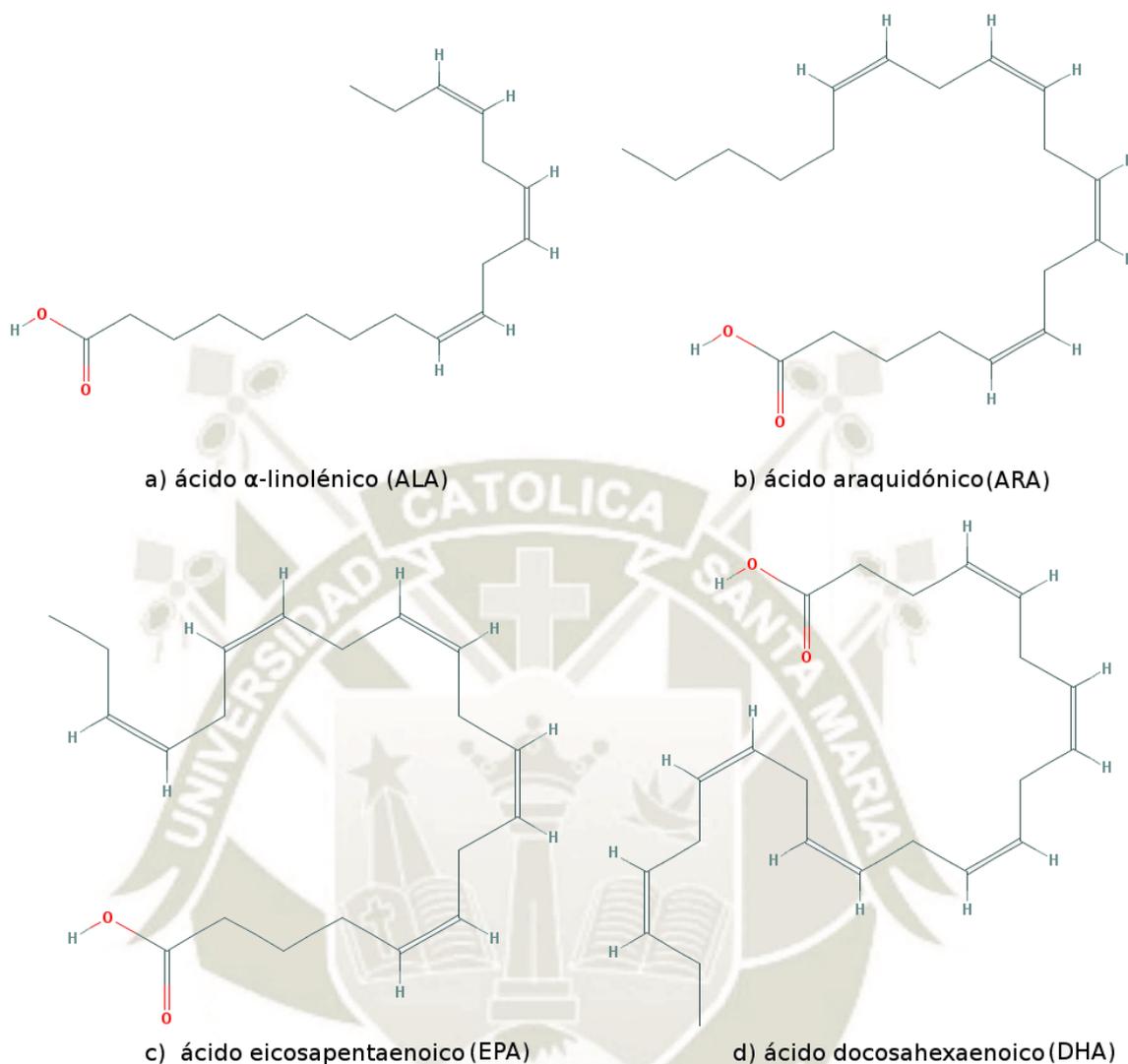


Figura 2.1: Moléculas de AGPI descargados de la base de datos Pubchem.

Molden. Con el archivo *.inp se pudo realizar la optimización geométrica con mecánica cuántica en el programa deMon2k, con la funcional B3LYP y la base DZVP, utilizando la Teoría Funcional de la Densidad. En el mismo archivo se realizó el análisis de la función de Fukui, y el análisis de cargas de Hirshfeld (Véase Anexos).

Luego de la optimización cuántica, se obtuvo la geometría molecular más estable por cada molécula. Para su reconocimiento en Gromacs se escribió los campos de fuerza para llevar a cabo la dinámica y la optimización molecular con la ayuda del servidor de generación de Automática de topologías OPLS-AA. Con ello, se pudo introducir en el campo de fuerza OPLS-AA en Gromacs la descripción de los ácidos grasos poliinsaturados, con

la corrección de las cargas atómicas, provistas por la optimización cuántica. Para ello es necesario modificar los archivos `ffbonded.itp` y `aminoacid.rtp` (Véase Anexos); en los que se centra la información necesaria para la ejecución del programa Gromacs. La optimización en mecánica molecular de los ácidos grasos poliinsaturados se ejecutó de la siguiente forma: primero, una minimización energética utilizando el algoritmo Steepest Descent descent de 10000 pasos, luego se realizó la dinámica molecular de cada una, utilizando el colectivo canónico NVT (número de átomos, volumen y temperatura constante), a una temperatura de 36.5 °C, utilizando el algoritmo de termostato Nose-Hoover.

2.2.3. Diseño y construcción de nanotransportador

Los criterios para el diseño del nanotransportador se basaron en las interacciones naturales que los ácidos grasos efectúan al ingresar a un organismo, por lo general suelen hacerlo unidos a moléculas de glicerol formando triglicéridos, diglicéridos o monoglicéridos. Al unirse con este tipo de biomoléculas aumentan su solubilidad, su estabilidad y disminuyen totalmente algún rastro de inmunogenicidad. Actualmente se propone el uso de moléculas de poliglicerol como la forma más eficiente en el uso de nanotransportadores. Se siguió el diseño propuesto por Alexander Sunders et al.¹⁵², en la que sugiere un método de obtención de poligliceroles ramificados e hiperramificados, y las consideraciones propuestas por Holger Frey et al.¹⁵³, con lo que se consiguió construir el core de poliglicerol, como se observa en la Figura 2.2; y de acuerdo a los resultados de Gabriela Alvite et al.⁵, donde sugiere que la proteína EgFABP1 es capaz de interactuar hasta un número máximo de 2 moléculas de ácidos grasos al mismo tiempo. Para su construcción se llevó a cabo en el programa GaussView, y se guardó en extensión `.*gjf`. Además, se adiciono a la construcción del nanotransportador moléculas de fármacos ampliamente utilizados como el albendazol (ABZ), el mebendazol (MBZ) y el praziquantel (PRZ) que fueron obtenidas de la base de datos PubChem; esto con el objetivo de observar las interacciones entre el nanotransportador y los fármacos como se observa en la Figura 2.3.

La optimización cuántica de las macromoléculas de nanotransportador se efectuó utilizando el método semiempírico PM6 en el software Gaussian 09 (Véase Anexos). Se obtuvo la geometría más óptima del sistema, así como también se analizó las cargas de Hirshfeld que fueron necesarias para la construcción posterior del campo de fuerza de cada uno de

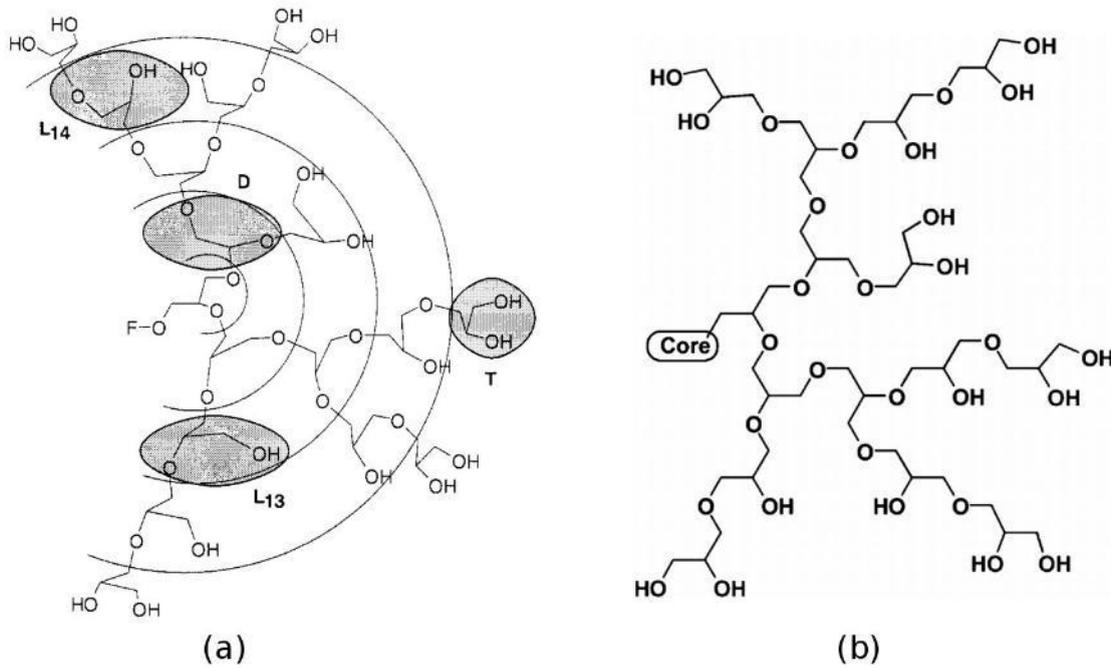


Figura 2.2: Diseños de poliglicerol hiperramificado utilizado como nanotransportador. (a) Resultados obtenidos por Alexander Sunders et al.¹⁵², (b) Resultados obtenidos por Holger Frey et al.¹⁵³.

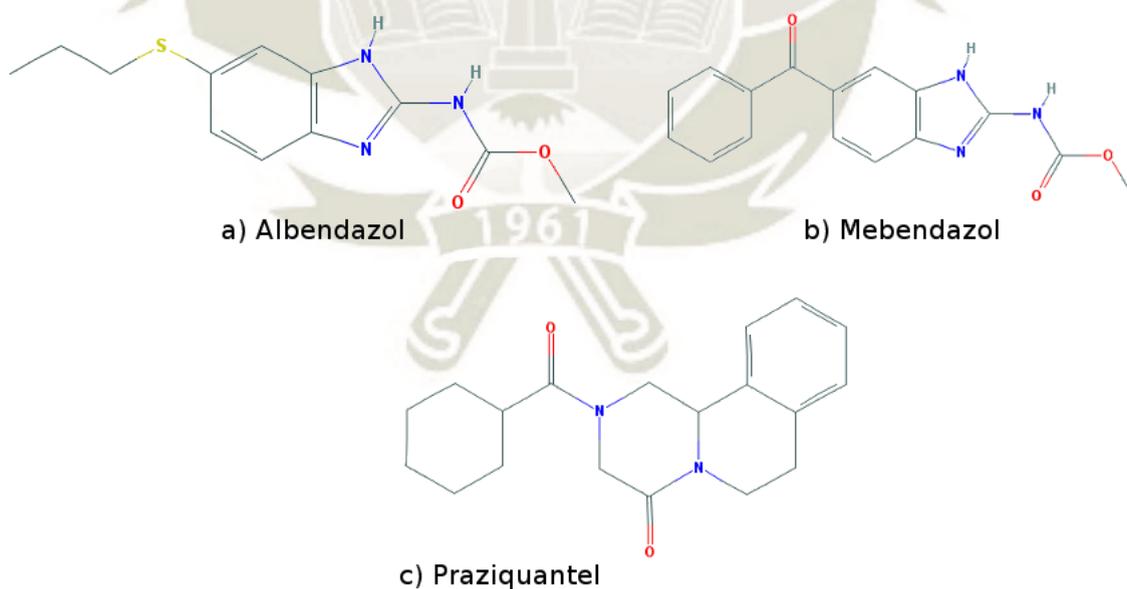


Figura 2.3: Estructura molecular de los fármacos Benzimidazoles utilizados en el tratamiento de la Echinococcosis.

los nanotransportadores.

Se declaró los campos de fuerza que describen al nanotransportador utilizando el servidor de generación de topologías OPLS AA, en la que se corrigió las cargas atómicas de cada una de ellas utilizando las obtenidas en la optimización cuántica. Se llevó a cabo una optimización molecular utilizando un colectivo canónico NVT en un tiempo de 100 ns, a una temperatura de 36.5°C empleando el termostato Nose-Hoover. Se realizó la dinámica molecular del sistema, definiendo el área de trabajo, o una caja, donde se le adicione moléculas de agua de tipo de punto simple SPC.

2.2.4. Acoplamiento Molecular

2.2.4.1. Acoplamiento Molecular AGPI – Proteína EgFABP1

El acoplamiento molecular se llevó a cabo utilizando el programa Autodock, para lo cual se convirtió los archivos de los ligando de *.pdb a *.pdbqt, donde se agrega cargas de Kollman, se identifican los hidrógenos no polares y se eliminan los demás; luego se identifican el número de torsiones posibles en la molécula ligando. Enseguida se abrió el archivo *.pdb de la proteína receptora que permanecerá en estado rígido, se le adicionan cargas de Kollman, se hace emerger los hidrógenos no polares, y se eliminan los átomos de agua y iones presentes tras la dinámica molecular. Se ejecuta el programa Autogrid, con el que se identificó el área o cuadrícula en el receptor, como se observa en la Figura 2.4, se seleccionó a la macromolécula (la proteína) y el ligando(molécula de Ácido Graso) y se guardó las especificaciones en un archivo *.gpf, con ello se puede iniciar el cálculo de las especificaciones de cuadrícula ejecutando el script de Autogrid. Con el resultado se puede ejecutar Autodock, en donde se elige el número de repeticiones basado en el algoritmo genético Lamarckiano, en este caso de 100 interacciones y el número máximo de evaluaciones de 250000, y luego se guarda el archivo *.dpf. Luego de la ejecución del programa Autodock, se obtuvo el archivo de extensión *.dlg, donde se concentra la información de cada una de las interacciones y las propiedades termodinámicas como la energía libre de Gibbs por cada uno de los acoplamientos.

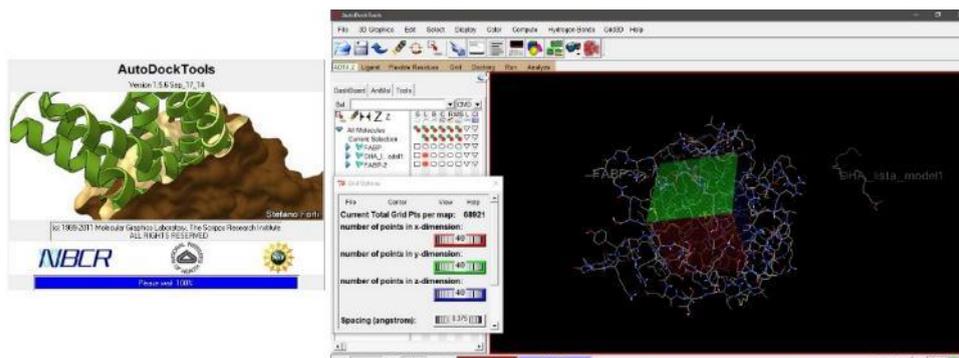


Figura 2.4: Acoplamiento molecular llevado a cabo en el programa Autodock. Se puede observar el interfaz gráfico de Autodocktools, de donde se observa la cuadrícula en forma de cubo, donde se selecciona el área o región de acoplamiento, y el ligando más pequeño.

2.2.4.2. Acoplamiento Molecular Nanotransportador – EgFABP1

El acoplamiento molecular se llevó a cabo utilizando el software Hex 8.0, como se observa en la Figura 2.5; debido a que este programa es dedicado a la unión de macromoléculas en estado rígido - rígido. Se determinó 50000 soluciones posibles. Los archivos de receptor (la proteína EgFABP1) y ligando (Nanotransportador) se abrieron en formato *.pdb, y el resultado del mejor acoplamiento se obtuvo en formato *.pdb. Se realizó el acoplamiento molecular en cada uno de los casos de nanotransportador cargado con fármacos, realizando una minimización de energética en el propio programa. Se obtuvieron los resultados del acoplamiento en formato *.sum, y el mejor modelo de interacción en *.pdb.

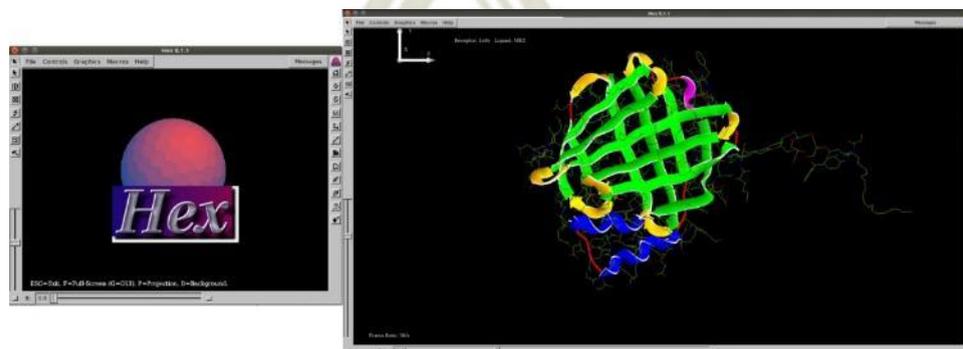
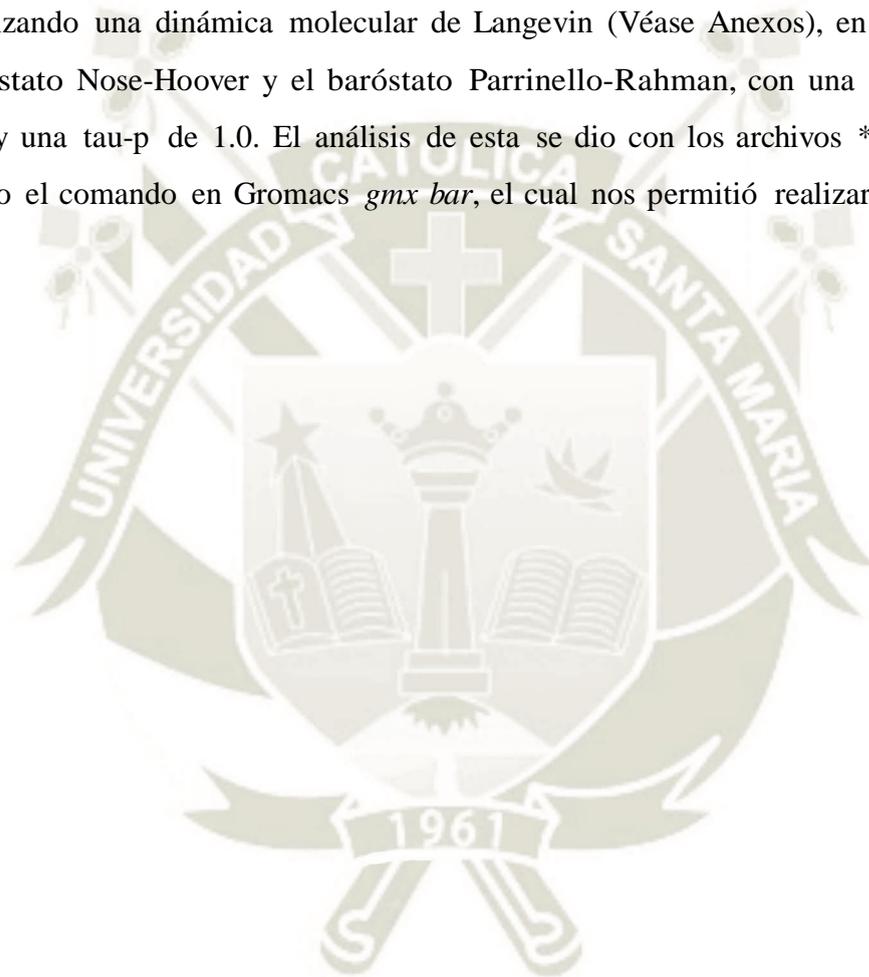


Figura 2.5: Acoplamiento molecular entre Nanotransportador y la proteína EgFABP1 utilizando el programa Hex. Se observa la interacción entre la proteína EgFABP1 y el Nanotransportador sin fármacos.

2.2.4.3. Análisis de Energía de Interacción

Se realizó una dinámica molecular del sistema (Proteína - Ligando) en un colectivo NVT, en 50 ns utilizando el algoritmo de termostato Nose-Hoover a una temperatura de 36.5°C con el campo de fuerza OPLS-AA en Gromacs. Luego se realizó el análisis de la energía libre de Gibbs por el método propuesto por BAR (Bennett Acceptance Ratio) de donde se ejecutó 41 cálculos consecutivos de colectivo isotérmico-isobárico de 1 ns cada uno, utilizando una dinámica molecular de Langevin (Véase Anexos), en el cual se utilizó el termostato Nose-Hoover y el baróstato Parrinello-Rahman, con una temperatura de 36.5°C, y una tau-p de 1.0. El análisis de esta se dio con los archivos *.xvg, y con ello se ejecuto el comando en Gromacs *gmx bar*, el cual nos permitió realizar el análisis de la energía libre.



Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1. Obtención y Optimización de la Proteína Eg-FABP1

La obtención de la proteína se realizó en el PDB (Protein Data Bank), de donde se descargó la proteína EgFABP1 (PDB ID: 1O8V) de 1.6 Å de resolución, obtenida por Cristalografía de Rayos X. De acuerdo a la resolución de la proteína se estima la alta fidelidad de los resultados obtenidos en el método de obtención de datos, de lo cual se observó que la estructura se mantenía completa, como lo demuestra la Figura 3.1.

The screenshot displays the RCSB PDB website interface for entry 1O8V. The top navigation bar includes options like 'Deposit', 'Search', 'Visualize', 'Analyze', 'Download', 'Learn', and 'More'. The main header features the PDB logo and a search bar. Below the header, there are tabs for 'Structure Summary', '3D View', 'Annotations', 'Sequence', 'Sequence Similarity', 'Structure Similarity', and 'Experiment'. The entry page for 1O8V is shown, including a 3D ribbon diagram of the protein structure. Key information provided includes the title 'The crystal structure of Echinococcus granulosus fatty-acid-binding protein 1', DOI: 10.2210/pdb1O8V/pdb, classification as 'LIPID BINDING PROTEIN', organism 'Echinococcus granulosus', and expression system 'Escherichia coli BL21(DE3)'. It also lists the deposition and release dates, authors (Jakobsson, E., Alvite, G., Berofors, T., Esteves, A., Kleywegt, G.J.), and experimental data such as X-ray diffraction method, 1.6 Å resolution, and R-values. A wwPDB Validation chart shows metrics like Clashscore, Ramachandran outliers (1.7%), and RSZR outliers (1.5%). A literature section includes a citation to a 2003 Biochim. Biophys. Acta paper.

Figura 3.1: Estructura de la Proteína EgFABP1 (PDB ID: 1O8V) en la base de datos PDB.

De los resultados obtenidos, en la dinámica molecular se observa la estabilidad molecular en la Diferencia Media Cuadrática (RMSD). En la Figura 3.2, se observa la estabilidad alcanzada a 200 ns en colectivo NVT, debido a las bajas vibraciones observadas a partir de los 50 ns, con un valor promedio de 0.05nm.

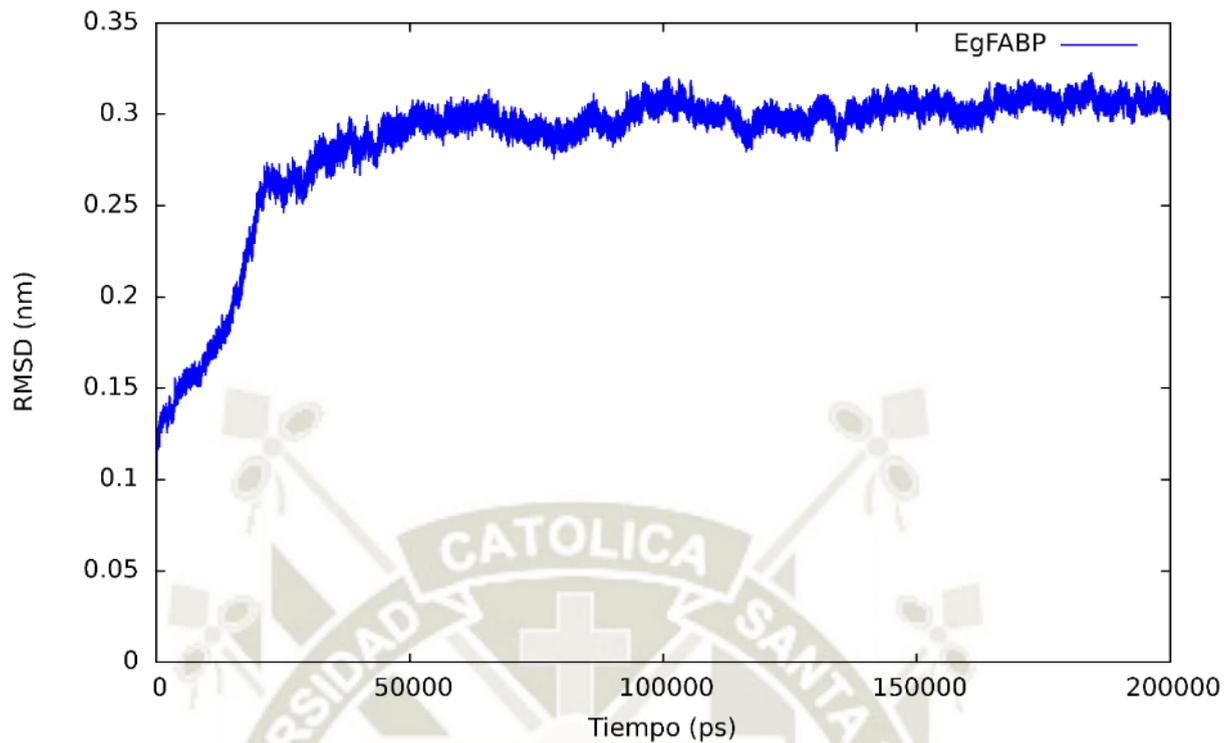


Figura 3.2: RMSD de la proteína EgFABP1 a 200 ns en colectivo NVT.

Del sistema obtenido, se refinó la estructura con el objetivo de obtener la mejor estabilidad de la proteína, es por ello que se desarrolló una dinámica molecular de 50 ns en colectivo NPT, donde se alcanzó la estabilidad de la proteína a los 20 ns, y en donde se redujo la variación de la estructura a 0,025 nm en promedio, como se observa en la Figura 3.3. La estructura terciaria de la proteína EgFABP1 obtenida denotó una disminución de estructura secundaria (Deformación de láminas β y hélices α) tras las simulaciones de Dinámica Molecular (MD), como se observa en la Figura 3.4.

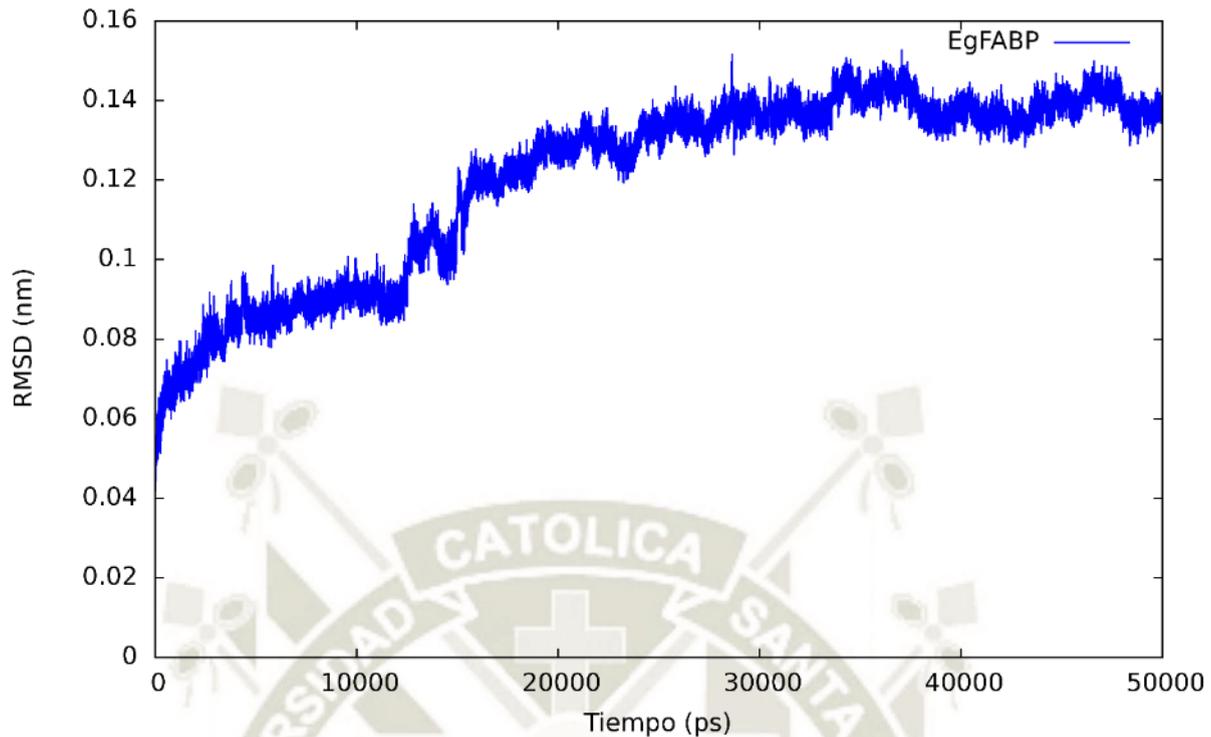


Figura 3.3: RMSD de la proteína EgFABP1 a 50 ns en colectivo NPT.

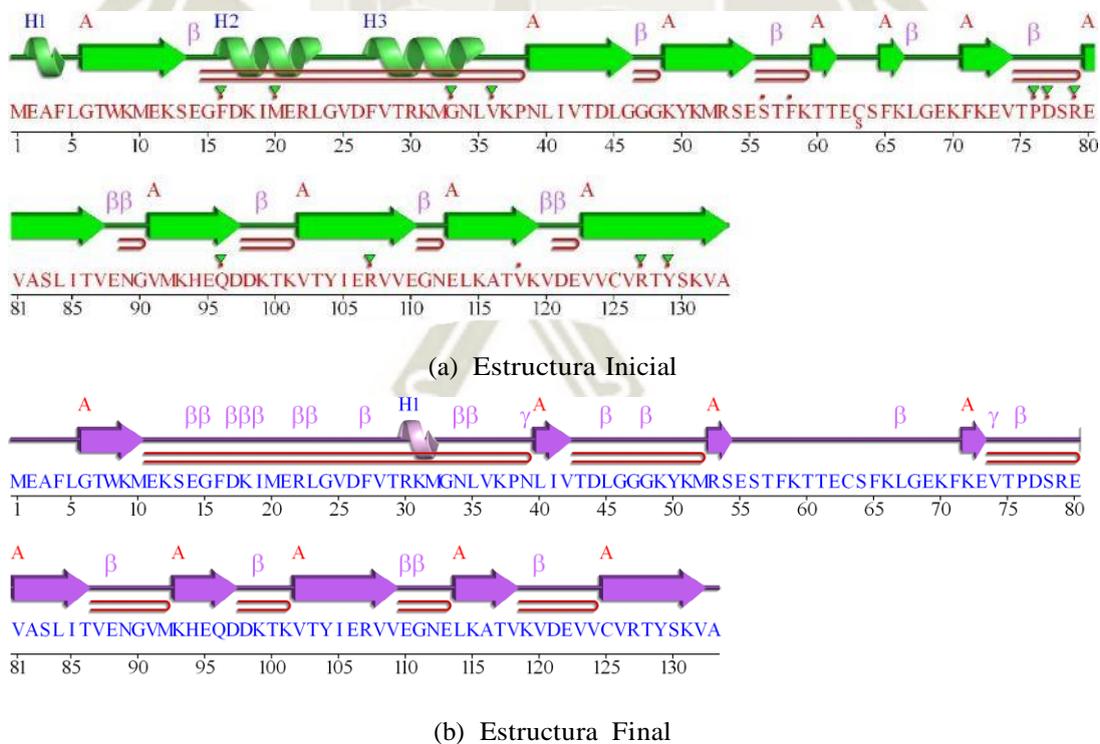


Figura 3.4: Diagrama de la estructura secundaria de la proteína EgFABP1. a) Estructura Inicial antes de Dinámica Molecular, b) Estructura Final luego de Dinámica Molecular.

El cálculo del Radio de giro de la proteína luego del desarrollo de los 50 ns en colectivo NPT, nos demostró el incremento de la estabilidad con una fluctuación promedio a partir de los 12 ns, con una variación de 0,0225 nm en promedio, como se observa en la Figura 3.5

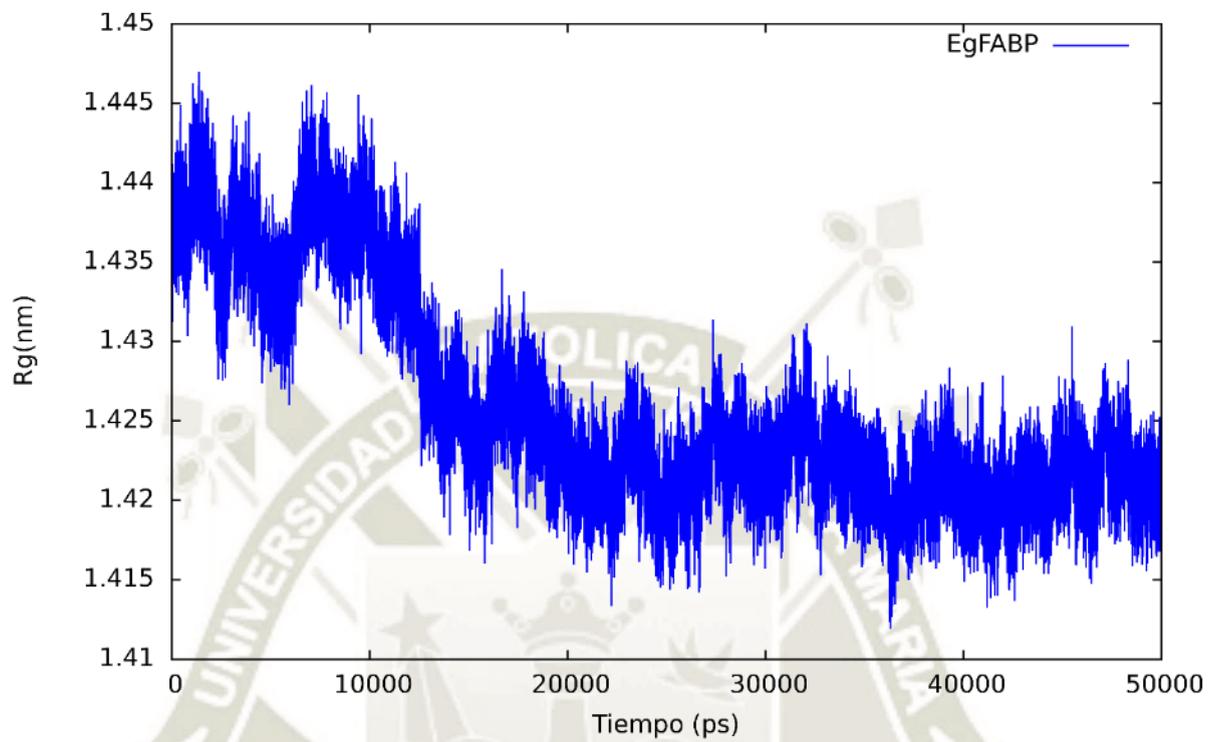
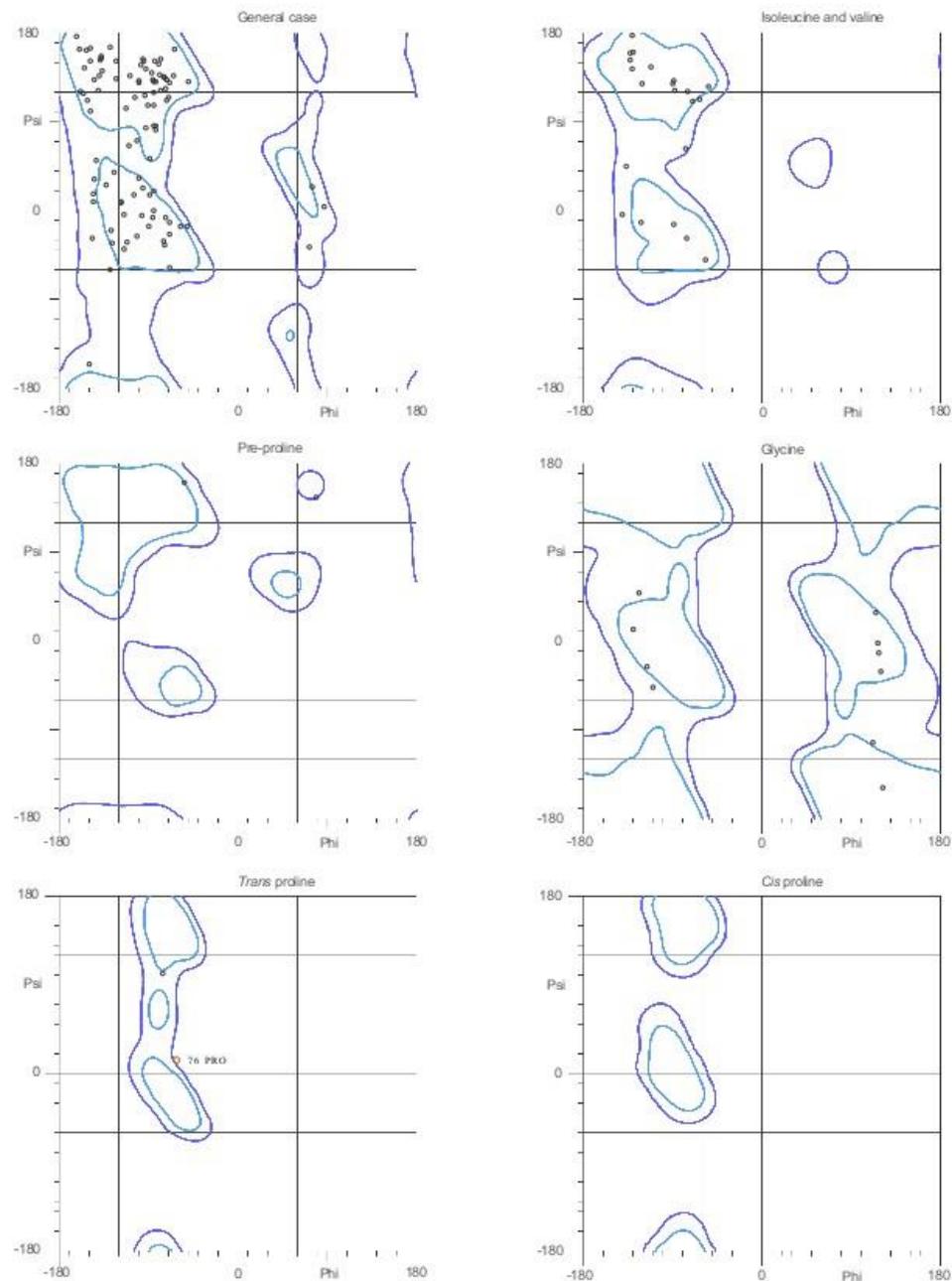


Figura 3.5: Radio de giro de la proteína EgFABP1 en colectivo NPT a 50 ns.

El análisis de la gráfica de Ramachandran, de la estructura promedio encontrada durante la mayor estabilidad estructural del RMSD, nos demostró que la validación estructural de la proteína EgFABP1 es alta, de donde se pudo observar que solamente uno de los aminoácidos estuvo fuera del área permitida (Pro76, que se encuentra en horquilla β); y que el 80.9% de los aminoácidos estuvieron en regiones favorecidas de torsión, mientras que el 99.2% de los mismos se encuentran en áreas permitidas, como se muestra en la Figura 3.6



80.9% (106/131) of all residues were in favored (98%) regions.

99.2% (130/131) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 1 outliers (phi, psi):

76 PRO (-62.8, 14.9)

Figura 3.6: Diagrama de Ramachandran de la estructura de la proteína EgFABP1.

La Fluctuaciones Cuadradas Medias (RMSF) por residuo de la proteína EgFABP1, demostró la alta tasa de fluctuación encontrada en los aminoácidos que se encontraban en la región media de la proteína, específicamente estos fueron los aminoácidos Phe65 (0,1251

nm), Leu67 (0,1624 nm) y Gly68 (0,1170 nm), probablemente por el carácter apolar de los aminoácidos fenilalanina y leucina. Además, como se observa en la Figura 3.7, los extremos de la proteína se mantuvieron constantes, sin registrar mayores fluctuaciones.

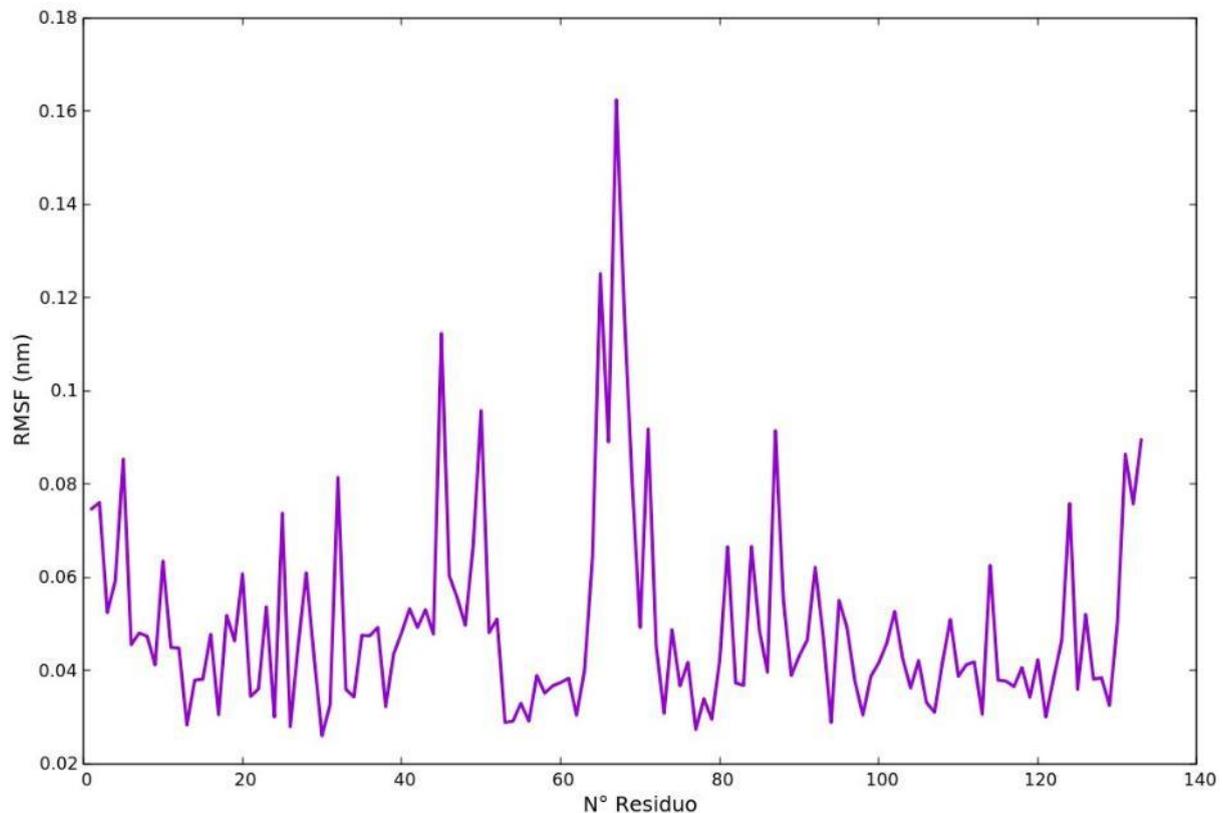


Figura 3.7: RMSF de la proteína EgFABP1 en colectivo NPT en 50 ns.

3.2. Análisis de cavidades de la Proteína EgFABP1

El análisis de la superficie de la proteína EgFABP1 nos demostró la existencia de cavidades o pockets, donde se evidenció la presencia de hasta 6 cavidades, de donde se encontró que la cavidad número 1 es la que presentó el mayor puntaje, presentando el mayor volumen, el mayor puntaje de hidrofobicidad y de drogabilidad, como se observa en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Valores del análisis de cavidades en la proteína EgFABP1

Cavidad	Puntuación	Puntuación de Drogabilidad	SASA Total	Volumen	Puntuación de Hidrofobicidad
1	40.302	0.818	396.256	967.227	32.706
2	24.781	0.430	84.772	243.157	29.385
3	21.591	0.133	113.711	227.726	19.400
4	18.537	0.025	202.062	511.730	4.250
5	10.618	0.006	152.471	376.809	6.000
6	8.831	0.014	225.896	421.412	21.000

Área de Superficie Accesible al Solvente - SASA (Å^2), Volumen (Å^3)

El análisis estructural de la proteína EgFABP1 y las cavidades propuestas demostraron, que el bolsillo o cavidad más grande se ubica cerca de los aminoácidos apolares Val42, Leu67, Leu45, Met52, Phe65, Phe71, Gly48, Gly46 y Gly68, polares Ser64, Tyr50, Cys63 y Thr43, aminoácidos ácidos Glu69 y Asp44 y aminoácidos básicos Lys54, Lys49, Lys66 y Lys72. Se observó además que todas las cavidades se encuentran cercanas unas con otras mientras que la cavidad 5 se encontró al otro extremo de la proteína, como se observa en la Figura 3.8.

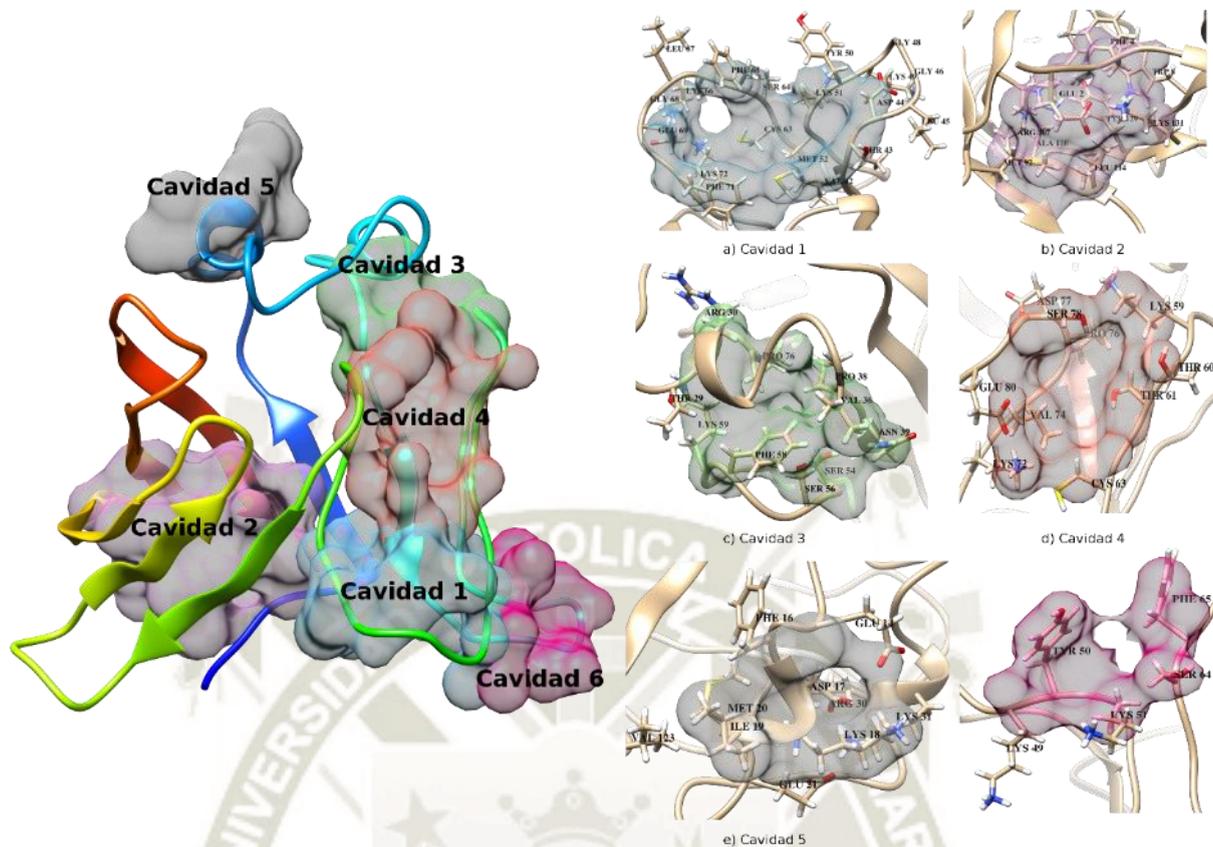


Figura 3.8: Cavidades de la superficie de la proteína EgFABP1 (a-c: Aminoácidos que conforman cada uno de las cavidades determinadas y su distribución).

En el trabajo realizado por Adraiana Esteves et al⁸ se observó la conformación de las cavidades propuestas en la misma posición encontrada en este estudio, como se observa en la Figura 3.9, por lo que se consideró que la presencia de cavidades en la superficie de la proteína EgFABP1 hace a la misma altamente drogable, y factible de ser considerada un blanco terapéutico.

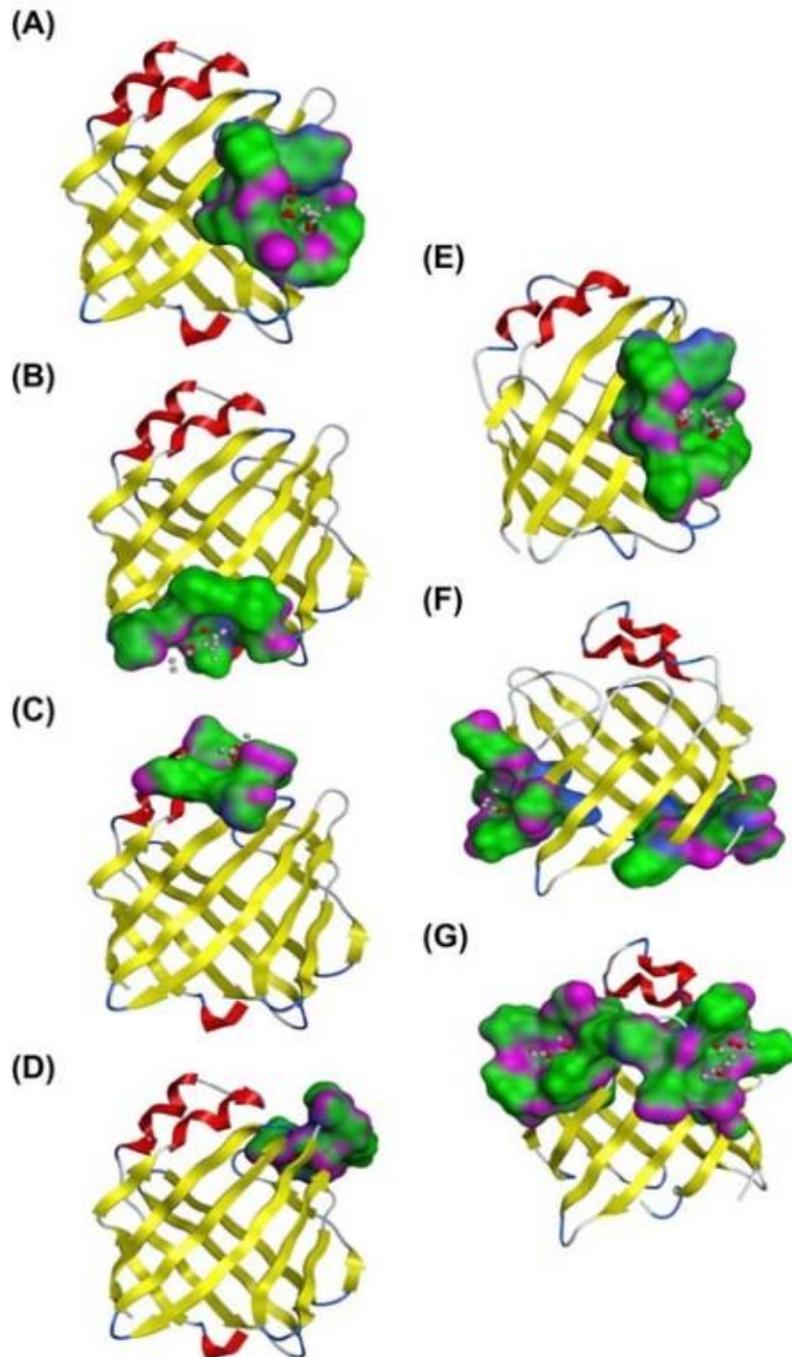


Figura 3.9: Cavidades encontradas en el estudio de Adriana Esteves⁸. Comparación de cavidades entre la proteína EgFABP1 (A-D), y la proteína EgFABP2 (E-G).

3.3. Optimización Cuántica de los Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPI) y Análisis de la Función de Fukui

Los ácidos grasos poliinsaturados, que fueron determinados para este estudio, se optimizaron con mecánica cuántica. Los resultados obtenidos de la optimización geométrica determinaron la estructura correcta de cada una de las moléculas, así como la obtención de la cargas de Hirshfeld.

El análisis de la Función de Fukui (f) determinó la capacidad electrónica de cada una de las moléculas de ácidos grasos poliinsaturados. Como se observa en la Tabla 3.2 los valores de la Función de Fukui le corresponde a los átomos de las moléculas descritas en la Figura 3.10, el mayor valor obtenido en f^+ en cada uno de ellos le corresponde a los grupos carboxilos, y en el caso de el Ácido eicosapentaenoico, se situó en el átomo 21, correspondiente a un carbono que forma un doble enlace, y de igual manera en f^- le corresponde a los átomos presentes en los dobles enlaces, de donde se deduce la alta capacidad de los átomos de carbono en grupo carboxilos para donar electrones, y de los átomos presentes en los dobles enlaces de aceptar.

Tabla 3.2: Función de Fukui de los átomos de los AGPI.

Molécula	F(HOMO)		F(LUMO)		F(Promedio)	
	Átomo	Valor	Átomo	Valor	Átomo	Valor
ALA	C10	0.114	C18	0.28	C18	0.141
ARA	C13	0.102	C20	0.233	C20	0.118
EPA	C36	0.065	C21	0.071	C9	0.062
DHA	C16	0.073	C22	0.242	C22	0.123

F(HOMO): Reactividad hacia un agente electrofílico, F(LUMO): Reactividad hacia un agente nucleofílico, F(Promedio): Reactividad hacia un agente radicalario.

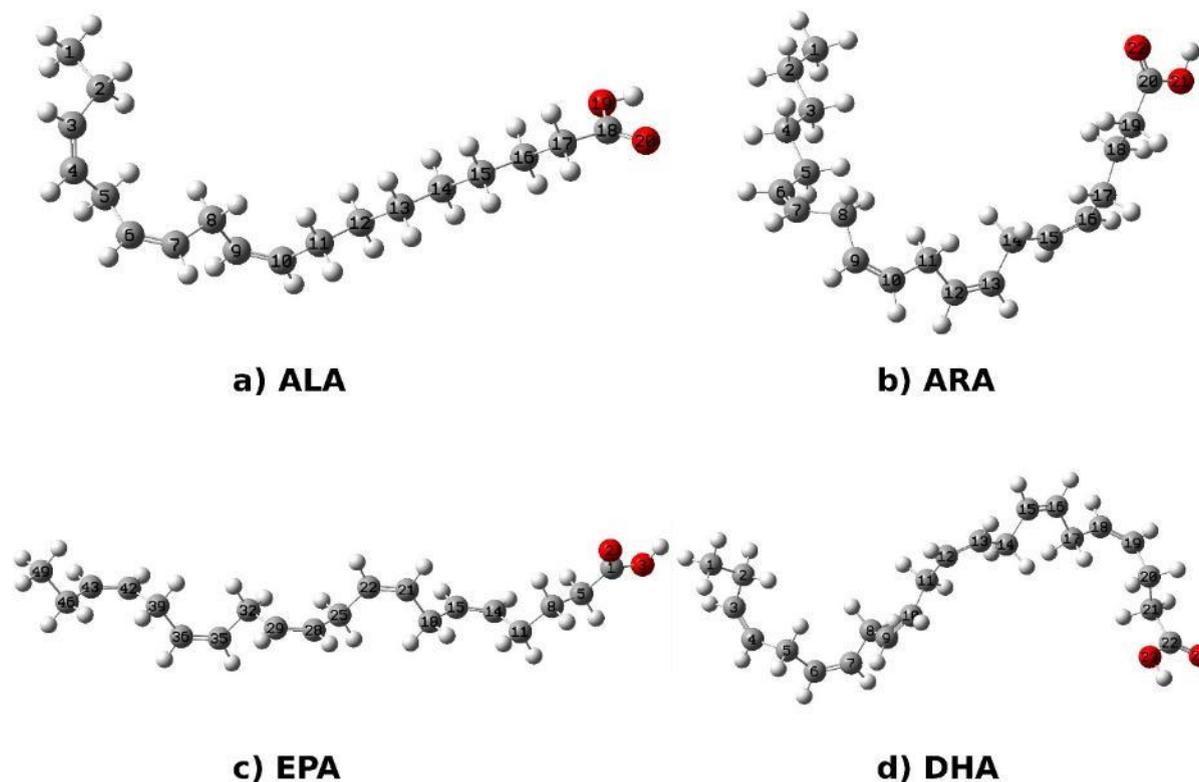


Figura 3.10: Estructura molecular optimizada de los AGPI.

3.4. Optimización Molecular de los Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPI)

La optimización molecular de los ácidos grasos poliinsaturados se realizó en colectivo NVT a 36,5°C y con el campo de fuerza OPLS AA en medio acuoso como se observa en la Figura 3.11. Se observó inestabilidad en el sistema acuoso en el que se llevó cabo como se observa en el análisis de RMSD de cada uno de ellos. Se denota la baja estabilidad de la estructura molecular del ácido α -linolénico (ALA) y el Ácido Araquidónico (ARA) interactuante con moléculas de agua, como se aprecia en el gráfico de RMSD en la Figura 3.12. El ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido Eicosapentaenoico (EPA) presenta una alta inestabilidad en la optimización en medio acuoso según el análisis de RMSD.

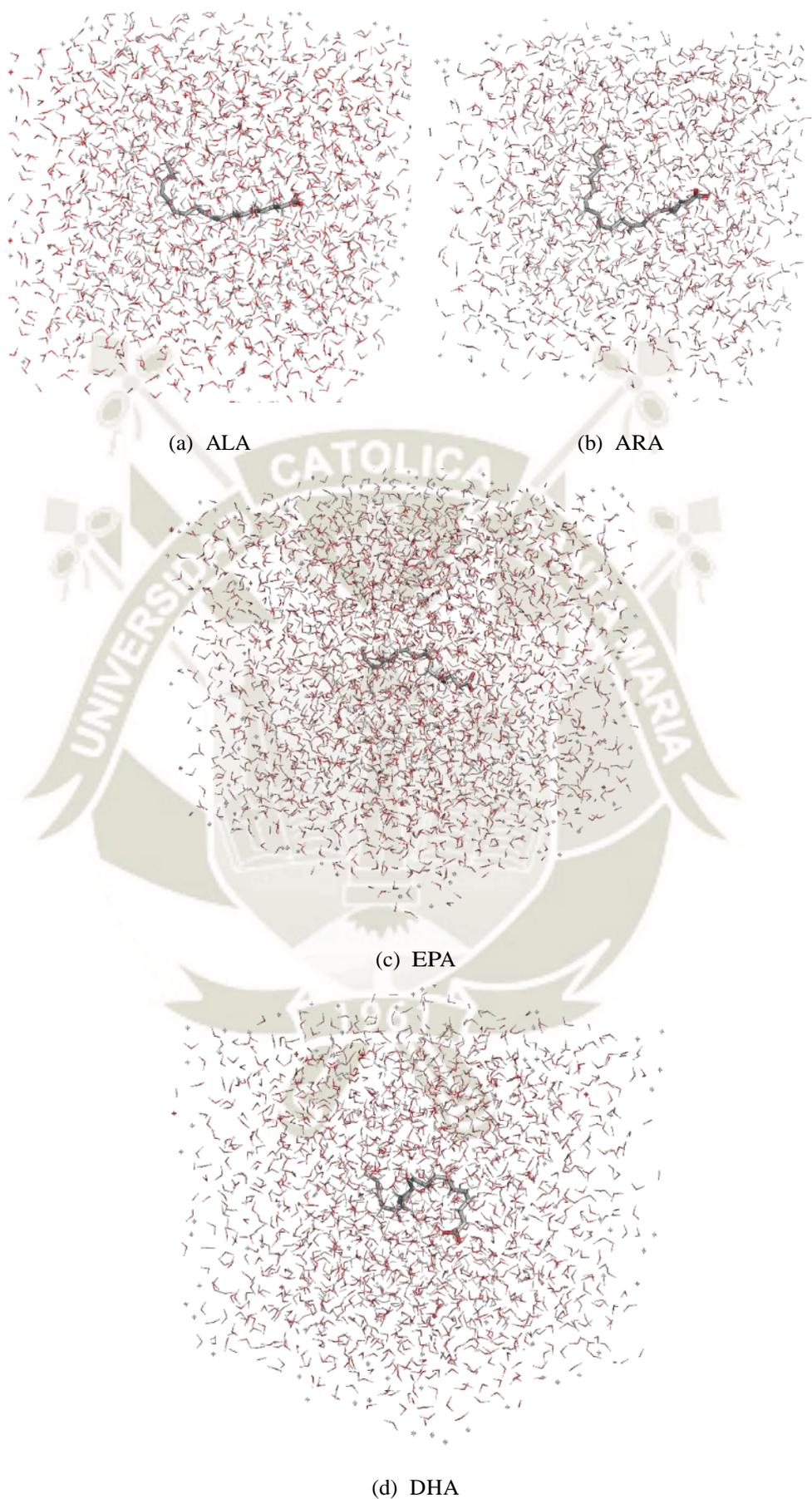


Figura 3.11: Optimización molecular de Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPI) en medio acuoso

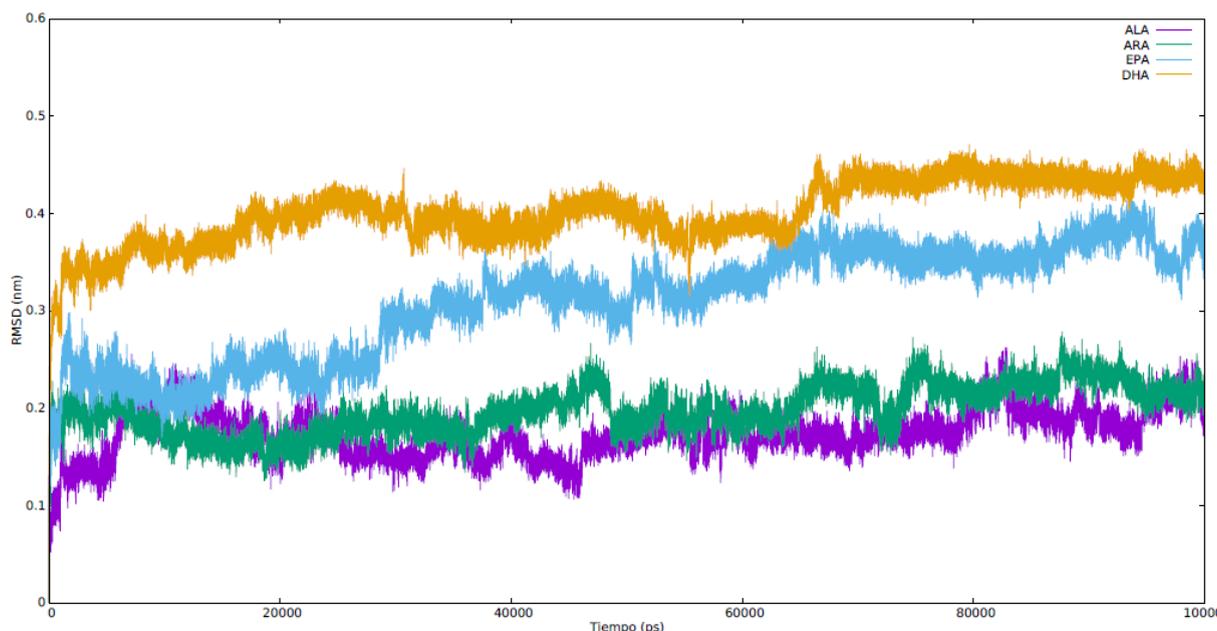


Figura 3.12: RMSD de la optimización molecular de los Ácidos Grasos Poliinsaturados, en colectivo NVT en 100 ns.

3.5. Acoplamiento Molecular entre los Ácidos Grasos Poliinsaturados y la proteína EgFABP1

La interacción de los AGPI con la proteína EgFABP1 demostró una alta capacidad de unión entre los mismos. En la Tabla 3.3 se observa la energía de interacción entre los AGPI y la proteína EgFABP1, con un valor de energía libre de unión de -5.18 kcal/mol para el Ácido Araquidónico (ARA). Estructuralmente se estableció una afinidad importante entre los aminoácidos y las moléculas de AGPI. Además, se observó que los aminoácidos interactuantes corresponden a los mismos encontrados en el análisis de cavidades previamente descrito, como se observa en la Figura 3.8. En el análisis estructural de la interacción entre la proteína EgFABP1 y la molécula de Ácido docosahexaenoico (DHA) se observó, que el acoplamiento se llevó a cabo en la región de la cavidad 1, que fue descrita en la Figura 3.16. Al interactuar el ácido α -linolénico (ALA), presentó una gran afinidad por los aminoácidos Thr43, Tyr50, Phe65, Val42, Phe71 y Glu69. Se observó que la molécula del Ácido Araquidónico (ARA) evidenció una afinidad por los mismos

aminoácidos, como se observa en la Figura 3.14, y el ácido eicosapentaenoico (EPA) como se en la Figura 3.15.

Tabla 3.3: Valores Obtenidos del Acoplamiento Molecular entre AGPI y la proteína EgFABP1

Molécula	Energía de Unión	Energía de Unión*
ALA	-4.55	-19.04
ARA	-5.18	-21.67
EPA	-4.98	-20.84
DHA	-4.75	-19.87

Valores de Energía (kcal/mol) / Energía* (kJ/mol)

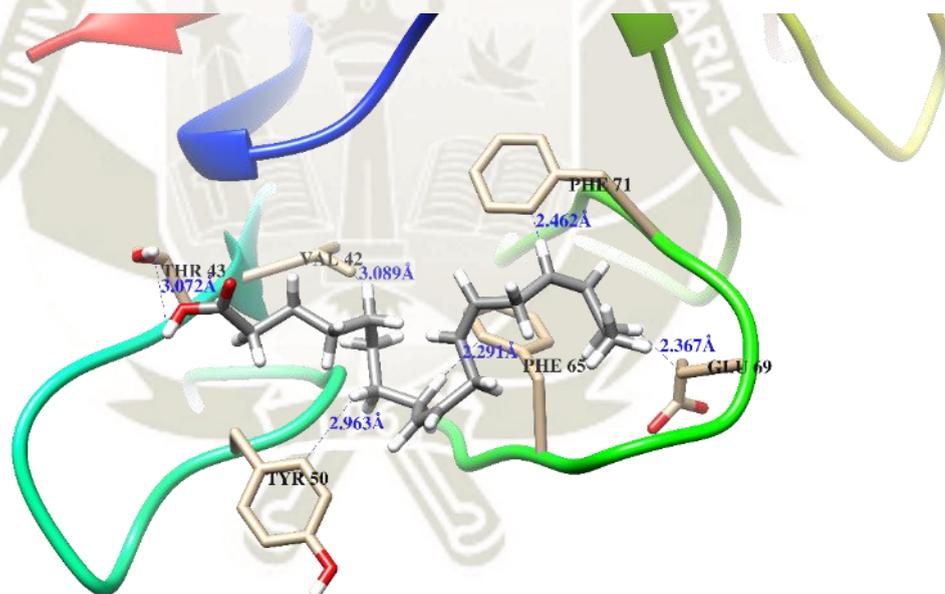


Figura 3.13: Interacción de ALA y EgFABP1 (Específicamente con los aminoácidos Tyr50, Thr43, Val42, Phe65, Glu69, Phe 65 y Phe71).

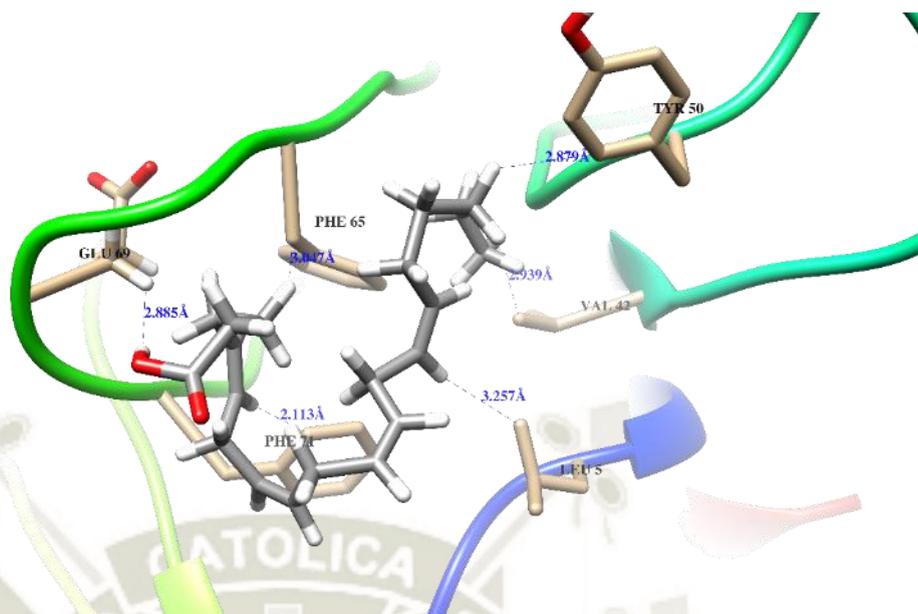


Figura 3.14: Interacción de ARA y EgFABP1 (Específicamente con los aminoácidos Glu69, Phe65, Val42, Tyr50, Leu5 y Phe71).

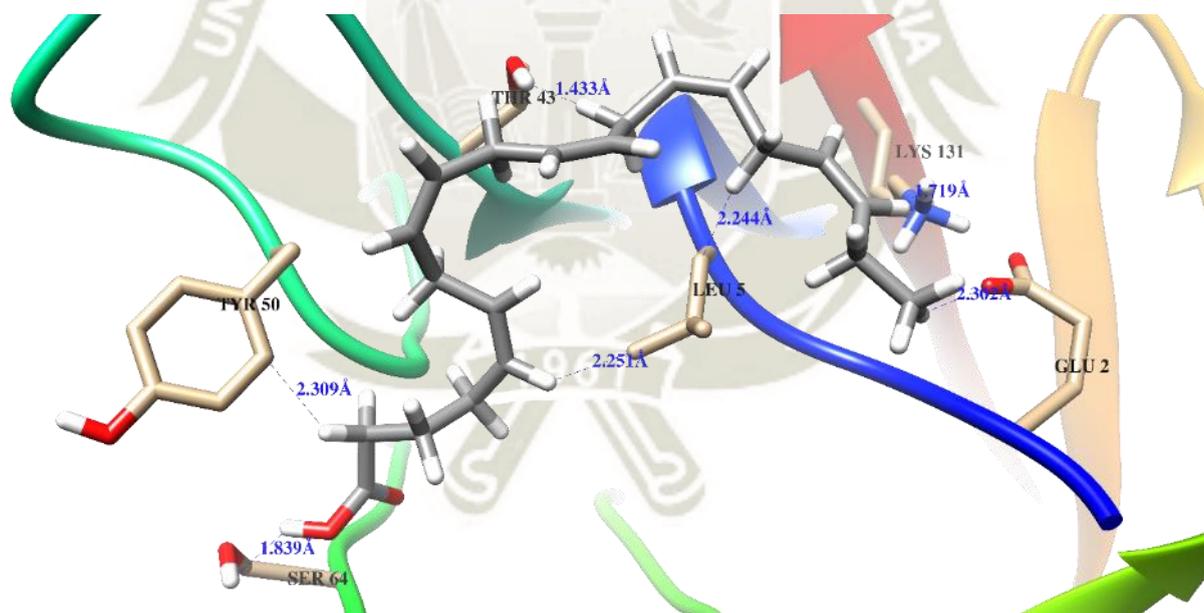


Figura 3.15: Interacción de EPA y EgFABP1 (Específicamente con los aminoácidos Thr43, Lys131, Glu2, Leu5, Tyr50, y Ser64).

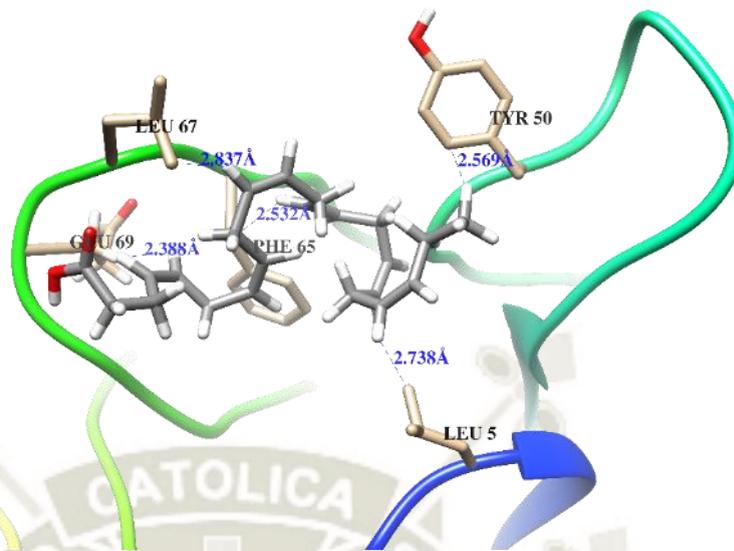


Figura 3.16: Interacción de DHA y EgFABP1 (Específicamente con los aminoácidos Leu5, Glu69, Leu67, Phe65, y Tyr50).

3.6. Potencial electrostático de la Interacción entre AGPI y la Proteína EgFABP1

El análisis del potencial electrostático demostró la afinidad de los ácidos grasos poli-insaturados por regiones electrostáticamente positivas (áreas de color azul). Además se observó que la superficie de potencial electrostático de la proteína EgFABP1 se encontraba totalmente rodeada de cargas negativas, como se muestra en la Figura 3.17

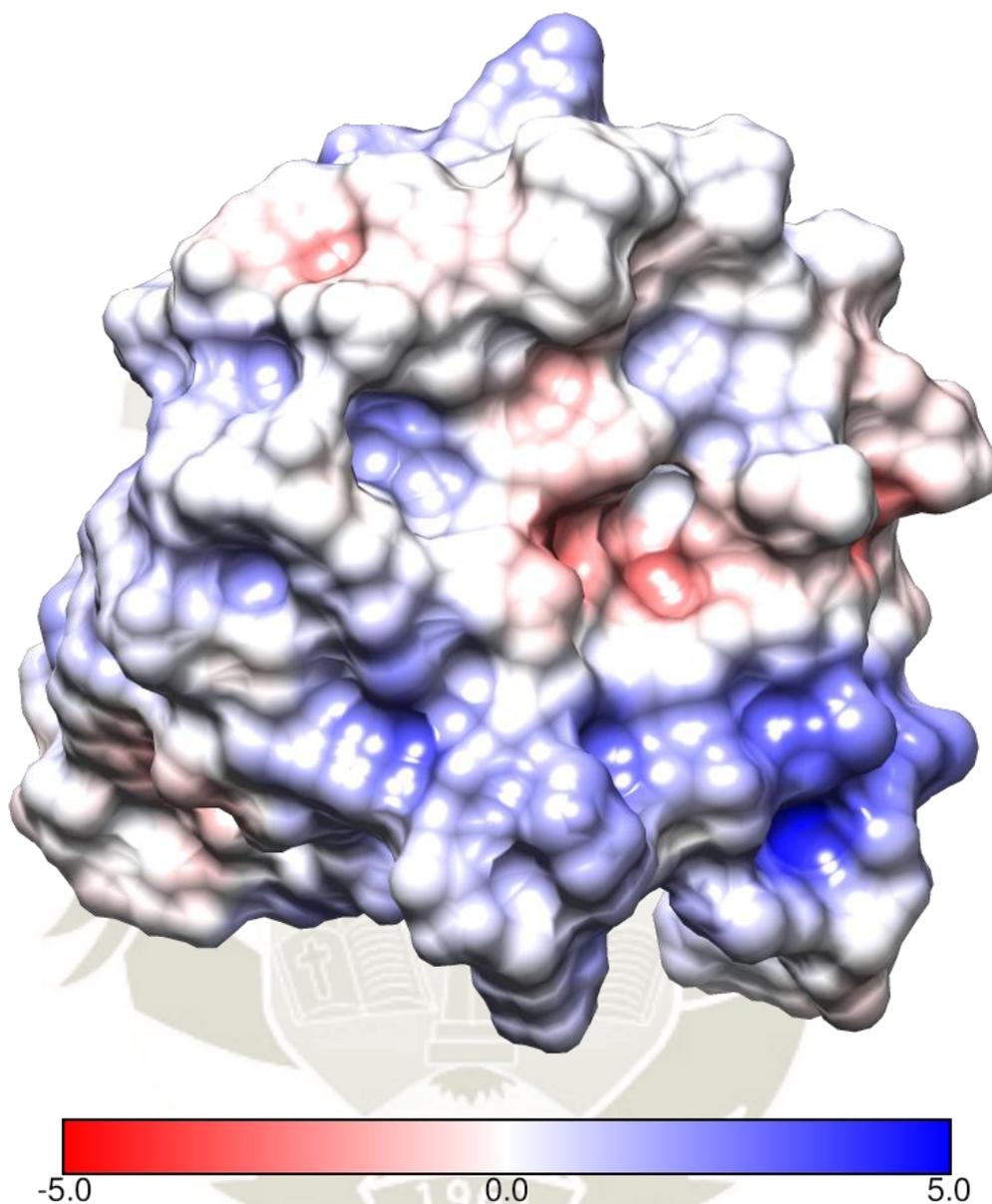


Figura 3.17: Superficie de potencial electrostático de la proteína EgFABP1 tras optimización molecular (Rango de -5.0 kT/e (cargado Negativo/Rojo) a 5.0 kT/e (cargado Positivo/Azul).

El análisis de la superficie de potencial electrostático al interactuar con ALA, demostró que la molécula se acoplo en un bolsillo negativo, lo que facilitó su interacción. Para la molécula ARA, la interacción está mediada en una cavidad de potencial electrostático negativo, de la misma forma para la molécula EPA y DHA como se observa en la Figura 3.18.

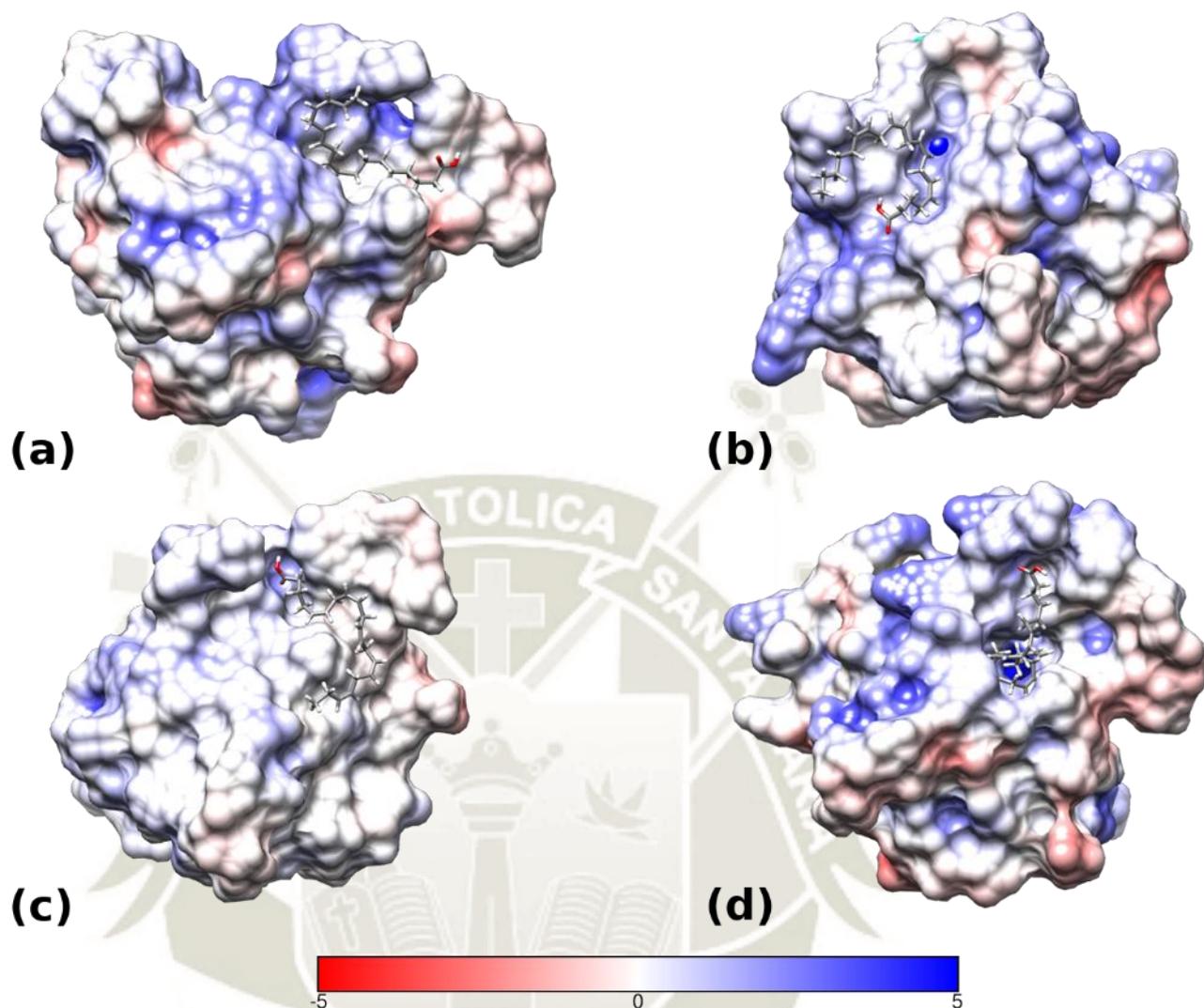


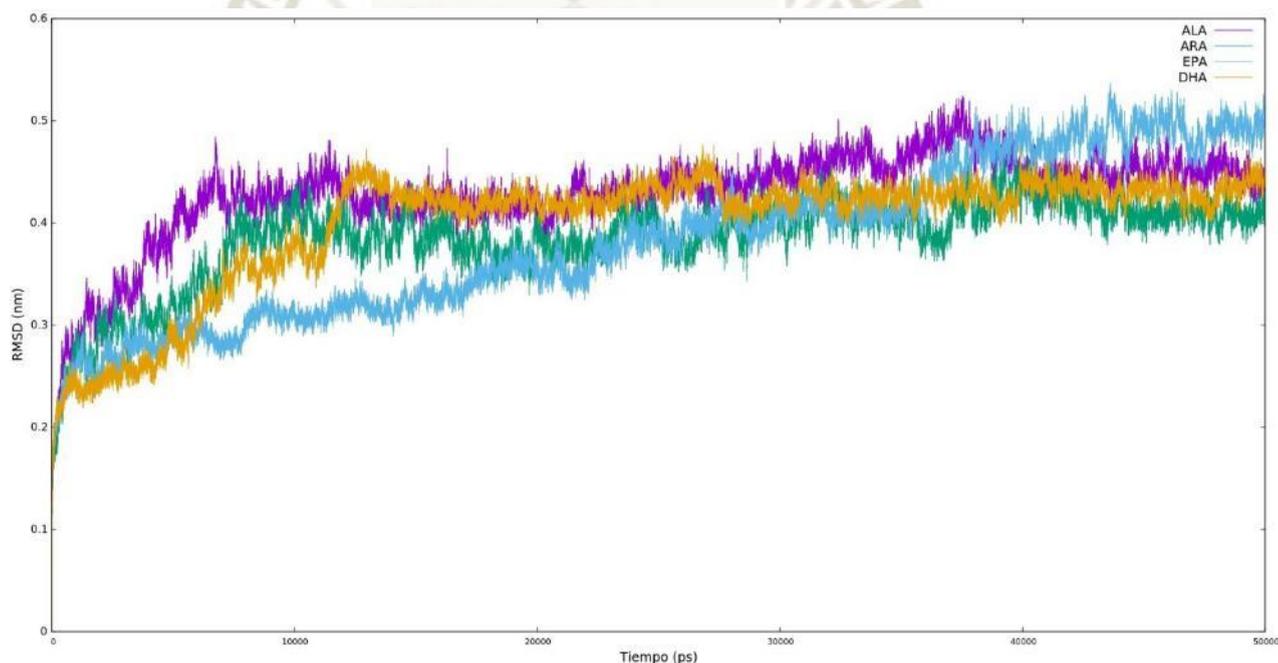
Figura 3.18: Superficie de potencial electrostático en la proteína EgFABP1 tras acoplamiento molecular((a) ALA, (b) ARA, (c) EPA, (d) DHA / Rango de -5.0 kT/e (cargado Negativo/Rojo) a 5.0 kT/e (cargado Positivo/Azul).

3.7. Análisis de Dinámica Molecular Post Interacción entre los AGPI y la Proteína EgFABP1

La dinámica molecular luego de la interacción determinó el posicionamiento de los ácidos grasos poliinsaturados en un medio acuoso y neutro. Se observó la afinidad de los mismos, y la inestabilidad de la proteína en cada una de las interacciones. El análisis de RMSD evidencia la alta estabilidad que posee la formación de los diferentes complejos

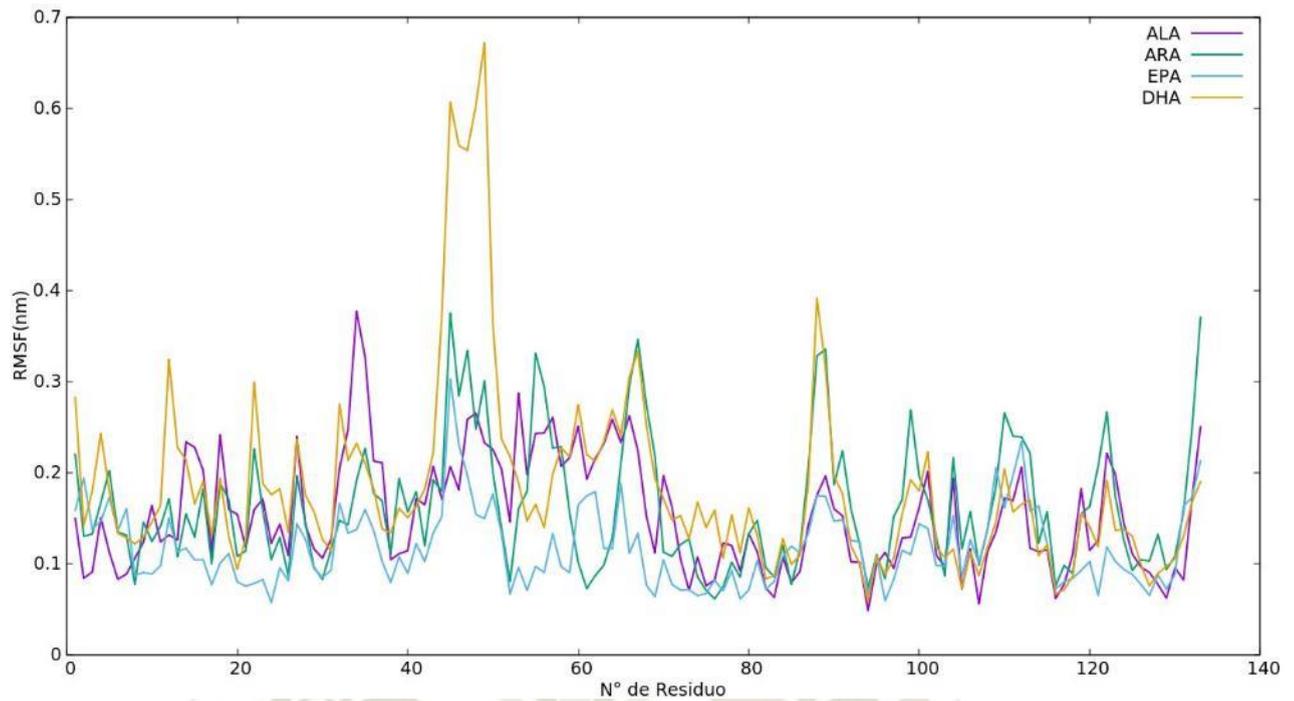
como se observa en la Figura 3.19, siendo el complejo formado con ALA el que experimentó un mayor valor de estabilidad con valores promedio de 0.15 nm de fluctuación para ALA tras alcanzar la estabilidad a los 8 ns. Para ARA, alcanzó la estabilidad a los 10 ns con un valor promedio de 0.13 nm. En el caso del complejo formado con EPA se determinó que las fluctuaciones eran realmente variadas, y que el valor promedio a partir de los 5 ns fue de 0.25 ns. El complejo formado entre le EgFABP1 y DHA fue de los más estables debido a que alcanzó una estabilidad de 0.06nm.

Las Fluctuaciones Medias Cuadráticas por residuo demostraron que los aminoácidos que más se mueven son los que más interactuaron con los ligandos, como se observa en la Figura 3.20. En el caso de ALA, ARA y EPA se observó que las fluctuaciones fueron muy parecidas, sobre todo de los aminoácidos Glu 122, Glu 110, Asp 98, Leu 67, Ser 54, Met 32, Glu 21. En el caso del DHA, se observó un mayor desplazamiento de los aminoácidos Leu 45, Gly 46, Gly 47, Gly 48 y Lys 49.



(a) RMSD

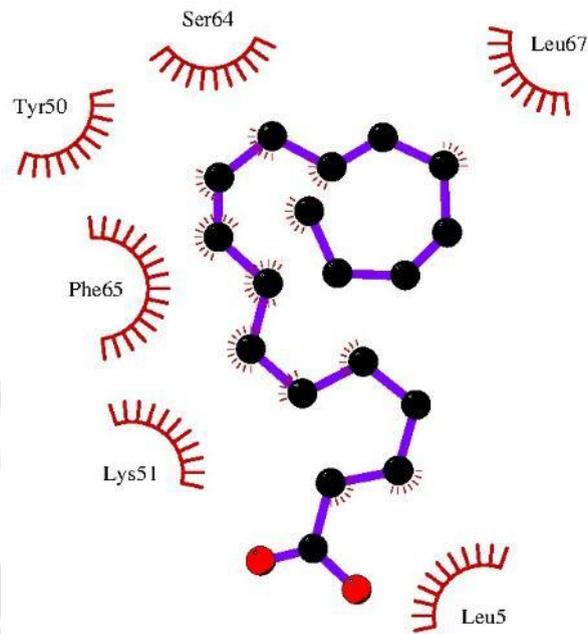
Figura 3.19: RMSD de la interacción molecular entre los Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPI) y la proteína EgFABP1.



(a) RMSD

Figura 3.20: RMSF de la interacción de la proteína EgFABP1 y los AGPI.

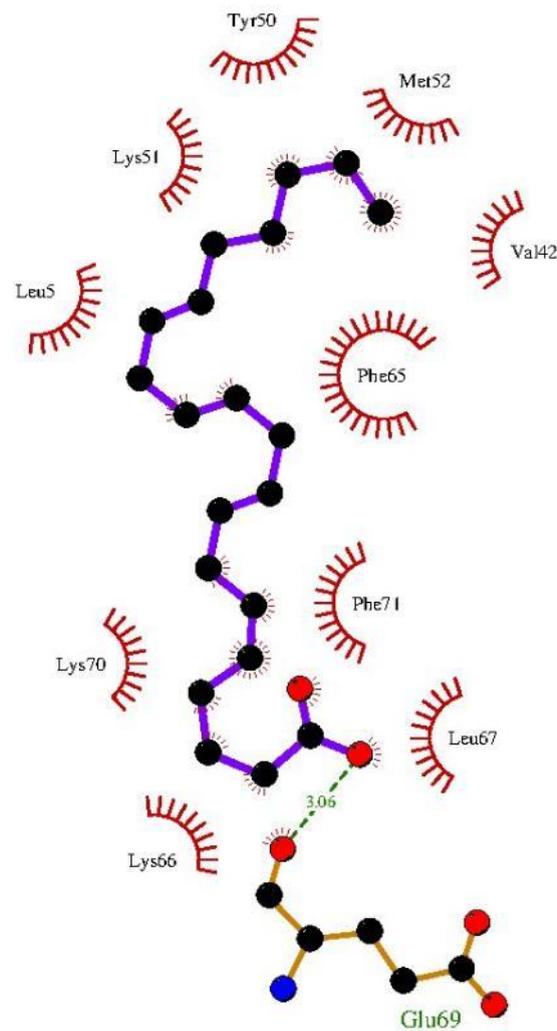
En el caso de la dinámica molecular del complejo entre EgFABP1 - ALA, se observó que no se formaron puentes de hidrógeno luego de la interacción, y que tiene tendencia a establecer interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos Tyr 50, Phe 65, Lis 51, Leu 5, Ser 64 y Leu 67; como se observa en la Figura 3.21.



(a) EgFABP1-ALA

Figura 3.21: Análisis post-MD de la interacción molecular entre ALA y la proteína EgFABP1.

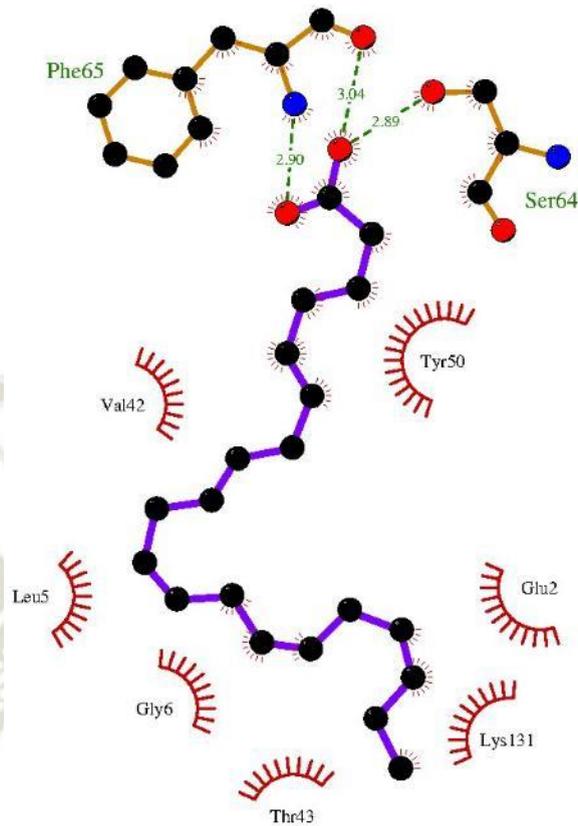
La interacción del complejo EgFABP1 - ARA, demostró la estabilidad entre estas dos estructuras, de donde se observó la formación de un puente de hidrógeno con el Aminoácido Glu 69; y la interacción hidrofóbica con los aminoácidos Leu 5, Lys 51, Tyr 50, Met 52, Val 42, Phe 65, Phe 71, Leu 67, Lys 66 y Lys 70, como se observa en la Figura 3.22.



(a) EgFABP1-ARA

Figura 3.22: Análisis post-MD de la interacción molecular entre ARA y la proteína EgFABP1.

El complejo de interacción EgFABP1 - EPA demostró la amplia estabilidad de acoplamiento molecular, debido a que se formaron hasta tres puentes de hidrógenos, entre la molécula EPA y el aminoácido Phe 65 y el aminoácido Ser 64; además se observó las interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos Val 42, Leu 5, Gly 6, Thr 43, Lys 131, Glu2 y Tyr 50, como se observa en la Figura 3.23.



(a) EgFABP1-EPA

Figura 3.23: Análisis post-MD de la interacción molecular entre EPA y la proteína EgFABP1.

El complejo de interacción EgFABP1- DHA , evidencia la formación de dos puentes de hidrógeno, uno de ellos con el aminoácido Glu 69 y el otro con el aminoácido Gly 68; así como la interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos Leu 5, Lys 66, Lys 51, Tyr 50, Phe 65, Ser 64, y Leu 67, como se observa en la Figura 3.24

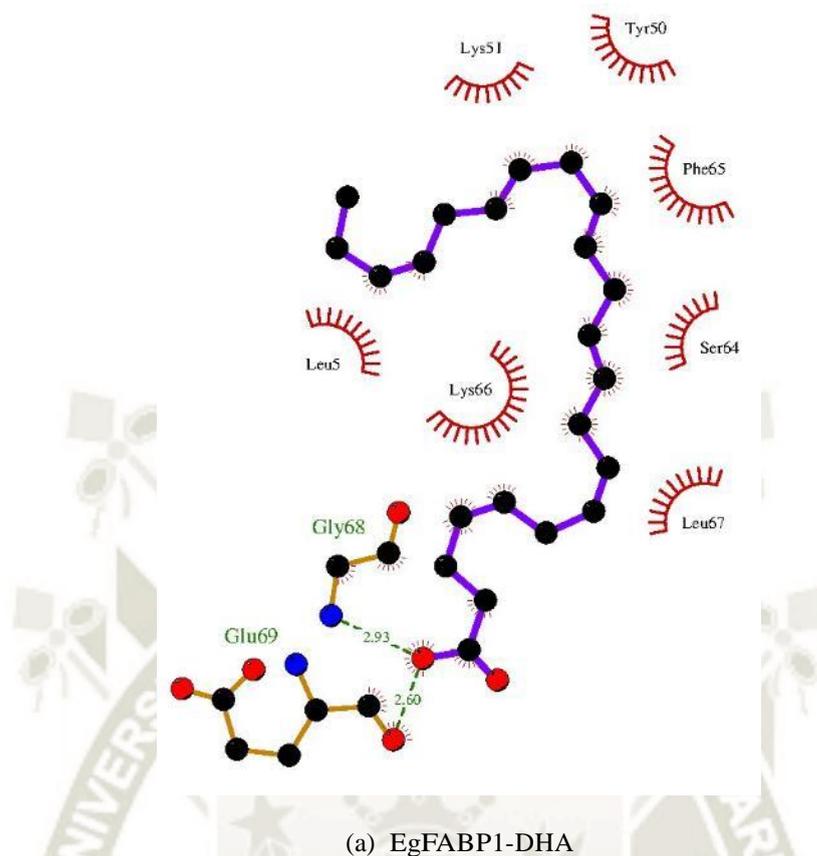


Figura 3.24: Análisis post-MD de la interacción molecular entre DHA y la proteína EgFABP1.

3.8. Análisis de los valores de Energía Libre de Interacción entre los Ácidos Grasos Poliinsaturados y la Proteína EgFABP1

Los valores de energía libre obtenidos por este método demuestran una gran interacción entre este y la proteína EgFABP1. Se observa que la molécula DHA obtuvo el mayor valor de interacción de hasta -15.55 ± 0.29 kcal/mol, como se muestra en la Tabla 3.4

Tabla 3.4: Valores de ΔG obtenidos en la interacción de la proteína EgFABP1 y los AGPI

Acoplamiento	ΔG	ΔG^*
EgFABP1 - ALA	-9.71 +/- 0.44	-40.63 +/- 1.84
EgFABP1 - ARA	-10.996 +/- 0.51	-46.01 +/- 2.13
EgFABP1 - EPA	-12.49 +/- 0.13	-52.26 +/- 0.54
EgFABP1 - DHA	-15.55 +/- 0.29	-65.06 +/- 1.21

Valores de Energía Libre ΔG (kcal/mol) / ΔG^* (kJ/mol)

Gary V. Richiera, et al,¹⁵⁴ obtuvieron valores energía libre de unión entre proteínas de Unión de Ácidos Grasos humanos y de ácidos grasos de cadena larga, de donde obtuvieron valores experimentales de unión entre el ácido α -linolénico y la proteína de unión de Ácidos Grasos en adipocitos (A-FABP) con un valor de -9.4 +/- 0.1 kcal/mol, con la proteína de Unión de Ácidos Grasos Cardíaca (C-FABP) se obtuvo un valor de -10.1 +/- 0.1 kcal/mol y la proteína de Unión de Ácidos Grasos Intestinal (I-FABP) de -9.3 +/- 0.1 kcal/mol; también realizaron ensayos con el ácido Araquidónico, de donde obtuvieron valores de -9.5 +/- 0.2 kcal/mol con la proteína A-FABP, de -10.3 +/- 0.1 kcal/mol; y con la proteína I-FABP, el valor de -9.5 +/- 0.1 kcal/mol. Al realizar la comparación entre los valores obtenidos experimentales y los valores obtenidos teóricamente se observó la poca diferencia obtenida entre estos; además se debe de considerar el alto parecido entre las estructuras de la H-FABP humana y la EgFABP1 del parásito *Echinococcus granulosus*, como lo afirma Gabriela Alvite⁶.

3.9. Construcción de Nanotransportador y Optimización Cuántica

El diseño de nanotransportador se construyó en forma de dendrímero previamente descrita, a la cual se le realizó una optimización cuántica. La construcción del nanotrans-

portador se llevó a cabo con un core o núcleo de poliglicerol y en la generación 2 se adosaron las moléculas de Ácido Docosahexaenoico (DHA) (Se decidió utilizar esta molécula tras los ensayos de interacción entre la misma con la proteína EgFABP1, de donde se observó la mayor estabilidad de unión, y menores valores de energía libre de unión. Se obtuvo la geometría del nanotransportador y se evaluó su longitud entre las moléculas de DHA, como se muestra en la Figura 3.25, considerándose la de mayor tamaño el núcleo. Se obtuvieron las cargas de Hirshfeld, de suma total 0, haciendo el sistema neutro.

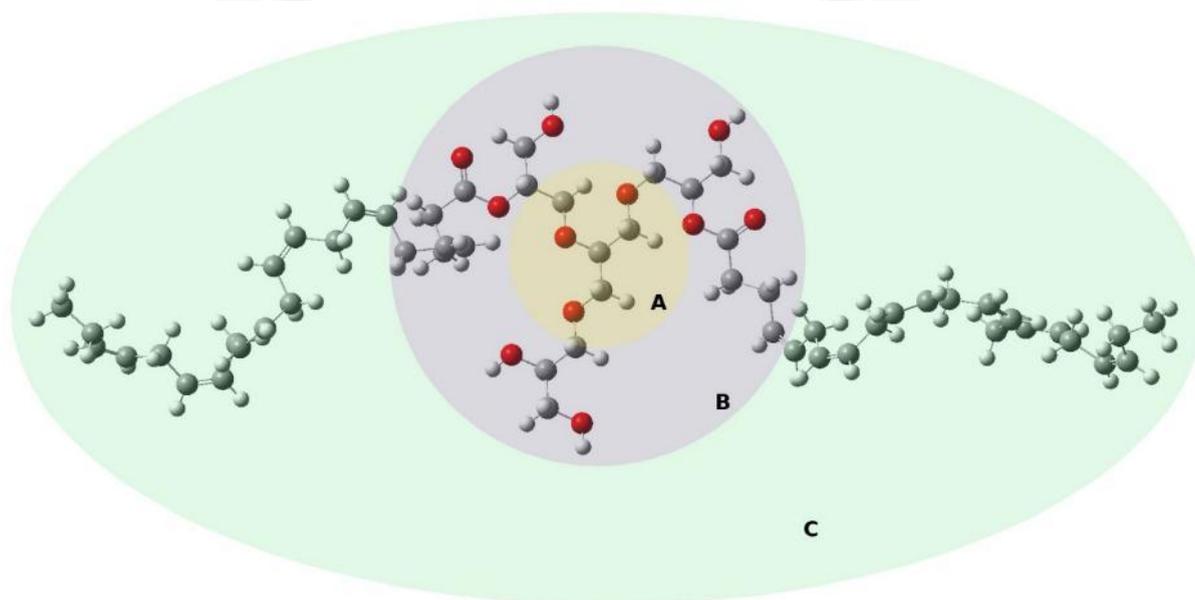


Figura 3.25: Diseño de Nanotransportador. (A) Núcleo de nanotransportador - Generación 0 (Amarillo), (B) Primera generación (Rojo), (C) Segunda generación (Verde).

En la optimización cuántica del nanotransportador donde adicionalmente se adicionaron la estructura de 3 fármacos: Albendazol (ABZ), Mebendazol (MBZ) y Praziquantel (PRZ), se obtuvo el sistema interactuante entre los fármacos y el núcleo del nanotransportador, como se observa en la Figura 3.26. Además se calculó las cargas de Hirshfeld para cada uno de ellos, obteniéndose cargas de 0, haciendo el sistema completamente neutro.

3.10. Optimización Molecular de Nanotransportador

Los resultados de la optimización molecular del nanotransportador demuestran la estabilidad del complejo formado por el nanotransportador y los fármacos que fueron adi-

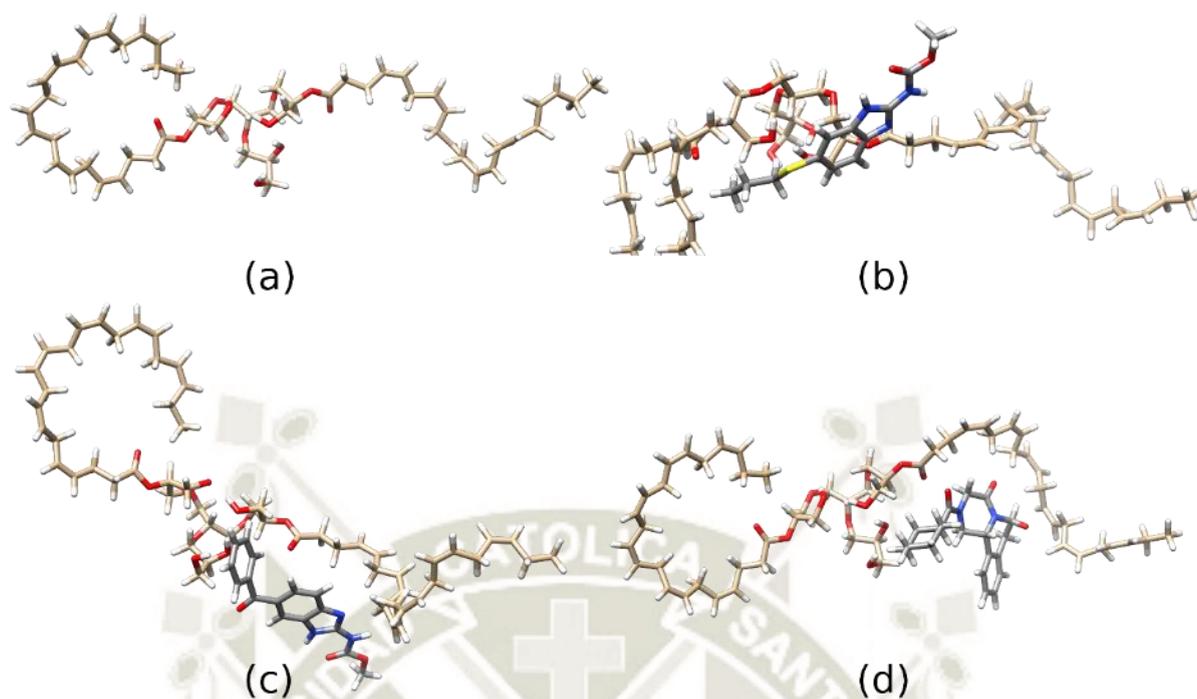


Figura 3.26: Diseño de Nanotransportador con interacción de fármacos. En (a)Nanotransportador (b)Nanotransportador-ABZ (c)Nanotransportador-MBZ, (d)Nanotransportador-PRZ.

cionados. En el caso de la molécula sola del nanotransportador la estabilidad del Radio de Giro expresa una medida estabilidad de 0.6 nm, como se ve en la Figura 3.28.

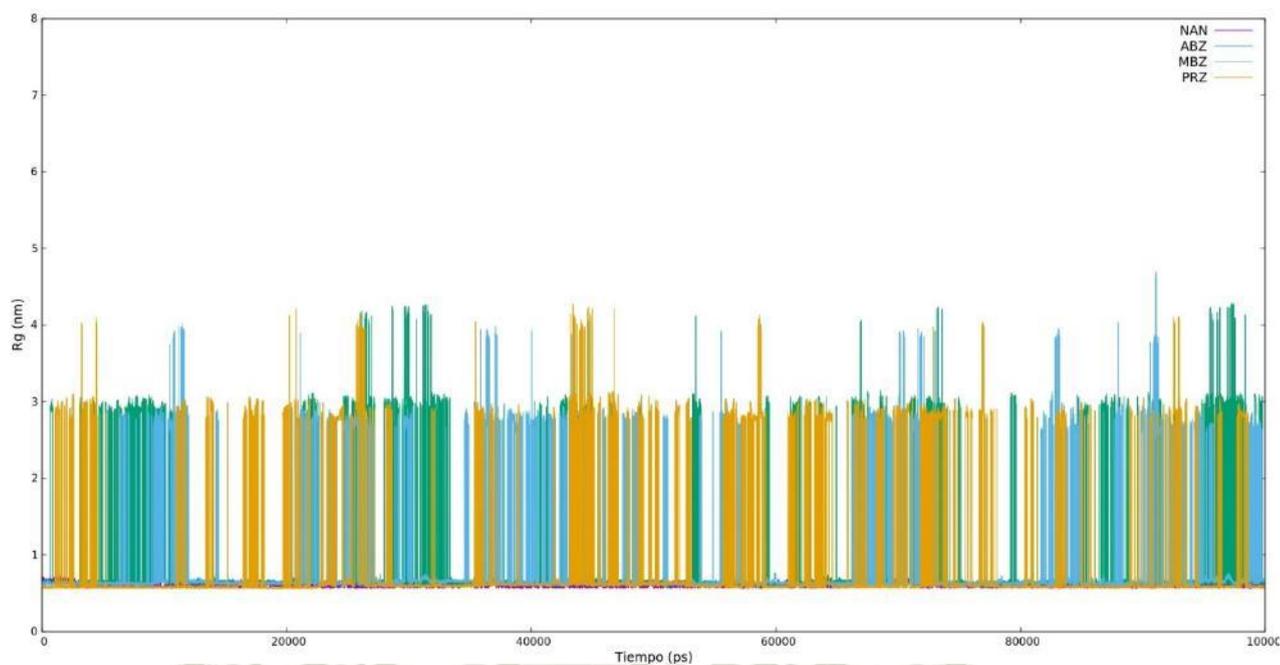
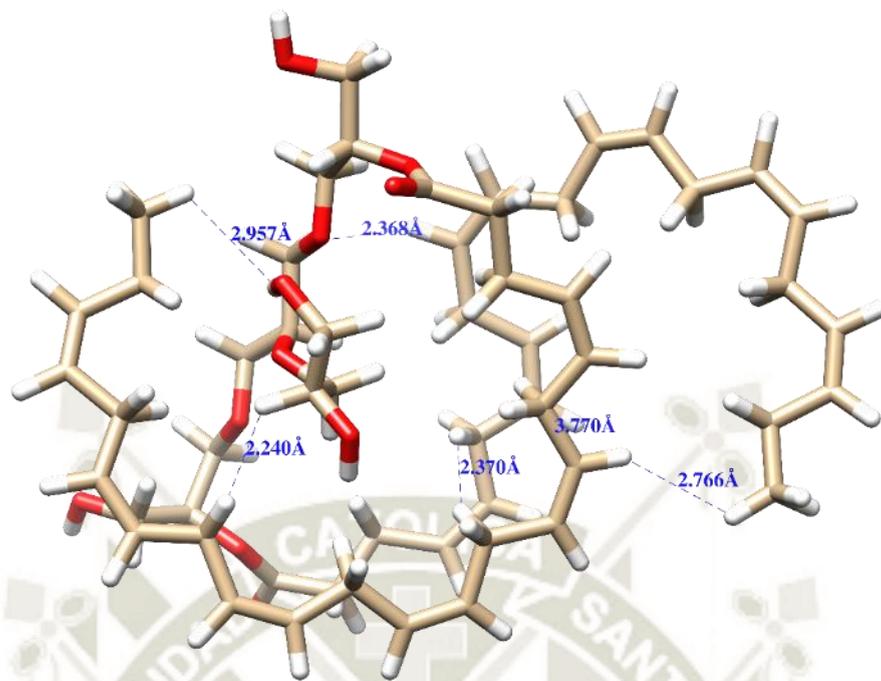


Figura 3.27: Diagrama del Radio de Giro del nanotransportador en cada caso (ABZ, MBZ, PRZ).





(a) Nanotransportador

Figura 3.28: Nanotransportador (a) Estructura de Nanotransportador (de azul distancias interatómicas).

En el caso del nanotransportador cargado con Albendazol (ABZ) se logra observar en el análisis del radio de giro se obtuvo una mayor variación de 3.6 nm y una variación promedio de 0.93 nm, como se observa en la Figura 3.29. Lo que expresa la baja medida del del nanotransportador a desempaquetar el fármaco.

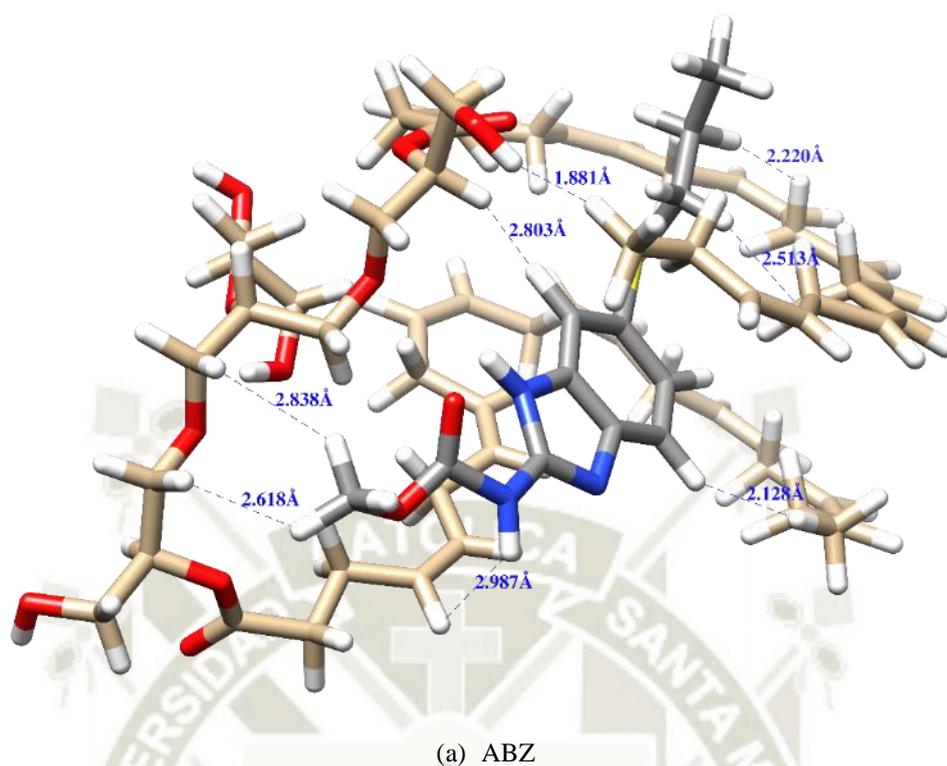


Figura 3.29: Nanotransportador (a)Estructura de Nanotransportador-ABZ (de azul distancias interatómicas).

El nanotransportador cargado con Mebendazol (MBZ) demostró un Radio de Giro con una variación promedio fue de 0.99 nm, y la mayor variación fue de 3.05 nm con lo que se evidencia una mayor estabilidad de empaquetamiento del nanotransportador alrededor de la molécula de Mebendazol, lo cual se observa en la Figura 3.30.

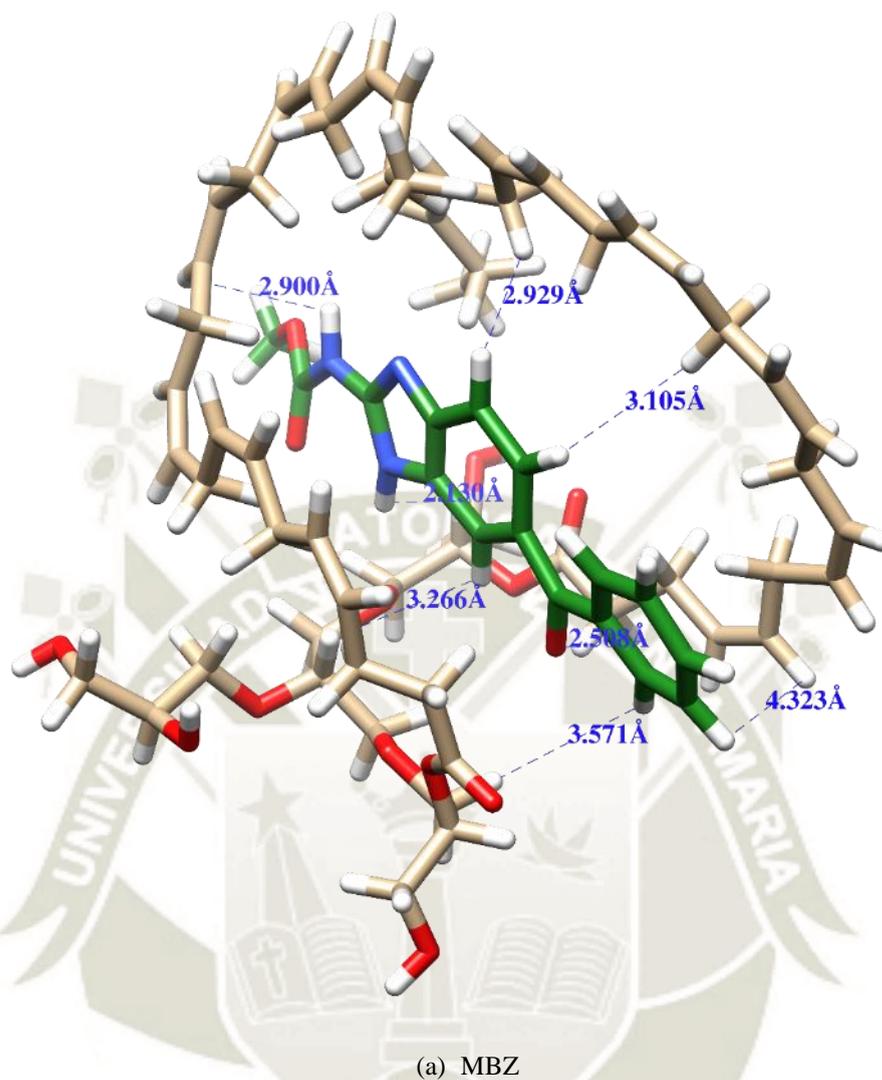


Figura 3.30: Nanotransportador (a)Estructura de Nanotransportador-MBZ (de azul distancias interatómicas).

En la interacción del nanotransportador con la molécula de Praziquantel (PRZ) se observa muy baja variación que con las otras moléculas, al determinarse una mayor estabilidad de 3.6 nm y una variación promedio de 0.99 nm en el desarrollo de la dinámica molecular, como se ve en la Figura 3.31.

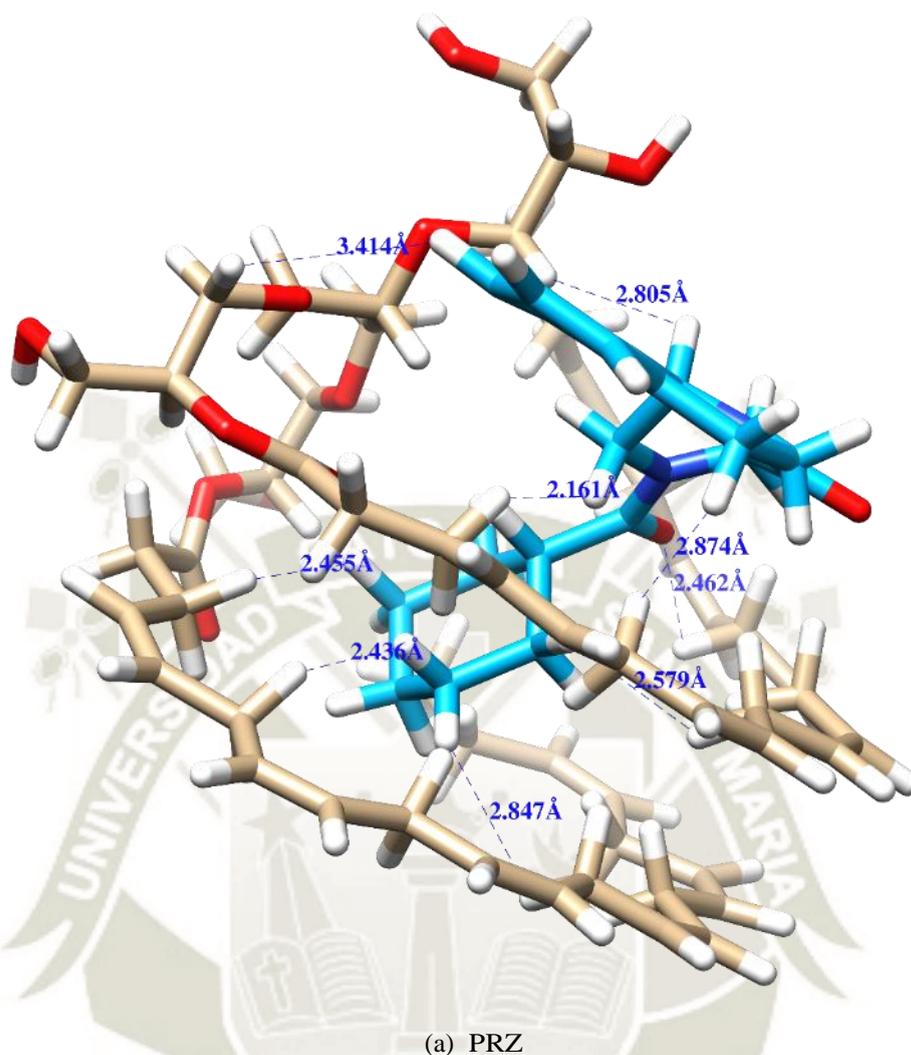


Figura 3.31: Nanotransportador (a)Estructura de Nanotransportador-PRZ (de azul distancias interatómicas).

3.11. Análisis de la interacción entre Nanotransportador y la Proteína EgFABP1

La interacción entre el nanotransportador, y el nanotransportador cargado con fármacos demostró una alta estabilidad de la interacción. Al interactuar solo el Nanotransportador (NAN) se encontró una energía de unión de -20.53 kcal/mol en el programa Hex, como se observa en la Tabla 3.5, y el mayor valor de interacción con los fármacos fue con ABZ (-22.23 kcal/mol) el cual demuestra la estabilidad del complejo.

Además las interacciones entre el Nanotransportador y la proteína demostro que los aminoácidos que se observan en la Figura 3.32 cercanos se encuentran cercanos a la cavidad 1 en la Figura 3.8, antes expuesta. La interacción del nanotransportador cargado con Albendazol (ABZ) presentó una interaccion que se observa en la Figura 3.33, para el complejo con Mebendazol (MBZ) se observa en la Figura 3.34, y para Praziquantel (PRZ) se observa en la Figura 3.35.

Tabla 3.5: Valores de acoplamiento molecular entre el Nanotransportador y la proteína EgFABP1

Molécula	Energía de Unión	Energía de Unión*
NAN	-85.90	-20.53
NAN-ABZ	-93.00	-22.23
NAN-MBZ	-83.80	-20.03
NAN-PRZ	-84.20	-20.12

Valores de Energía de Unión (kJ/mol) y Energía de Unión* (kcal/mol)

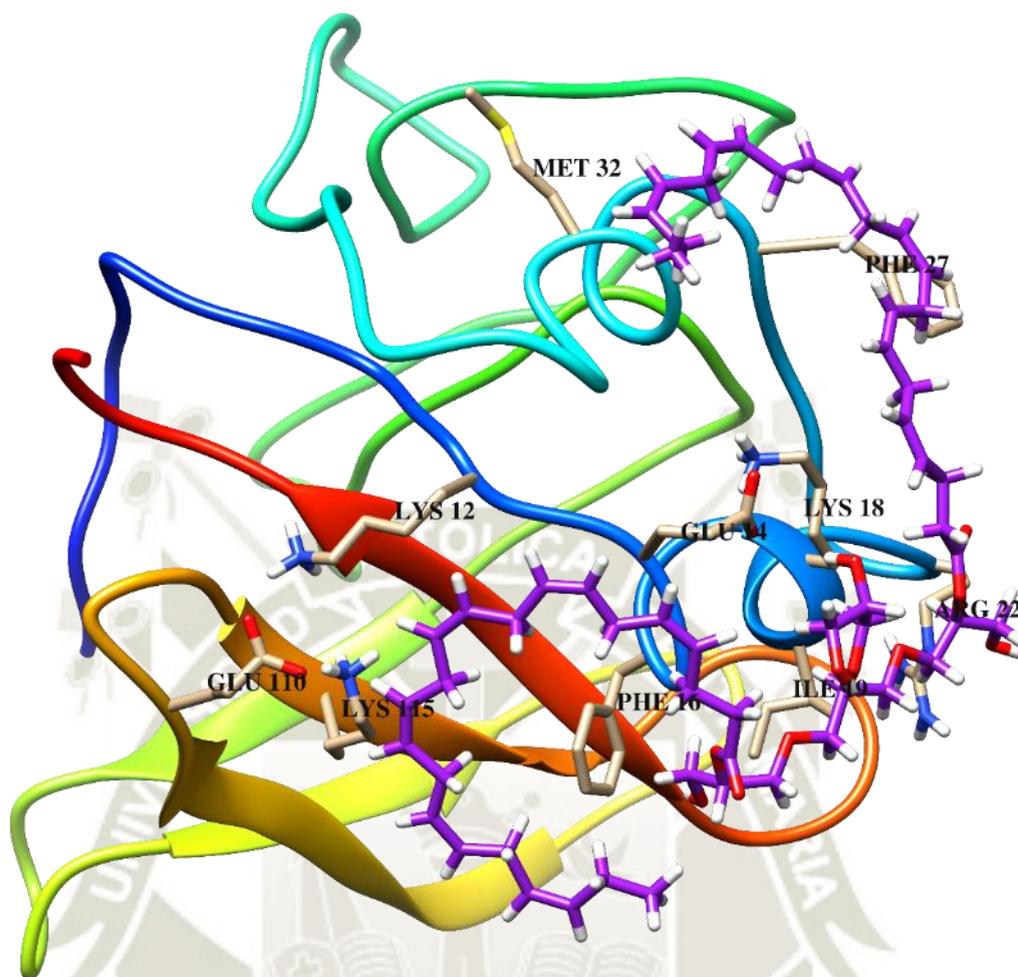


Figura 3.32: Interacción entre el Nanotransportador y la proteína EgFABP1

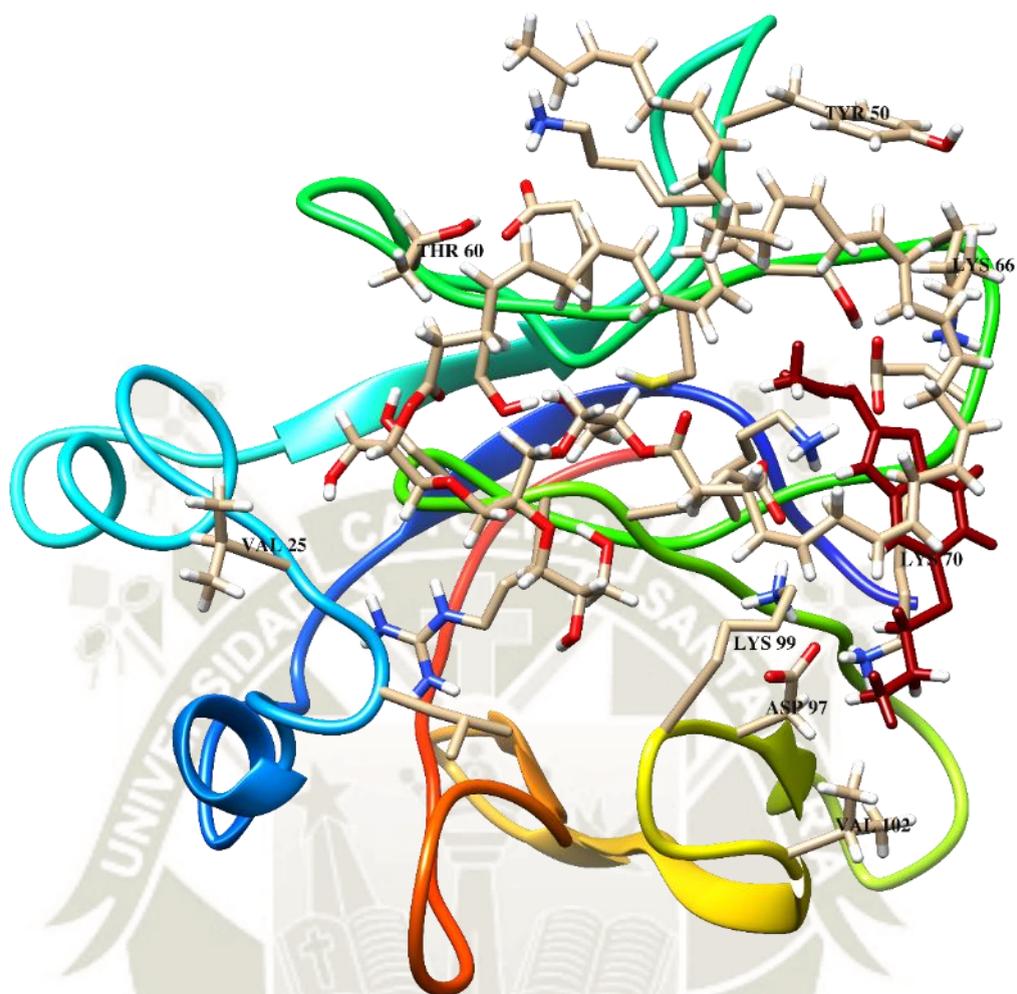


Figura 3.33: Interacción entre el Nanotransportador-ABZ y la proteína EgFABP1

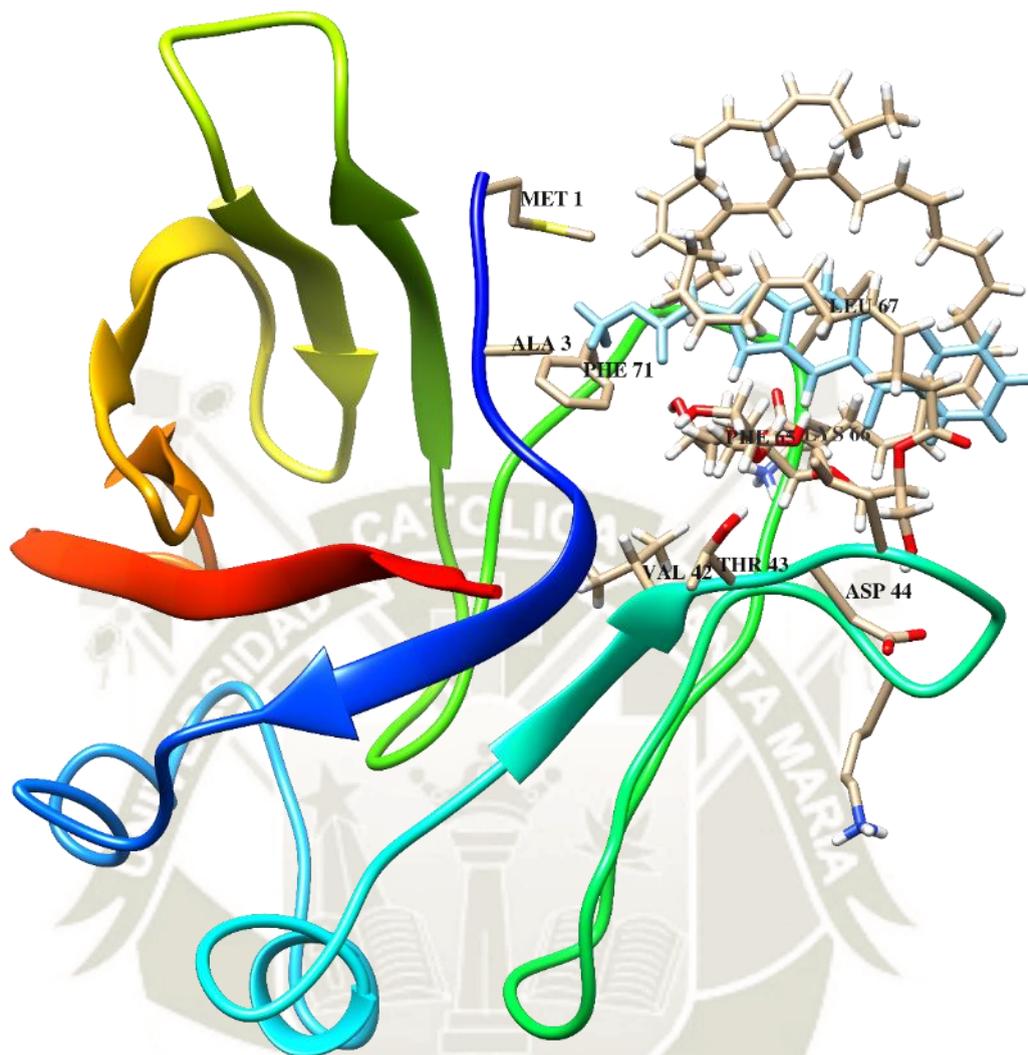


Figura 3.34: Interacción entre el Nanotransportador-MBZ y la proteína EgFABP1

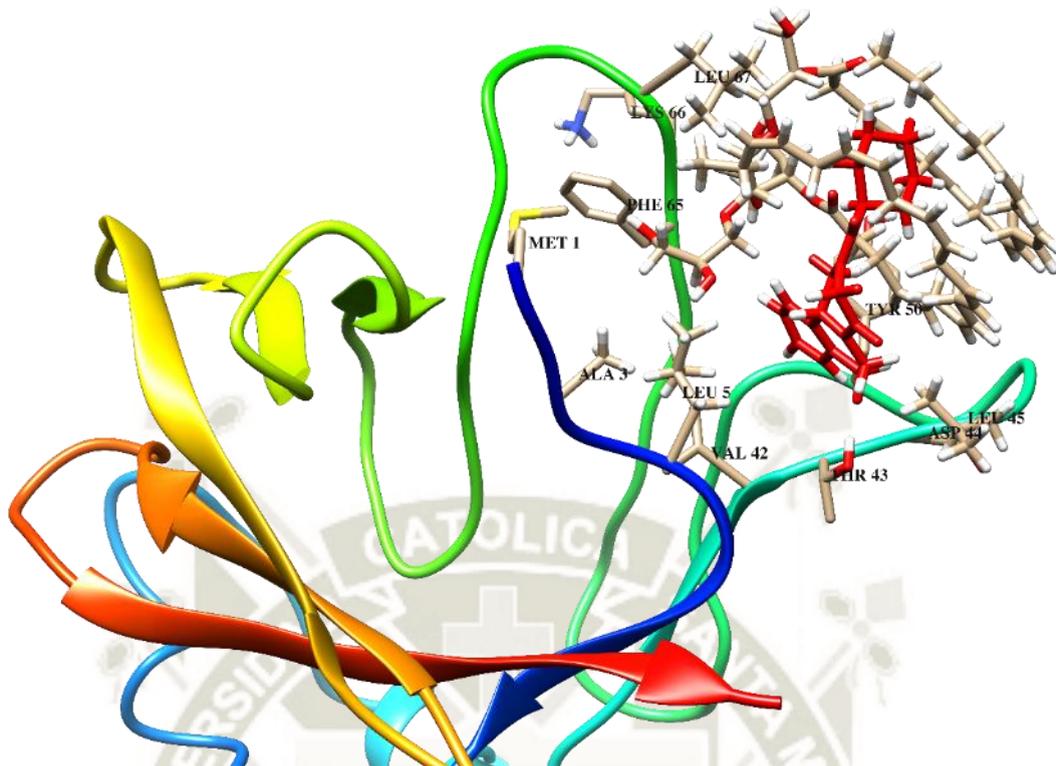


Figura 3.35: Interacción entre el Nanotransportador-PRZ y la proteína EgFABP1

3.12. Potencial electrostático de la Interacción de Nanotransportador y la Proteína EgFABP1

El análisis del potencial electrostático demostró la afinidad del Nanotransportador (solo y cargado con fármacos) por regiones electrostáticamente negativas (áreas de color rojo), y muy poco en contacto con zonas electrostáticamente positivas. Además se observó que la superficie de potencial electrostático de la proteína EgFABP1 se encontraba totalmente rodeada de cargas negativas, como se muestra en la Figura 3.36

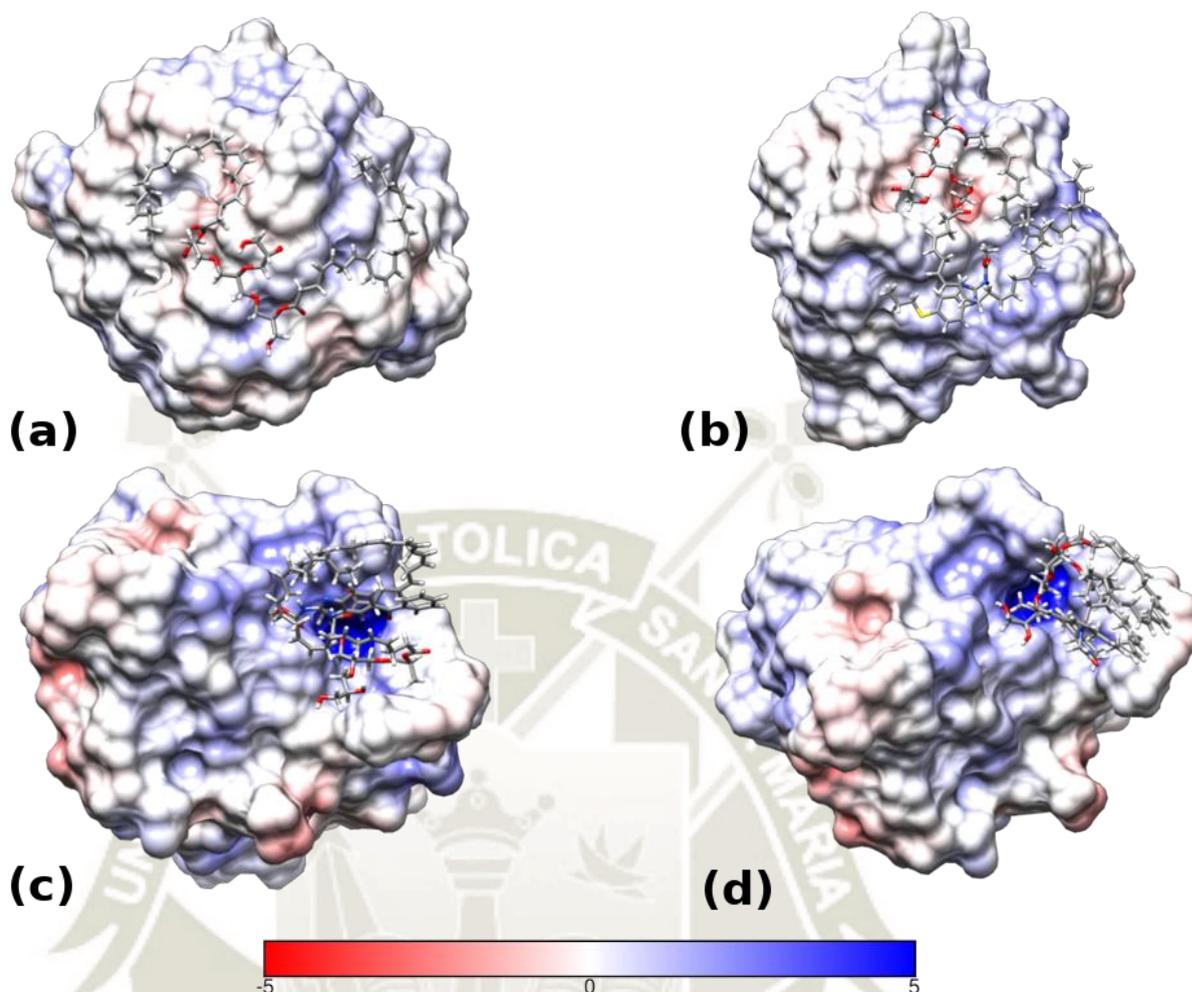


Figura 3.36: Superficie de potencial electrostático en la proteína EgFABP1 tras acoplamiento molecular ((a) Nanotransportador, (b) Nanotransportador-ABZ, (c) Nanotransportador-MBZ, (d) Nanotransportador-PRZ / Rango de -5.0 kT/e (cargado Negativo/Rojo) a 5.0 kT/e (cargado Positivo/Azul).

3.13. Análisis de la Dinámica Molecular Post-Interacción de Nanotransportador y la Proteína EgFABP1

El resultado de la dinámica molecular mostró la alta interacción y la estabilidad con la que el nanotransportador y los nanotransportadores cargados interactuaron con la proteína EgFABP1. Se observó la alta estabilidad de la interacción entre el Nanotransportador, de donde el análisis de RMSD demostró un promedio de variación de 0.1 nm a partir de los 35 ns, como se denota en la Figura 3.37, mientras que las interacciones estructurales

entre el nanotransportador y la EgFABP1 se observa en la Figura 3.39. La estabilidad del nanotransportador cargado con la molécula de Albendazol, al interactuar con la proteína EgFABP1 denota una mejora a partir de los 5 ns, presentó una estabilidad con una variación promedio fue de 0.2 nm, además la interacción estructural se dio como se observa en la Figura 3.40, y el nanotransportador cargado con Mebendazol, denota una estabilidad en la dinámica molecular, al estabilizarse a los 15 ns, con un promedio de 0.12 nm, que al interactuar se observa en la Figura 3.41. Al interactuar el nanotransportador cargado con Praziquantel con la proteína EgFABP1, se observó una variación media de 0.1 nm, a los 13 ns, interacción que se observa en la Figura 3.42, de donde se aprecia la estabilidad de la interacción molecular.

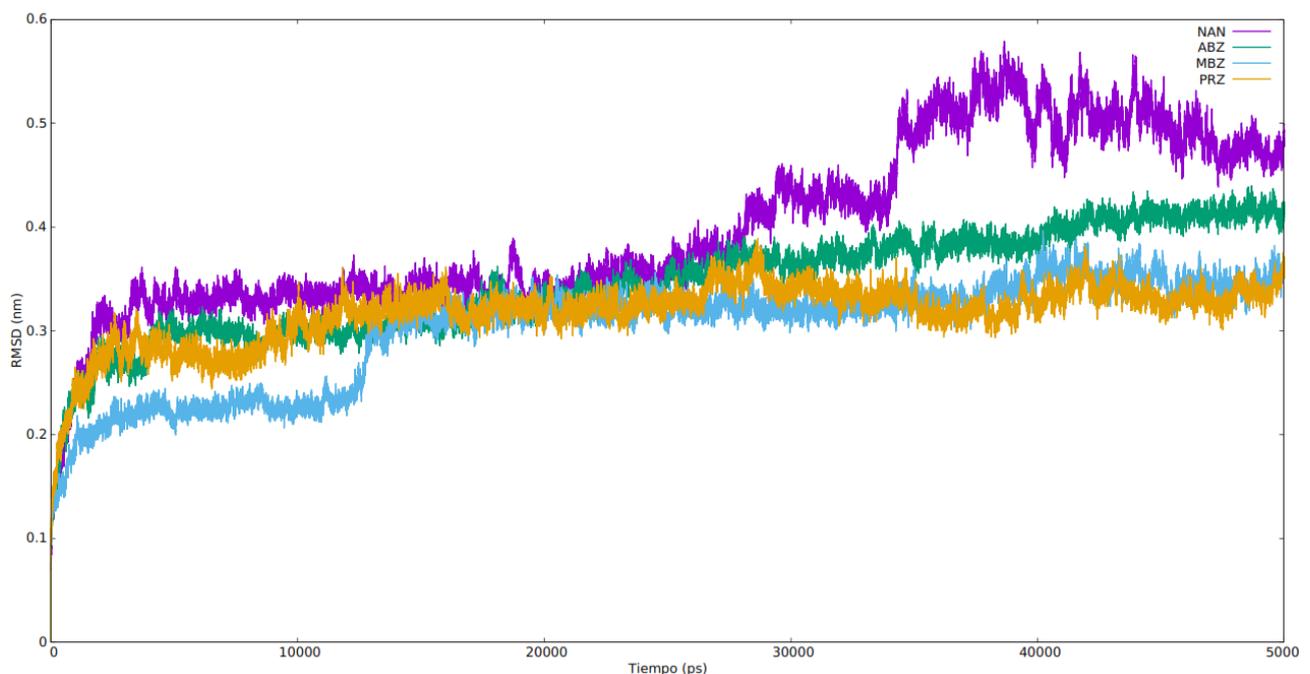
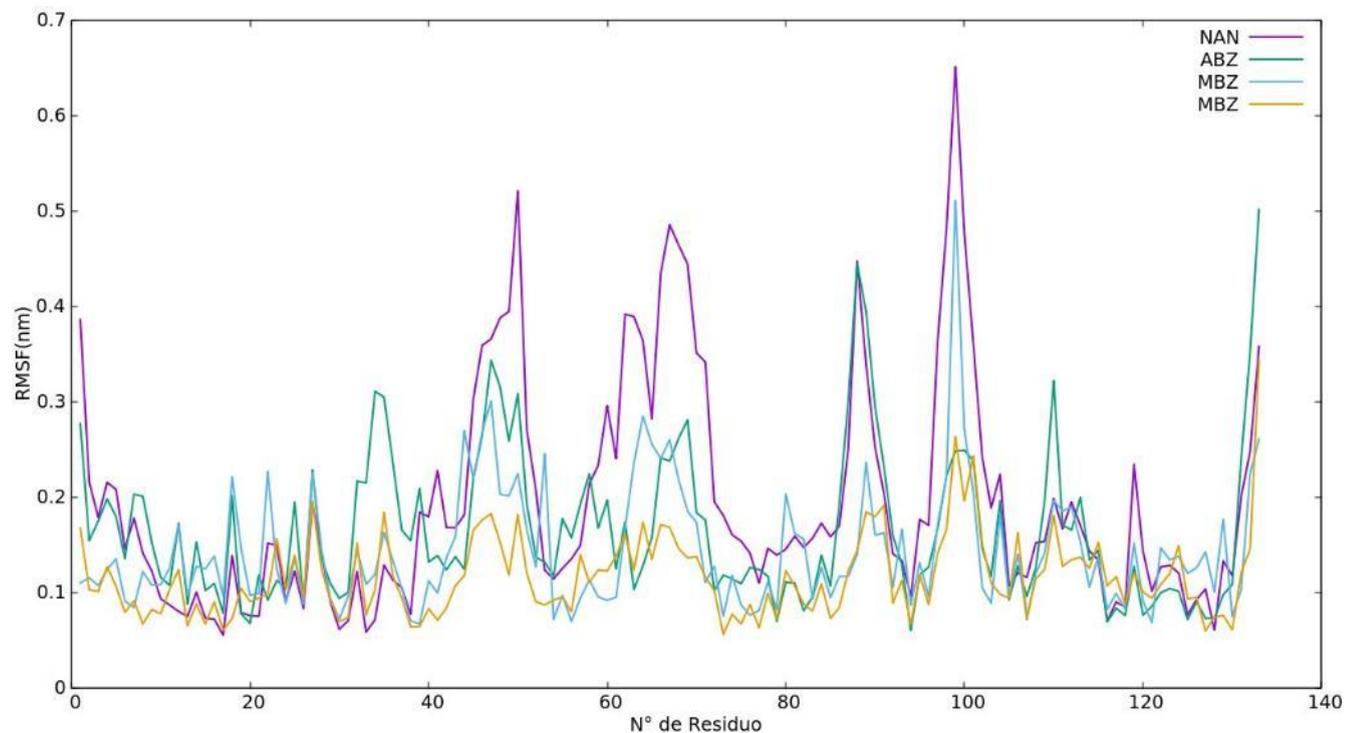


Figura 3.37: RMSD de la dinámica molecular de la interacción de la proteína EgFABP1 con Nanotransportador.

El análisis de las Fluctuaciones Medias Cuadráticas por residuos determinaron las mayores fluctuaciones de los aminoácidos, los cuales están directamente relacionados con las interacciones entre Proteína-Ligando. Como se observa en la Figura 3.38, en el caso de solo el Nanotransportador se observó una mayor fluctuación de los aminoácidos Lys49, Tyr50, Leu67, y Lys99. En caso del aminoácido Glu88, experimentó una elevada fluctuación tanto solo en el Nanotransportador, como cuando este se encontró interactuando

con ABZ. Para las fluctuaciones al interactuar con MBZ se observa mayores valores en los aminoácidos Gly47, Ser64, Asp98, y para el caso de PRZ se observó que las fluctuaciones no fueron muy grandes, al observarse que las mayores fluctuaciones fueron en los aminoácidos Lys99, Thr100, Lys101, Val102.



(a)

Figura 3.38: RMSF por residuo de la interacción de la proteína EgFABP1 con Nano-transportador.

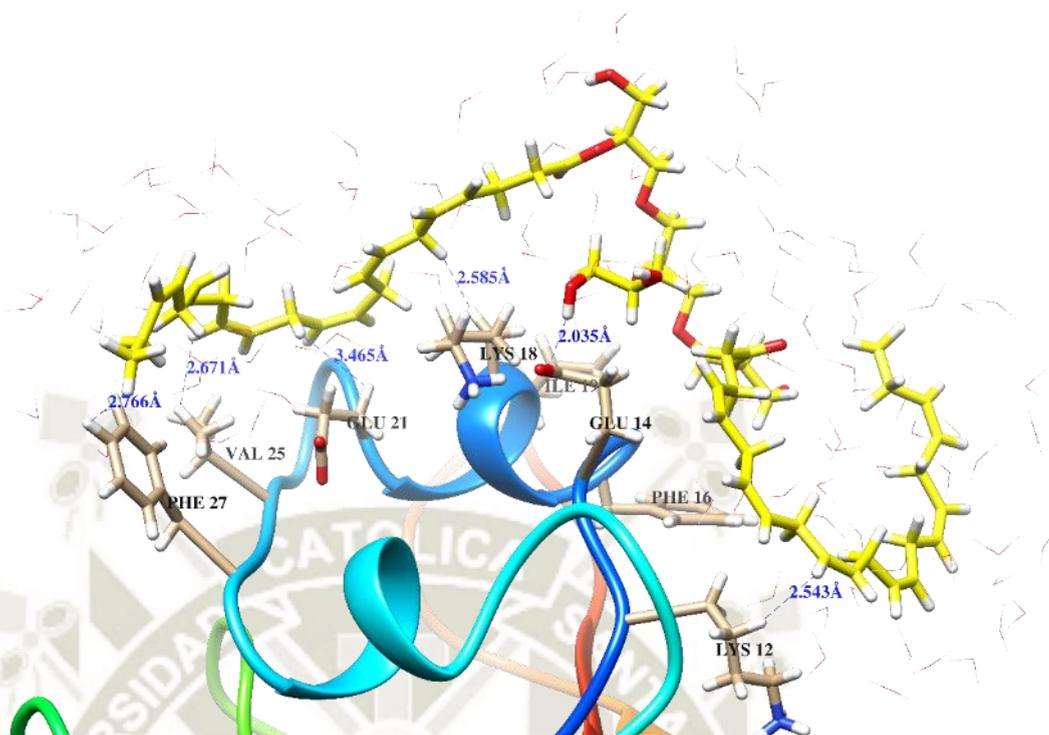


Figura 3.39: Interacción de la proteína EgFABP1 con Nanotransportador.

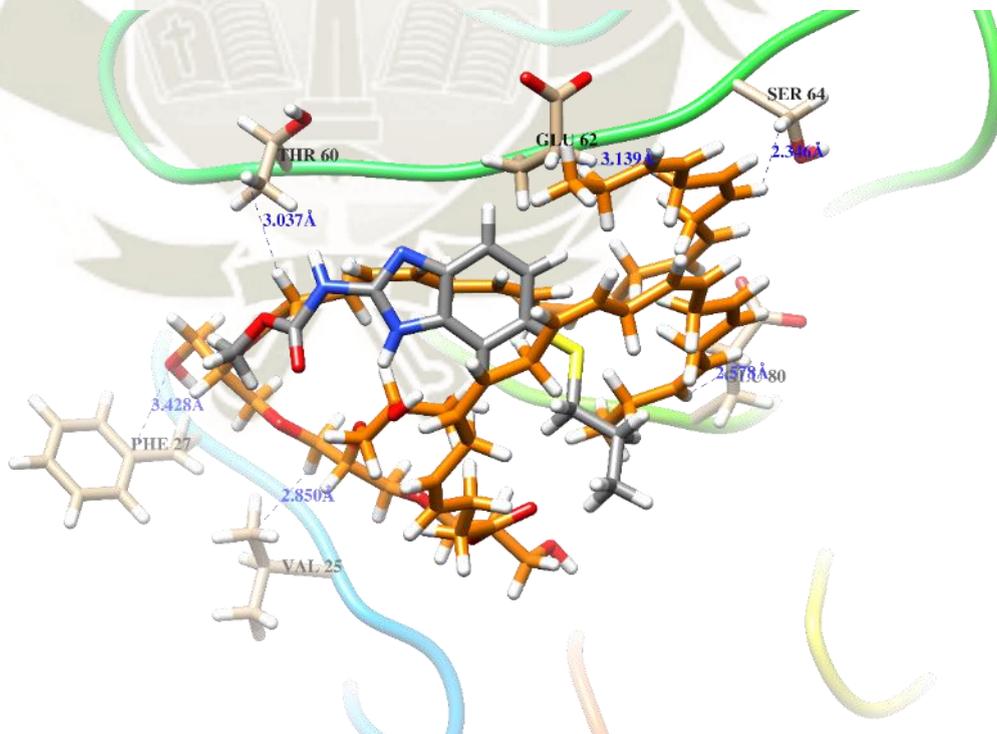


Figura 3.40: Interacción de la proteína EgFABP1 con Nanotransportador-ABZ.

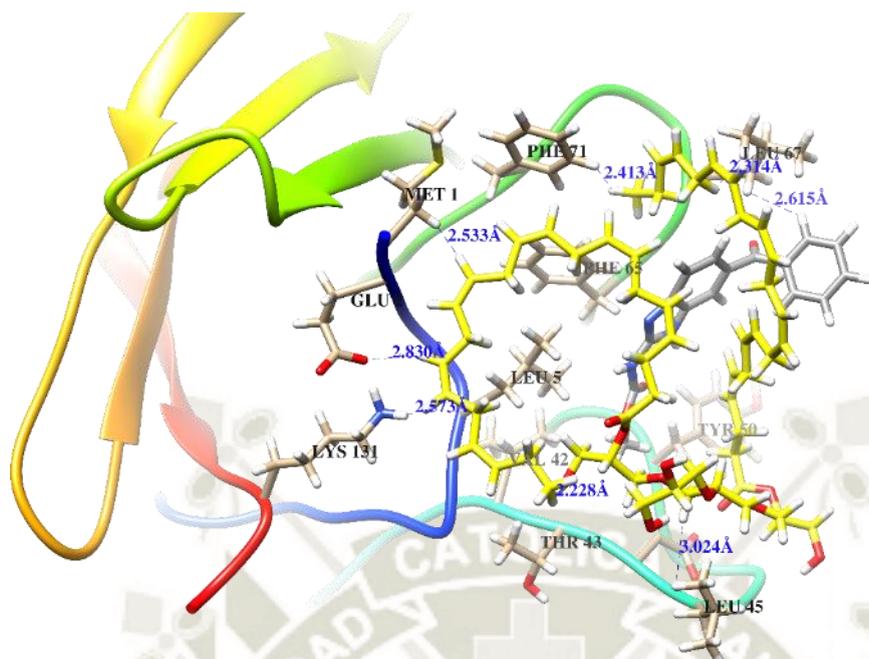


Figura 3.41: Interacción de la proteína EgFABP1 con Nanotransportador-MBZ.

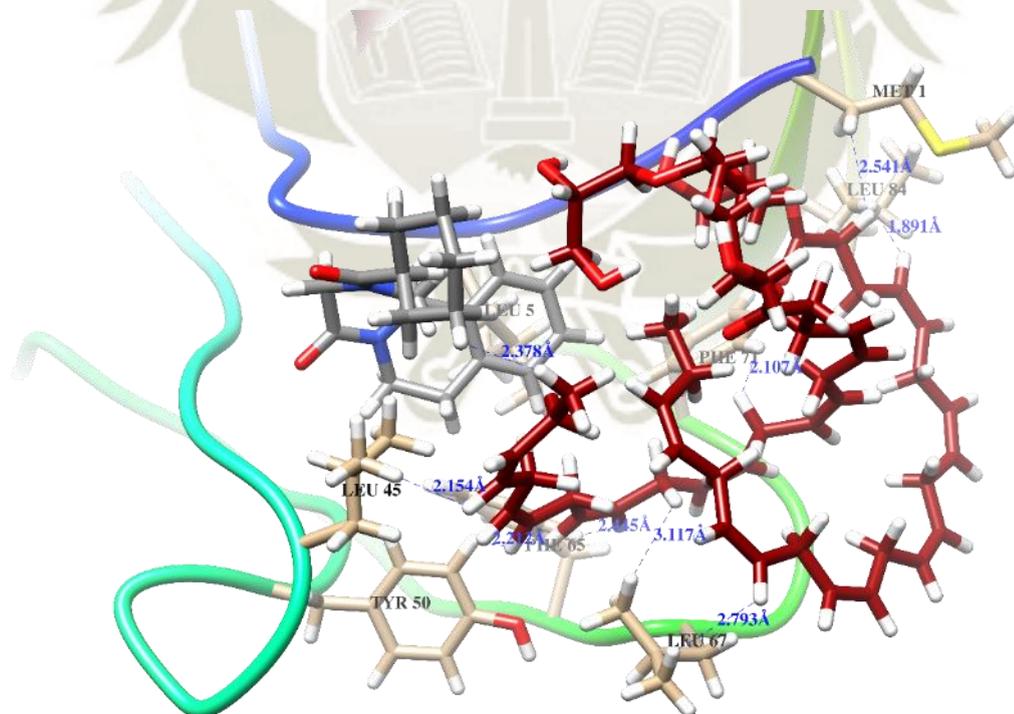


Figura 3.42: Interacción de la proteína EgFABP1 con Nanotransportador-PRZ.

3.14. Análisis de los valores de Energía Libre de Gibbs de la Interacción entre Nanotransportador y la Proteína EgFABP1

Los valores de energía libre de Gibbs obtenida se muestra en la Tabla 3.6, donde se obtuvo un valor de -30.09 ± 0.58 kcal/mol para la interacción entre la proteína EgFABP1 y el nanotransportador solo. De los sistemas con el nanotransportador cargado, se evidencia el mayor valor para el sistema cargado de Praziquantel, donde se obtuvo un valor de -17.93 ± 2.44 kcal/mol.

Tabla 3.6: Valores de ΔG obtenidos en la interacción de la proteína EgFABP1 y los Nanotransportador.

Acoplamiento	ΔG	ΔG^*
EgFABP1 - NAN	-30.09 ± 0.58	-125.90 ± 2.43
EgFABP1 - N(Abz)	-14.66 ± 1.59	-61.34 ± 6.65
EgFABP1 - N(Mbz)	-15.89 ± 1.57	-66.48 ± 6.57
EgFABP1 - N(Prz)	-17.93 ± 2.44	-75.02 ± 10.21

Valores de Energía Libre ΔG (kcal/mol) / ΔG^* (kJ/mol)

Los datos obtenidos se compararon con estudios previos como el de Giovanni Maria Pavan et al.¹⁵⁵, donde se obtuvo valores de energía libre de Gibbs, al acoplar dendrímeros de PAMAM con siRNA; de -11.12 kcal/mol hasta -26.33 kcal/mol de forma teórica y en una diferente escala de pH; y Xiao Xu et al.¹⁵⁶ obtuvo valores teóricos de energía libre de Gibbs de la interacción entre la proteína lisozima y una molécula de dendrímero de poliglicerol terminado en sulfato, de -19.0 ± 0.4 kT hasta -20.3 ± 0.2 kT en sistemas donde se varió 5 veces el número de generaciones del mismo dendrímero.

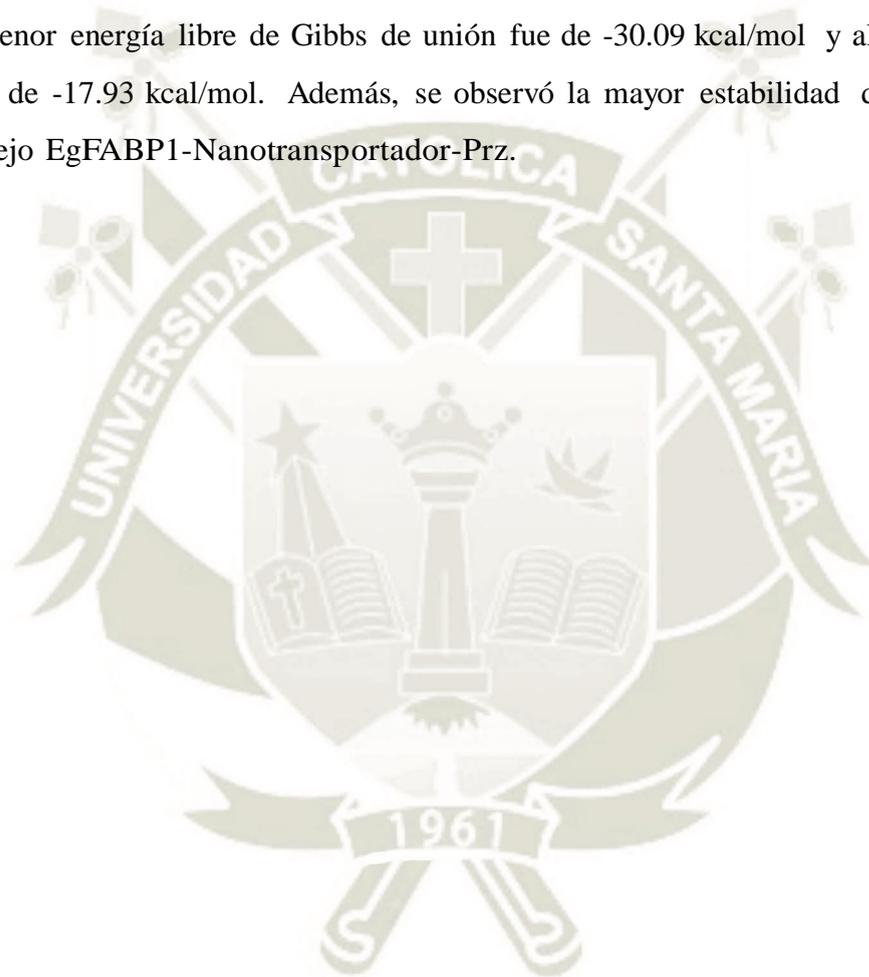
Conclusiones

Primera. En el análisis de la estabilidad molecular de la proteína EgFABP1 se evidenció que su estructura presentaba un equilibrio estructural con un valor de 0.025nm de RMSD, lo que se sustenta en los diagramas de Radio de giro y de Ramachandran. Se observó que la capacidad estructural de interacción está dada por los aminoácidos Phe65, Lys66 y Leu67 de acuerdo a los resultados del RMSF, y fundamentada en la capacidad de formar hasta seis cavidades de interacción.

Segunda. La estructura molecular de los AGPI demostró ser estable tras ser optimizada geoméricamente utilizando Mecánica cuántica; y en Mecánica Molecular al obtener un RMSD equilibrado por cada una de ellas. Por otro lado, es la molécula de DHA la más inestable en esta evaluación, debido a las variaciones observadas en el RMSD. Además, al analizar la reactividad local utilizando la Función de Fukui se determinó que los grupos funcionales carboxilo en cada uno de los AGPI son más reactivos frente a agentes nucleofílicos.

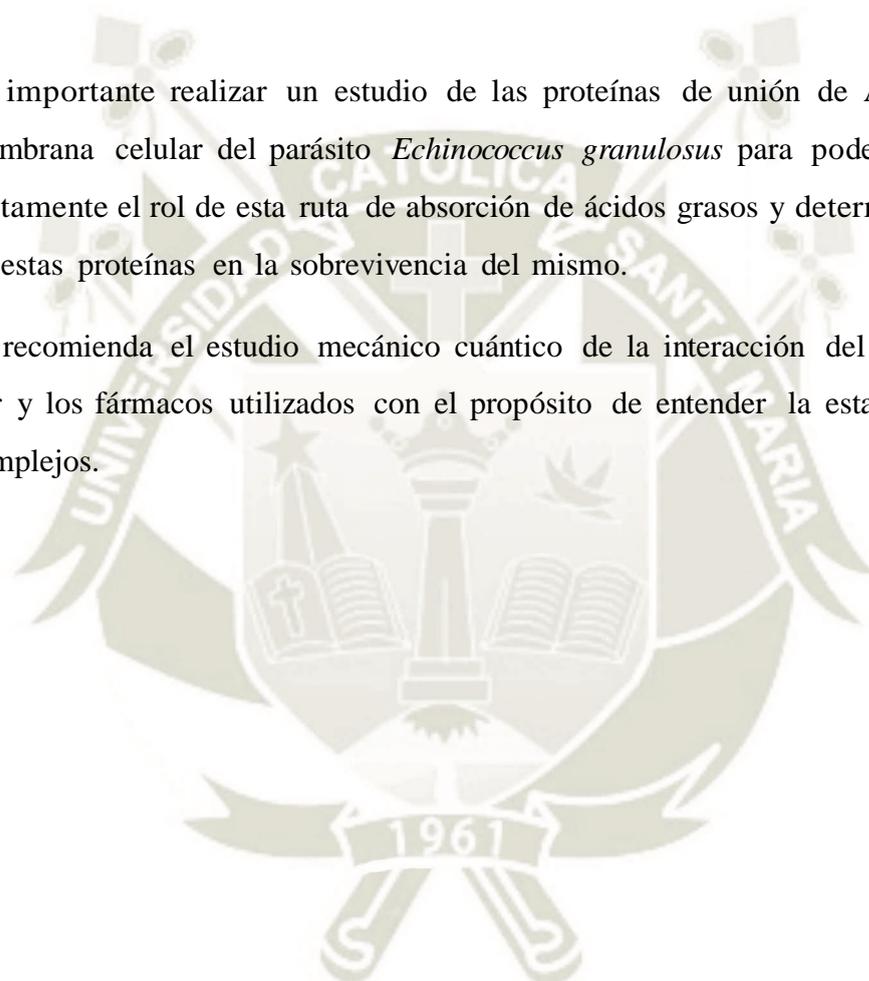
Tercera. El diseño y construcción del nanotransportador se dio con el mayor número de AGPI al dendrímero de poliglicerol, y optimizado geoméricamente utilizando mecánica cuántica y mecánica molecular. Se observó que tras la dinámica molecular el radio de giro permaneció en un promedio aceptable de 0.9 nm, pero con variaciones de abertura del sistema de hasta 3.6 nm, lo que demostró la afinidad entre el Nanotransportador y los fármacos utilizados.

Cuarta. El acoplamiento molecular demostró que la formación de complejos fue de manera espontánea al obtener valores negativos en la energía libre de interacción; y además por la predisposición de las moléculas tanto de AGPI y de los modelos de nanotransportador por regiones electrostáticamente positivas. En el caso de la formación de complejos se observó que la proteína EgFABP1 al interactuar con DHA se mantuvo más estable y obtuvo una menor energía libre de Gibbs tras la dinámica molecular. En la interacción del nanotransportador con la proteína EgFABP1, luego de la dinámica molecular, se encontró que la menor energía libre de Gibbs de unión fue de -30.09 kcal/mol y al interactuar con PRZ fue de -17.93 kcal/mol. Además, se observó la mayor estabilidad de interacción en el complejo EgFABP1-Nanotransportador-Prz.



Recomendaciones

- Es importante realizar un estudio de las proteínas de unión de Ácidos grasos de membrana celular del parásito *Echinococcus granulosus* para poder entender completamente el rol de esta ruta de absorción de ácidos grasos y determinar la función de estas proteínas en la sobrevivencia del mismo.
- Se recomienda el estudio mecánico cuántico de la interacción del nanotransportador y los fármacos utilizados con el propósito de entender la estabilidad de estos complejos.



Referencias Bibliográficas

- [1] Deplazes P., Rinaldi L., Rojas C. A., Torgerson P., Harandi M., Romig T., Antolova D., Schurer J., Lahmar S., and Cringoli G., *Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis*, vol. 95, pp. 315–493. Elsevier, 2017.
- [2] Cabrera R., “Equinococosis quística en el Perú: necesidades de prevención y control de una enfermedad postergada,” *Boletín Epidemiológico*, vol. 50, p. 669, 2007.
- [3] da Silva A. M., “Hydatid cyst of the liver—criteria for the selection of appropriate treatment,” *Acta tropica*, vol. 85, no. 2, pp. 237–242, 2003.
- [4] Hemphill A., Stadelmann B., Rufener R., Spiliotis M., Boubaker G., Müller J., Müller N., Gorgas D., and Gottstein B., “Treatment of echinococcosis: albendazole and mebendazole—what else?,” *Parasite*, vol. 21, p. 70, 2014.
- [5] Alvite G. and Esteves A., “Echinococcus granulosus fatty acid binding proteins subcellular localization,” *Experimental Parasitology*, vol. 164, pp. 1–4, 2016.
- [6] Alvite G., S. Di Pietro M., Santomé J. A., Ehrlich R., and Esteves A., “Binding properties of Echinococcus granulosus fatty acid binding protein,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1533, no. 3, pp. 293–302, 2001.
- [7] Porfido J. L., Alvite G., Silva V., M. Kennedy W., Esteves A., and Corsico B., “Direct interaction between EgFABP1, a fatty acid binding protein from Echinococcus granulosus, and phospholipid membranes,” *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 6, no. 11, p. e1893, 2012.
- [8] Esteves A. and Paulino Zunini M., “In silico studies of Echinococcus granulosus

- FABPs,” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, vol. 31, no. 2, pp. 224–239, 2013.
- [9] Soltani S., Rafiei A. , Ramezani Z., Abbaspour M. R. , Jelowdar A. , and M. S. Kahvaz, “Evaluation of the hydatid cyst membrane permeability of albendazole and albendazole sulfoxide-loaded solid lipid nanoparticles,” *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, no. Inpress, 2016.
- [10] Huynh L., Neale C., Pomès R., and Allen C., “Computational approaches to the rational design of nanoemulsions, polymeric micelles, and dendrimers for drug delivery,” *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, vol. 8, no. 1, pp. 20–36, 2012.
- [11] da Silva Santos S., Igne Ferreira E., and Giarolla J., “Dendrimer prodrugs,” *Molecules*, vol. 21, no. 6, p. 686, 2016.
- [12] Pensel P. E. , Gamboa G. U., Fabbri J. , Ceballos L., Bruni S. S., Alvarez L. I., Allemandi D., Benoit J. P., Palma S. D., and Elissondo M. C., “Cystic echinococcosis therapy: albendazole-loaded lipid nanocapsules enhance the oral bioavailability and efficacy in experimentally infected mice,” *Acta tropica*, vol. 152, pp. 185–194, 2015.
- [13] Razo S. I. V., Anaya E. A., and Ambrosio P. J. E. , “Reverse engineering with bioinformatics algorithms over a sound android covert channel,” in *Malicious and Unwanted Software (MALWARE), 2016 11th International Conference on*, pp. 1–7, IEEE, 2016.
- [14] Robertson E. J., Battigelli A., Proulx C., Mannige R. V., Haxton T. K., Yun L., Whitelam S., and Zuckermann R. N., “Design, Synthesis, Assembly, and Engineering of Peptoid Nanosheets,” *Accounts of chemical research*, vol. 49, no. 3, pp. 379–389, 2016.
- [15] Eckert J., “WHO-OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern,” 2001.
- [16] Agudelo Higueta N. I., Brunetti E., and McCloskey C., “Cystic Echinococcosis,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 54, no. 3, pp. 518–523, 2016.

- [17] Ashour M. H., Hajjar W. M., Ishaq M., Alamassi M., Saleh W., . Al Kattan K. M, and Shoukri M., “Pulmonary hydatid cysts: the naturally occurring models for rupture,” *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals*, vol. 24, no. 7, pp. 670–675, 2016.
- [18] Wang Y., Zhou H., Shen Y., Wang Y., Wu W., Liu H., Yuan Z., Xu Y., Hu Y., and Cao J., “Impairment of dendritic cell function and induction of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells by excretory-secretory products: a potential mechanism of immune evasion adopted by *Echinococcus granulosus*,” *BMC immunology*, vol. 16, no. 1, p. 44, 2015.
- [19] Zheng H., Zhang W., Zhang L., Zhang Z., Li J., Lu G., Zhu Y., Wang Y., Huang Y., and Liu J., “The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*,” *Nature genetics*, vol. 45, no. 10, pp. 1168–1175, 2013.
- [20] Hidalgo C., García M. P., Stoore C., Ramírez J. P., Monteiro K. M., Hellman U., Zaha A., Ferreira H. B., Galanti N., and Landerer E., “Proteomics analysis of *Echinococcus granulosus* protoscolex stage,” *Veterinary parasitology*, vol. 218, pp. 43–45, 2016.
- [21] Vuitton D. A., Zhang W., and Giraudoux P., “*Echinococcus* spp,” 2017.
- [22] Moro P. and Schantz P. M., “Echinococcosis: a review,” *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 13, no. 2, pp. 125–133, 2009.
- [23] Silva-Álvarez V., Franchini G. R., Pórfido J. L., Kennedy M. W., Ferreira A. M., and Córscico B., “Lipid-Free Antigen B Subunits from *Echinococcus granulosus*: oligomerization, ligand binding, and membrane interaction properties,” *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 9, no. 3, p. e0003552, 2015.
- [24] Cong T. T. , Faivre V., Nguyen T. T. , Heras H., Pirot F. , Walchshofer N., Sarciron M.- E., and Falson F., “Study on the hydatid cyst membrane: permeation of model molecules and interactions with drug-loaded nanoparticles,” *International journal of pharmaceuticals*, vol. 353, no. 1, pp. 223–232, 2008.
- [25] Pakala T., Molina M., and Wu G. Y., “Hepatic echinococcal cysts: a review,” *Journal of clinical and translational hepatology*, vol. 4, no. 1, p. 39, 2016.

- [26] Seoane P. I., Rückerl D., Casaravilla C., Barrios A. A., Pittini A., MacDonald A. S., Allen J. E., and Díaz A., “Particles from the *Echinococcus granulosus* laminated layer inhibit IL-4 and growth factor-driven Akt phosphorylation and proliferative responses in macrophages,” *Scientific Reports*, vol. 6, 2016.
- [27] Tercero Gutierrez M. J. and Olalla Herbosa R. , “Hidatidosis. Una zoonosis de distribución mundial,” *Offarm*, vol. 27, no. 9, pp. 88–94, 2008.
- [28] Ye B. and Mehlhorn H., “Discovery of microchannels in host tissues surrounding hydatid cysts,” *Parasitology research*, vol. 114, no. 3, pp. 1245–1246, 2015.
- [29] Basika T., Muñoz N., Casaravilla C., Irigoín F., Batthyány C., Bonilla M., Salinas G., Pacheco J. P. , Roth J. , Duran R., and Diaz A., “Phagocyte-specific S100 proteins in the local response to the *Echinococcus granulosus* larva,” *Parasitology*, vol. 139, no. 2, pp. 271–283, 2012.
- [30] Wang F. and Ye B., “In silico cloning and B/T cell epitope prediction of triosephosphate isomerase from *Echinococcus granulosus*,” *Parasitology research*, vol. 115, no. 10, pp. 3991–3998, 2016.
- [31] McManus D. P., *Echinococcus*, pp. 327–350. CRC Press, 2015.
- [32] Lewall D., “Hydatid disease: biology, pathology, imaging and classification,” *Clinical radiology*, vol. 53, no. 12, pp. 863–874, 1998.
- [33] Youssefi M. R., Mirshafiei S., Moshfegh Z., Soleymani N., and Rahimi M. T., “Cystic echinococcosis is an occupational disease?,” *Journal of Parasitic Diseases*, vol. 40, no. 3, pp. 586–590, 2016.
- [34] Alvarado V. and Trilce F., “Evaluación de una herramienta lúdica en el aprendizaje de la zoonosis por *Echinococcus granulosus* y sus medidas preventivas en escolares de educación primaria de una zona endémica, Junín–Perú,” 2017.
- [35] Merino V., Falcón N., Morel N., and González G., “Detección de coproantígenos de *Echinococcus granulosus* en canes de trabajadores de camales y comercializadores de vísceras en Lima metropolitana,” *Revista Panamericana de Salud Pública*, vol. 41, p. e10, 2017.

- [36] Sánchez E., Cáceres O., Náquira C., Garcia D., Patiño G., Silvia H., Volotão A. C., and Fernandes O., “Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene,” *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 105, no. 6, pp. 806–810, 2010.
- [37] Solomon N., Kachani M., Zeyhle E., and Macpherson C., “The natural history of cystic echinococcosis in untreated and albendazole-treated patients,” *Acta Tropica*, vol. 171, pp. 52–57, 2017.
- [38]. Elizabeth Luz Sánchez Romaní, *Generalidades*, vol. 2, book section 1, pp. 9–13. Lima - Perú: Ministerio de Salud, 2010.
- [39] Ahn C.-S., Han X., Bae Y.-A., Ma X., Kim J.-T. , Cai H., Yang H.-J. , Kang I., Wang H., and Kong Y., “Alteration of immunoproteome profile of *Echinococcus granulosus* hydatid fluid with progression of cystic echinococcosis,” *Parasites & Vectors*, vol. 8, no. 1, p. 10, 2015.
- [40] Amri M. and Touil-Boukoffa C. , “In vitro anti-hydatic and immunomodulatory effects of ginger and [6]-gingerol,” *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 9, no. 8, pp. 749–756, 2016.
- [41] Alam-Eldin Y. H. and Badawy A. F. , “Destructive effect of gamma irradiation on *Echinococcus granulosus* metacestodes,” *Parasitology Research*, vol. 114, no. 8, pp. 3145–3150, 2015.
- [42] Jahanbakhsh S., Azadpour M., A. Kareshk T., Keyhani A., and Mahmoudvand H., “*Zataria multiflora* Bioss: lethal effects of methanolic extract against protoscoleces of *Echinococcus granulosus*,” *Journal of Parasitic Diseases*, vol. 40, no. 4, pp. 1289–1292, 2016.
- [43] . Urrea-Paris M, Moreno M., Casado N., and Rodriguez-Caabeiro F., “*Echinococcus granulosus*: praziquantel treatment against the metacestode stage,” *Parasitology Research*, vol. 85, no. 12, pp. 999–1006, 1999.
- [44] Zheng Y., “Strategies of *Echinococcus* species responses to immune attacks: Im-

- plications for therapeutic tool development,” *International immunopharmacology*, vol. 17, no. 3, pp. 495–501, 2013.
- [45] Umair S., Pernthaner A., Deng Q., Gibson B., Hook S., and Heath D., “Preliminary evaluation of a thermosensitive chitosan hydrogel for *Echinococcus granulosus* vaccine delivery,” *Veterinary Parasitology*, vol. 236, pp. 117–120, 2017.
- [46] Heath D. and Koolaard J., “Serological monitoring of protection of sheep against *Echinococcus granulosus* induced by the EG95 vaccine,” *Parasite immunology*, vol. 34, no. 1, pp. 40–44, 2012.
- [47] Chabalgoity J. A., Harrison J. A., Esteves A., Demarco de Hormaeche R., Ehrlich R., Khan C. M., and Hormaeche C. E., “Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty acid-binding protein in live attenuated *Salmonella* vaccine strains,” *Infection and Immunity*, vol. 65, no. 6, pp. 2402–2412, 1997.
- [48] Franchini G. R., Córscico B., Pórfido J. L., V. Silva, . Ibañez Shimabukuro M, and Burusco F. R. , “Análisis estructural y funcional de proteínas solubles que unen lípidos de parásitos helmintos,” *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, vol. 47, no. 2, pp. 377–384, 2013.
- [49] Franchini G. R., Pórfido J. L., Shimabukuro M. I., M. Burusco F. R., Bélgamo J. A., Smith B. O., Kennedy M. W., and Córscico B., “The unusual lipid binding proteins of parasitic helminths and their potential roles in parasitism and as therapeutic targets,” *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, vol. 93, pp. 31–36, 2015. SI: Special Issue on Cellular Lipid Binding Proteins.
- [50] Brehm K. and Koziol U., “*Echinococcus*–Host Interactions at Cellular and Molecular Levels,” *Advances in Parasitology*, 2016.
- [51] Jakobsson E., Alvite G., Bergfors T., Esteves A., and Kleywegt G. J., “The crystal structure of *Echinococcus granulosus* fatty-acid-binding protein 1,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, vol. 1649, no. 1, pp. 40–50, 2003.
- [52] Bazinet R. P. and Layé S., “Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease,” *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 15, no. 12, pp. 771–785, 2014.

- [53] Catalá A., “Five decades with polyunsaturated fatty acids: chemical synthesis, enzymatic formation, lipid peroxidation and its biological effects,” *Journal of lipids*, vol. 2013, 2013.
- [54] Dai J., Shen J., Pan W., Shen S., and Das U. N., “Effects of polyunsaturated fatty acids on the growth of gastric cancer cells in vitro,” *Lipids in health and disease*, vol. 12, no. 1, p. 71, 2013.
- [55] Caballero R., Gómez R., Núñez L., Vaquero M., Tamargo J., and Delpón E., “Farmacología de los ácidos grasos omega-3,” *Revista Española de Cardiología Suplementos*, vol. 6, no. 4, pp. 3D–19D, 2006.
- [56] Hinzpeter I., Shene C., and Masson Salaué L., “Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3,” 2006.
- [57] Hadley K. B., Ryan A. S., Forsyth S., Gautier S., and Salem N., “The essentiality of arachidonic acid in infant development,” *Nutrients*, vol. 8, no. 4, p. 216, 2016.
- [58] Haghghi F., Galfalvy H., Chen S., Huang Y.-y., Cooper T. B., Burke A. K., M. A. Oquendo, Mann J. J., and Sublette M. E., “DNA methylation perturbations in genes involved in polyunsaturated Fatty Acid biosynthesis associated with depression and suicide risk,” *Frontiers in neurology*, vol. 6, 2015.
- [59] Gorjão R., Azevedo-Martins A. K, Rodrigues H. G., Abdulkader F., Arcisio-Miranda M., Procopio J., and Curi R., “Comparative effects of DHA and EPA on cell function,” *Pharmacology & therapeutics*, vol. 122, no. 1, pp. 56–64, 2009.
- [60] Fernandez M. and Barnard A. S., “Identification of nanoparticle prototypes and archetypes,” *ACS nano*, vol. 9, no. 12, pp. 11980–11992, 2015.
- [61] Bamrungsap S., Zhao Z., Chen T. , Wang L., Li C., Fu T. , and Tan W., “Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system,” *Nanomedicine*, vol. 7, no. 8, pp. 1253–1271, 2012.
- [62] Ilangovan S. S. and Sen S., “Simultaneous inhibition of EGFR and MET receptors with phytochemical conjugated magnetic nanocarriers: in silico and in vitro study,” *RSC Advances*, vol. 6, no. 83, pp. 80121–80132, 2016.

- [63] Sonawane S. J., Kalhapure R. S., Rambharose S., Mocktar C., Vepuri S. B., So liman M., and Govender T. , “Ultra-small lipid-dendrimer hybrid nanoparticles as a promising strategy for antibiotic delivery: In vitro and in silico studies,” *International journal of pharmaceutics*, vol. 504, no. 1, pp. 1–10, 2016.
- [64] Gregory A. E., Williamson D., and Titball R., “Vaccine delivery using nanoparticles,” *Frontiers in cellular and infection microbiology*, vol. 3, p. 13, 2013.
- [65] Mohtashamian S. and Boddohi S., “Nanostructured polysaccharide-based carriers for antimicrobial peptide delivery,” *Journal of Pharmaceutical Investigation*, pp. 1–10, 2016.
- [66] Lee J. H. and Yeo Y., “Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers,” *Chemical engineering science*, vol. 125, pp. 75–84, 2015.
- [67] Nicolas J. , Mura S. , Brambilla D. , Mackiewicz N. , and Couvreur P. , “Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery,” *Chemical Society Reviews*, vol. 42, no. 3, pp. 1147–1235, 2013.
- [68] Sun Q., Ma X., Zhang B., Zhou Z., Jin E., Shen Y., Van Kirk E. A., Murdoch W. J., Radosz M., and Sun W., “Fabrication of dendrimer-releasing lipidic nanoassembly for cancer drug delivery,” *Biomaterials science*, vol. 4, no. 6, pp. 958–969, 2016.
- [69] Khalid A., Persano S., Shen H., Zhao Y., Blanco E., Ferrari M., and Wolfram J., “Strategies for improving drug delivery: nanocarriers and microenvironmental priming,” *Expert opinion on drug delivery*, pp. 1–13, 2016.
- [70] Khodabandehloo H., Zahednasab H., and Hafez A. A., “Nanocarriers usage for drug delivery in cancer therapy,” *Iranian journal of cancer prevention*, vol. 9, no. 2, 2016.
- [71] Zhu Q.-Y., Guissi F., Yang R.-Y., Wang Q., Wang K., Chen D., Han Z.-H., Ma Y., Zhang M., and Gu Y.-Q., “Preparation of Deep Sea Fish Oil-Based Nanostructured Lipid Carriers with Enhanced Cellular Uptake,” *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 15, no. 12, pp. 9539–9547, 2015.

- [72] Zhang W.-B. , Wu X.-L. , Yin G.-Z. , Shao Y. , and Cheng S. Z., “From protein domains to molecular nanoparticles: what can giant molecules learn from proteins?,” *Materials Horizons*, 2017.
- [73] Molla M. R., Rangadurai P., Pavan G. M., and Thayumanavan S., “Experimental and theoretical investigations in stimuli responsive dendrimer-based assemblies,” *Nanoscale*, vol. 7, no. 9, pp. 3817–3837, 2015.
- [74] Cachau R. E. , Gonzalez-Nilo F. D. , Ventura O. N., and Fritts M. J. , “In-silico nanobio-design. A new frontier in computational biology,” *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 7, no. 15, pp. 1537–1540, 2007.
- [75] Vergara-Jaque A. , Comer J. , Monsalve L. , González-Nilo F. D. , and Sandoval, C. “Computationally efficient methodology for atomic-level characterization of dendrimer–drug complexes: a comparison of amine-and acetyl-terminated PA- MAM,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 117, no. 22, pp. 6801–6813, 2013.
- [76] Jones D. E., Ghandehari H., and Facelli J. C., “Predicting cytotoxicity of PAMAM dendrimers using molecular descriptors,” *Beilstein journal of nanotechnology*, vol. 6, no. 1, pp. 1886–1896, 2015.
- [77] Carrasco-Sánchez V. , Vergara-Jaque A. , M. Zuñiga, Comer J. , A. , F. M. , O. Valdes, E. F. Duran-Lara, Sandoval C., and Santos L. S., “In situ and in silico evaluation of amine-and folate-terminated dendrimers as nanocarriers of anesthetics,” *European journal of medicinal chemistry*, vol. 73, pp. 250–257, 2014.
- [78] Sousa-Herves A., Würfel P., Wegner N., Khandare J., Licha K., Haag R., Welker P., and Calderón M., “Dendritic polyglycerol sulfate as a novel platform for paclitaxel delivery: pitfalls of ester linkage,” *Nanoscale*, vol. 7, no. 9, pp. 3923–3932, 2015.
- [79] Bokhary S. A. U. H., Imran M., and Manzoor S., “On molecular topological properties of dendrimers,” *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 94, no. 2, pp. 120–125, 2015.
- [80] Yang Z., Zhang X., Liu X., Guan X., Zhang C., and Niu Y., “Polyglycerol-based

- organic-inorganic hybrid adhesive with high early strength,” *Materials & Design*, vol. 117, pp. 1–6, 2017.
- [81] Tu C., Chen K., Tian W., and Ma Y., “Computational Investigations of a Peptide[U+2010]Modified Dendrimer Interacting with Lipid Membranes,” *Macromolecular rapid communications*, vol. 34, no. 15, pp. 1237–1242, 2013.
- [82] Sharma A., “Short notes on comparison of Molecular docking, Molecular Dynamics and QM/MM methods,” *Journal of Science*, vol. 1, no. 3, pp. 34–44, 2016.
- [83] Ma Y.-q., “Theoretical and computational studies of dendrimers as delivery vectors,” *Chemical Society Reviews*, vol. 42, no. 2, pp. 705–727, 2013.
- [84] Satija J. and Mukherji S., “FUNCTION-ORIENTED MOLECULAR DESIGN: DENDRIMER,” 2017.
- [85] Jain V. and P. Bharatam V. , “Pharmacoinformatic approaches to understand complexation of dendrimeric nanoparticles with drugs,” *Nanoscale*, vol. 6, no. 5, pp. 2476–2501, 2014.
- [86] Martinho N., Florindo H., Silva L., Brocchini S., Zloh M., and Barata T., “Molecular modeling to study dendrimers for biomedical applications,” *molecules*, vol. 19, no. 12, pp. 20424–20467, 2014.
- [87] Chigbo U. J., Ugochukwu A. E., and John D. F., “A review on dendrimers: a new class of nanoscale polymers,” 2017.
- [88] Haddish-Berhane N., Rickus J. L., and Haghghi K., “The role of multiscale computational approaches for rational design of conventional and nanoparticle oral drug delivery systems,” *International journal of nanomedicine*, vol. 2, no. 3, p. 315, 2007.
- [89] Jain K., Sood S., and Gowthamarajan K., “Lipid nanocarriers and molecular targets for malaria chemotherapy,” *Current drug targets*, vol. 15, no. 3, pp. 292–312, 2014.
- [90] Bhaskar S. and Lim S., “Engineering protein nanocages as carriers for biomedical applications,” *NPG Asia Materials*, vol. 9, no. 4, p. e371, 2017.

- [91] Pagliaro M., Ciriminna R., Kimura H., Rossi M., and Della Pina C., “From glycerol to value-added products,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, no. 24, pp. 4434–4440, 2007.
- [92] Kurniasih I. N. , Keilitz J. , and Haag R. , “Dendritic nanocarriers based on hyperbranched polymers,” *Chemical Society Reviews*, vol. 44, no. 12, pp. 4145–4164, 2015.
- [93] Stayton P. S., Hoffman A. Murthy S., N., Lackey C., Cheung C., Tan P. , L. A. Klumb, Chilkoti A., Wilbur F. S., and Press O. W., “Molecular engineering of proteins and polymers for targeting and intracellular delivery of therapeutics,” *Journal of controlled release*, vol. 65, no. 1, pp. 203–220, 2000.
- [94] Kumar V., Sharma R. M., and Thakur R., “Big Data Analytics: Bioinformatics Perspective,” 2016.
- [95] Gore S. P., Burke D. F., and Blundell T. L., “PROVAT: a tool for Voronoi tessellation analysis of protein structures and complexes,” *Bioinformatics*, vol. 21, no. 15, pp. 3316–3317, 2005.
- [96] Baltz R. H., “Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics,” *Nature biotechnology*, vol. 24, no. 12, p. 1533, 2006.
- [97] Martin A. C. and Allen J., “Bioinformatics tools for antibody engineering,” *Handbook of therapeutic antibodies*, pp. 95–117, 2007.
- [98] DiTursi M. K., Kwon S.-J., Reeder P. J., and Dordick J. S., “Bioinformatics-driven, rational engineering of protein thermostability,” *Protein Engineering Design and Selection*, vol. 19, no. 11, pp. 517–524, 2006.
- [99] Chawla S. and Sharma R., “Application of Data Mining in Bioinformatics,” *International Journal of Engineering Science*, vol. 7426, 2016.
- [100] Olivares-Quiroz L. and García-Colín L., “Plegamiento de las proteínas: Un problema interdisciplinario,” *Rev. Soc. Quím Méx*, vol. 48, pp. 95–105, 2004.
- [101] Dymond J. S., Scheifele L. Z., Richardson S., Lee P., Chandrasegaran S., Bader J. S., and Boeke J. D., “Teaching synthetic biology, bioinformatics and engineering to

- undergraduates: the interdisciplinary Build-a-Genome course,” *Genetics*, vol. 181, no. 1, pp. 13–21, 2009.
- [102] Lundgren A. and Kanewala U., “Experiences of testing bioinformatics programs for detecting subtle faults,” in *Proceedings of the International Workshop on Software Engineering for Science*, pp. 16–22, ACM, 2016.
- [103] Peng H., “Bioimage informatics: a new area of engineering biology,” *Bioinformatics*, vol. 24, no. 17, pp. 1827–1836, 2008.
- [104] Bissantz C., Kuhn B., and Stahl M., “A medicinal chemist’s guide to molecular interactions,” *Journal of medicinal chemistry*, vol. 53, no. 14, pp. 5061–5084, 2010.
- [105] Chowdhary M., Rani A., Parkash J., Shahnaz M., and Dev D., “Bioinformatics: an overview for cancer research,” *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, vol. 6, no. 4, pp. 69–72, 2016.
- [106] Mendes P. and Kell D., “Non-linear optimization of biochemical pathways: applications to metabolic engineering and parameter estimation,” *Bioinformatics*, vol. 14, no. 10, pp. 869–883, 1998.
- [107] Jawed M., Jun W. , Jian P. , Li X., and Yan Y., “Bioinformatics Approaches for Improvement of Biohydrogen Production: A Review,” *International Journal of Environmental Science and Development*, vol. 8, no. 1, p. 10, 2017.
- [108] Martí M. A. and Turjanski A. A. , “La bioinformática estructural o la realidad virtual de los medicamentos,” *Química Viva*, vol. 8, no. 1, pp. 25–34, 2009.
- [109] Elstner M. , Frauenheim T. , and Suhai S. , “An approximate DFT method for QM/MM simulations of biological structures and processes,” *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, vol. 632, no. 1, pp. 29–41, 2003.
- [110] Martin L., Bilek M. M., Weiss A. S., and Kuyucak S., “Force fields for simulating the interaction of surfaces with biological molecules,” *Interface focus*, vol. 6, no. 1, p. 20150045, 2016.
- [111] Lara J. and Xu X. , *Computational Methods for Engineering Protein 3D Nano-Objects*, pp. 75–92. CRC Press, 2015.

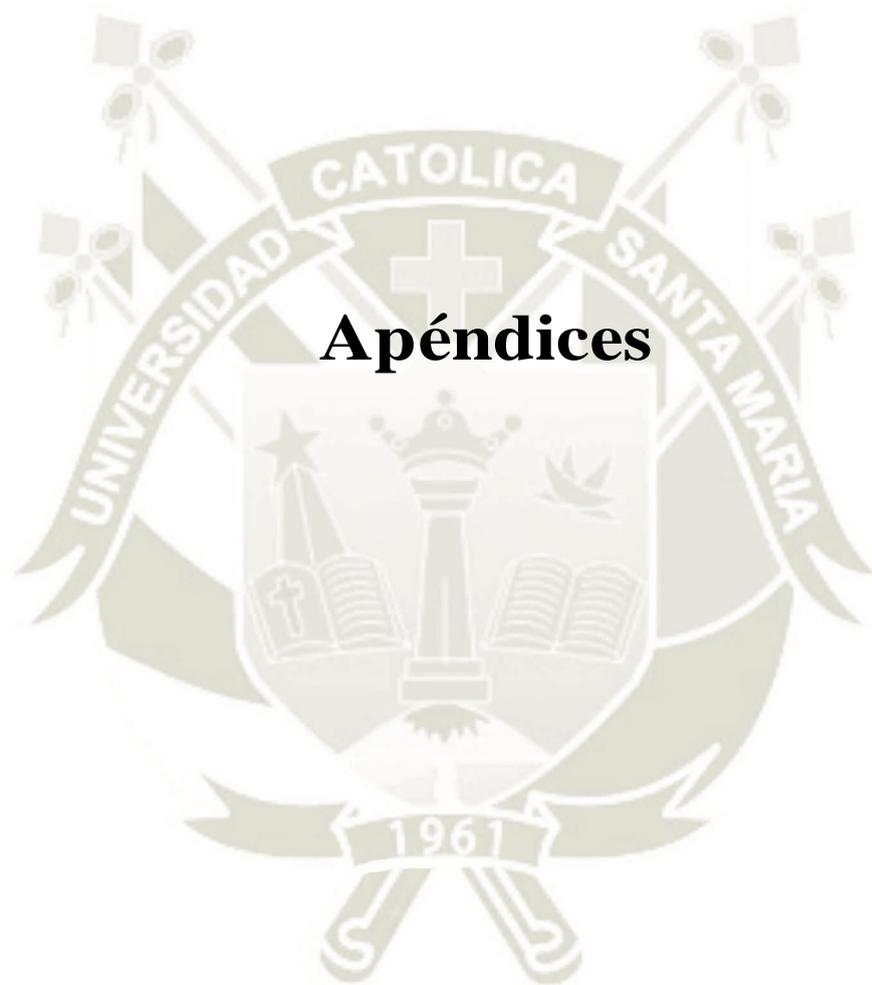
- [112] Green D., “In Silico Drug Discovery and Design. Edited by Claudio N. Cavasotto,” 2016.
- [113] Wang J., Cieplak P., and Kollman P. A., “How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules?,” *Journal of computational chemistry*, vol. 21, no. 12, pp. 1049–1074, 2000.
- [114] MacKerell A. D. Jr, Bashford D., Bellott M., Dunbrack R. L. Jr, Evanseck J. D., M. Field J., Fischer S., Gao J., Guo H., and Ha S., “All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins,” *The journal of physical chemistry B*, vol. 102, no. 18, pp. 3586–3616, 1998.
- [115] Jorgensen W. L., Maxwell D. S., and J Tirado-Rives., “Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 118, no. 45, pp. 11225–11236, 1996.
- [116] Senn H. M. and Thiel W., “QM/MM methods for biomolecular systems,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48, no. 7, pp. 1198–1229, 2009.
- [117] Dybeck E. C., König G., Brooks B. R., and Shirts M. R., “Comparison of Methods To Reweight from Classical Molecular Simulations to QM/MM Potentials,” *Journal of chemical theory and computation*, vol. 12, no. 4, pp. 1466–1480, 2016.
- [118] Li Y. and Hou T., “Computational simulation of drug delivery at molecular level,” *Current medicinal chemistry*, vol. 17, no. 36, pp. 4482–4491, 2010.
- [119] Ganesan A., Coote M. L., and Barakat K., “Molecular dynamics-driven drug discovery: leaping forward with confidence,” *Drug Discovery Today*, vol. 22, no. 2, pp. 249–269, 2017.
- [120] Jones D. E., Lund A. M., Ghandehari H., and Facelli J. C., “Molecular dynamics simulations in drug delivery research: Calcium chelation of G3.5 PAMAM dendrimers,” *Cogent Chemistry*, vol. 2, no. 1, p. 1229830, 2016.

- [121] Mausbach P. and Sadus R. J., “Thermodynamic properties in the molecular dynamics ensemble applied to the Gaussian core model fluid,” *The Journal of chemical physics*, vol. 134, no. 11, p. 114515, 2011.
- [122] Vasilevskaya T. and Thiel W., “Periodic boundary conditions in QM/MM calculations: Implementation and tests,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 12, no. 8, pp. 3561–3570, 2016.
- [123] Parr R. G. and Yang W. , “Density functional approach to the frontier-electron theory of chemical reactivity,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 106, no. 14, pp. 4049–4050, 1984.
- [124] Fuentealba P., Pérez P., and Contreras R., “On the condensed Fukui function,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 113, no. 7, pp. 2544–2551, 2000.
- [125] Olsson M. A. and Ryde U., “Comparison of methods to obtain ligand-binding free energies with QM/MM methods,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2017.
- [126] Chaskar P., Zoete V., and Röhrig U. F., “On-the-Fly QM/MM Docking with Attracting Cavities,” *J. Chem. Inf. Model*, vol. 57, no. 1, pp. 73–84, 2017.
- [127] Ruyck J. de, Brysbaert G., Blossey R., and Lensink M. F., “Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel,” *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC*, vol. 9, p. 1, 2016.
- [128] Chemi G. and Brogi S., “Breakthroughs in Computational Approaches for Drug Discovery,” *J Drug Res Dev*, vol. 3, no. 1, pp. 2470–1009.129, 2017.
- [129] Guallar A. E. Cho, V., Berne B. J., and Friesner R., “Importance of accurate charges in molecular docking: quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) approach,” *Journal of computational chemistry*, vol. 26, no. 9, pp. 915–931, 2005.
- [130] Sharma A. K., Gothwal A., Kesharwani P., Alsaab H., Iyer A. K., and Gupta U., “Dendrimer nanoarchitectures for cancer diagnosis and anticancer drug delivery,” *Drug Discovery Today*, vol. 22, no. 2, pp. 314–326, 2017.

- [131] Pettersen E. F. , Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., and Ferrin T. E., “UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis,” *Journal of computational chemistry*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, 2004.
- [132] Baker N. A., Sept D., Joseph S., Holst M. J., and McCammon J. A., “Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no. 18, pp. 10037–10041, 2001.
- [133] Dolinsky T. J. , Czodrowski P. , Li H., Nielsen J. E., Jensen J. H., Klebe G., and Baker N. A., “PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations,” *Nucleic acids research*, vol. 35, no. suppl_2, pp. W522–W525, 2007.
- [134] Dolinsky T. J., Nielsen J. E., McCammon J. A., and Baker N. A., “PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations,” *Nucleic acids research*, vol. 32, no. suppl_2, pp. W665–W667, 2004.
- [135] Schaftenaar G., Vlieg E., and Vriend G., “Molden 2.0: quantum chemistry meets proteins,” *Journal of computer-aided molecular design*, vol. 31, no. 9, pp. 789–800, 2017.
- [136] Laskowski R. A. and Swindells M. B., “LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery,” 2011.
- [137] Williams T. and Kelley C., “Gnuplot 5.0: An Interactive Plotting Program, Official Gnuplot Documentation. 2015,” 2015.
- [138] Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S., and Olson A. J., “AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility,” *Journal of computational chemistry*, vol. 30, no. 16, pp. 2785–2791, 2009.
- [139] Ritchie D. W. , *Parametric protein shape recognition*. PhD thesis, University of Aberdeen, 1998.

- [140] Ritchie D. W., “Evaluation of protein docking predictions using Hex 3.1 in CAPRI rounds 1 and 2,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 52, no. 1, pp. 98–106, 2003.
- [141] Pronk S., Páll S., R. Schulz, Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M. R., J. Smith C., Kasson P. M., Van Der Spoel D., *et al.*, “GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit,” *Bioinformatics*, vol. 29, no. 7, pp. 845–854, 2013.
- [142] Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., and Lindahl E., “GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers,” *SoftwareX*, vol. 1, pp. 19–25, 2015.
- [143] Frisch M., Trucks G., Schlegel H. B., Scuseria G., Robb M., Cheeseman J., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G., *et al.*, “Gaussian 09, revision a. 02, gaussian,” *Inc., Wallingford, CT*, vol. 200, 2009.
- [144] Dennington R., Keith T., Millam J., Eppinnett K., Hovell W. L., and Gilliland R., “GaussView,” 2009.
- [145] Köster A. , Geudtner G. , Calaminici P. , Casida M. , Dominguez V. , Flores-Moreno R. , Gamboa G., Goursot A., Heine T., Ipatov A., *et al.*, “deMon2k, version 4; The deMon Developers, Cinvestav: Mexico City, 2016,” 2016.
- [146] Le Guilloux V., Schmidtke P., and Tuffery, P. “Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection,” *BMC bioinformatics*, vol. 10, no. 1, p. 168, 2009.
- [147] Chen V. B., Arendall W. B., Headd J. J., Keedy D. A., Immormino R. M., Kapral G. J., L. Murray W., Richardson J. S., and Richardson D. C., “MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography,” *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 66, no. 1, pp. 12–21, 2010.
- [148] Alexey N. and Krasilnikov P. M., “All-atom automatic OPLS-AA topology generator,” 2015.
- [149] Laskowski R. A., Hutchinson E. G., Michie A. D., Wallace A. C., Jones M. L., and Thornton J. M., “PDBsum: a Web-based database of summaries and analyses of

- all PDB structures,” *Trends in biochemical sciences*, vol. 22, no. 12, pp. 488–490, 1997.
- [150] Berman H., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T., Weissig H., Shindyalov I., and Bourne P., “The Protein Data Bank Nucleic Acids Research, 28, 235-242,” *URL: www.rcsb.org Citation*, 2000.
- [151] Kim S., Thiessen P. A., Bolton E. E., Chen J., Fu G., Gindulyte A., Han L., He J., He S., Shoemaker B. A., *et al.*, “PubChem substance and compound databases,” *Nucleic acids research*, vol. 44, no. D1, pp. D1202–D1213, 2015.
- [152] Sunder A., Hanselmann R. , Frey H., and Mülhaupt R. , “Controlled synthesis of hyperbranched polyglycerols by ring-opening multibranching polymerization,” *Macromolecules*, vol. 32, no. 13, pp. 4240–4246, 1999.
- [153] Frey H. and Haag R., “Dendritic polyglycerol: a new versatile biocompatible material,” *Reviews in Molecular Biotechnology*, vol. 90, no. 3-4, pp. 257–267, 2002.
- [154] Richieri G. V., Ogata R. T., and Kleinfeld A. M., “Thermodynamics of fatty acid binding to fatty acid-binding proteins and fatty acid partition between water and membranes measured using the fluorescent probe ADIFAB,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 25, pp. 15076–15084, 1995.
- [155] Pavan G. M., Posocco P., Tagliabue A., Maly M., Malek A., Danani A., Ragg E., Catapano C. V., and Pricl S., “PAMAM dendrimers for siRNA delivery: computational and experimental insights,” *Chemistry-A European Journal*, vol. 16, no. 26, pp. 7781–7795, 2010.
- [156] Xu X. , Ran Q. , Dey P. , Nikam R. , Haag R. , Ballauff M. , and Dzubiella J. , “Counterion-release entropy governs the inhibition of serum proteins by polyelectrolyte drugs,” *Biomacromolecules*, vol. 19, no. 2, pp. 409–416, 2018.



Apéndices

.1. Comandos y Herramientas de Gromacs

Las herramientas de Gromacs utilizados para la minimización de energía y simulación de dinámica molecular fueron:

gmx editconf , el cual definió el área de trabajo alrededor de la estructura molecular simulando una caja de forma cúbica a su alrededor, en donde la centra y establece como un sistema constante;

gmx pdb2gmx permitió elegir el campo de fuerza de acuerdo a las características de la molécula de trabajo y escribe la topología de los átomos, este describe la ubicación espacial de los átomos del sistema, así como los enlaces que realiza, los ángulos que forman y sus diedros; además de establecer el algoritmo correcto de solvente que se utilizó, en este caso el SPC, que considera moléculas de agua de punto simple;

gmx genion que se utilizó para neutralizar la carga de los aminoácidos y con ello hacer el sistema neutro;

gmx grompp , es la herramienta que realizó la lectura de la topología previamente descrita y estableció los parámetros de acuerdo a los algoritmos que se describen en los archivos *.mdp (en este caso para la minimización (minima.mdp), para el colectivo canónico (nvt.mpd) y para el colectivo isotérmico-isobarico (npt.mdp));

gmx mdrun es la herramienta que nos permite ejecutar la dinámica molecular o minimización que se lleva a cabo de acuerdo a los parámetros previamente establecidos. Existen diversas herramientas de análisis presentes en Gromacs, de las cuales se utilizo;

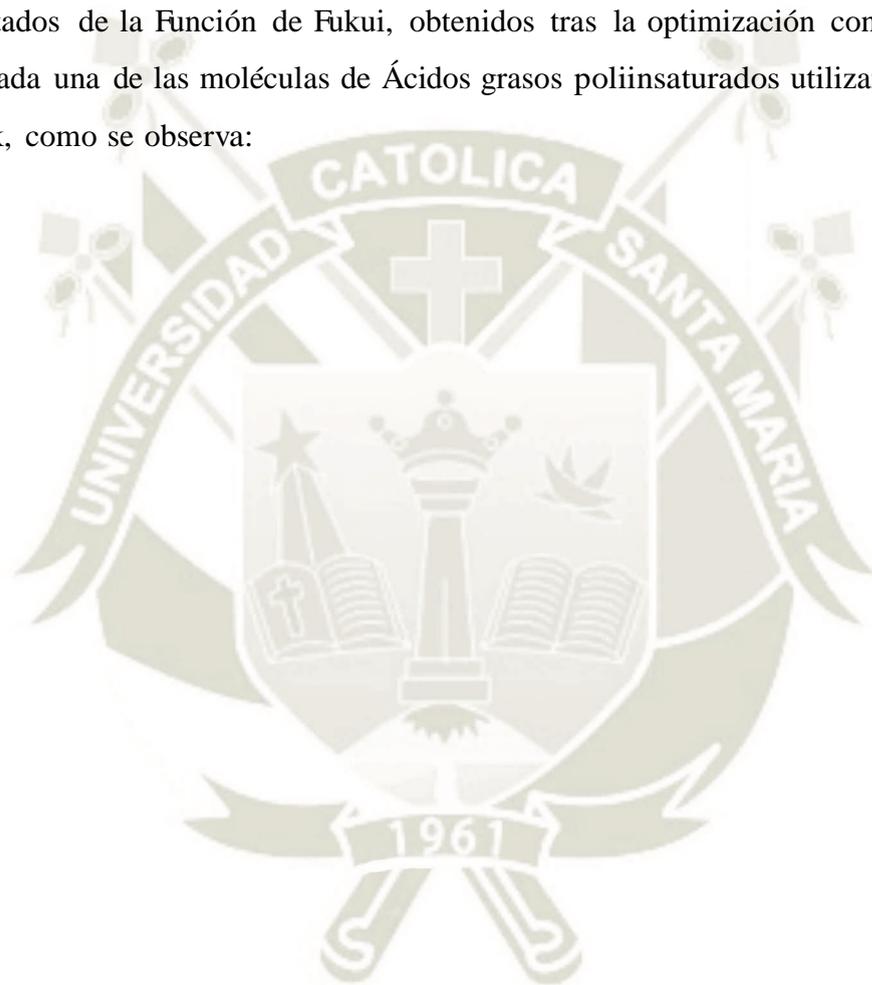
gmx rms que nos proporciona la diferencia de media cuadrática de la molécula que deseamos analizar, con lo que podemos estudiar la estabilidad de la misma durante la etapa de simulación;

gmx rmsf nos permite evaluar las fluctuaciones por residuo o por átomo según sea el caso, de la molécula que estuviéramos estudiando, de dónde podemos estimar las fluctuaciones de movimiento;

gmx gyrate nos permite calcular el radio de giro, de donde se describe a la molécula con un centro de masa establecido y se mide sus fluctuaciones de contracción o expansión sobre sí misma.

.2. Resultados de Mecánica Cuántica

Resultados de la Función de Fukui, obtenidos tras la optimización con mecánica cuántica de cada una de las moléculas de Ácidos grasos poliinsaturados utilizando el programa deMon2k, como se observa:



*** MULLIKEN CONDENSED FUKUI FUNCTIONS ***

Atom	F(HOMO)	F(LUMO)	Average	Difference
C	0.016	0.003	0.010	-0.013
C	-0.008	-0.001	-0.005	0.006
C	0.020	0.001	0.010	-0.020
C	-0.002	0.000	-0.001	0.002
C	-0.005	-0.001	-0.003	0.003
C	0.102	0.004	0.053	-0.098
C	0.084	-0.000	0.042	-0.084
C	-0.007	-0.003	-0.005	0.004
C	0.084	0.006	0.045	-0.078
C	0.114	-0.001	0.056	-0.115
C	-0.021	0.004	-0.009	0.025
C	0.002	0.002	0.002	-0.000
C	0.002	0.000	0.001	-0.001
C	0.000	0.002	0.001	0.001
C	0.000	-0.001	-0.001	-0.001
C	0.001	-0.020	-0.010	-0.020
C	0.004	-0.021	-0.008	-0.024
C	0.002	0.280	0.141	0.279
O	-0.002	0.120	0.059	0.121
O	0.008	0.228	0.118	0.220
H	0.005	0.061	0.033	0.056
H	0.001	0.105	0.053	0.104
H	0.001	0.068	0.035	0.068
H	0.002	0.029	0.016	0.027
H	0.003	0.041	0.022	0.038
H	0.003	0.019	0.011	0.016
H	0.004	0.018	0.011	0.014
H	0.005	0.010	0.008	0.005
H	0.008	0.009	0.008	0.001
H	0.007	0.006	0.006	-0.001
H	0.012	0.006	0.009	-0.006
H	0.024	0.003	0.013	-0.022
H	0.012	0.003	0.008	-0.009
H	0.053	0.001	0.027	-0.052
H	0.019	0.001	0.010	-0.017
H	0.052	0.008	0.030	-0.044
H	0.066	0.000	0.033	-0.066
H	0.046	-0.005	0.021	-0.051
H	0.049	0.004	0.026	-0.045
H	0.048	-0.000	0.024	-0.049
H	0.064	0.005	0.035	-0.059
H	0.008	-0.003	0.003	-0.011
H	0.046	0.005	0.025	-0.042
H	0.029	0.004	0.017	-0.025
H	0.016	0.003	0.010	-0.013
H	0.015	-0.002	0.006	-0.016
H	-0.016	-0.004	-0.010	0.012
H	0.011	-0.002	0.005	-0.013
H	0.012	0.003	0.007	-0.009
H	0.000	0.002	0.001	0.001

Figura 43: Tabla de resultados totales obtenidos de la Función de Fukui de la molécula ALA.

*** MULLIKEN CONDENSED FUKUI FUNCTIONS ***

Atom	F(HOMO)	F(LUMO)	Average	Difference
C	0.006	0.001	0.004	-0.005
C	0.001	0.000	0.001	-0.001
C	0.002	0.001	0.002	-0.001
C	0.002	-0.000	0.001	-0.003
C	-0.017	-0.001	-0.009	0.016
C	0.021	0.003	0.012	-0.018
C	-0.002	-0.000	-0.001	0.002
C	-0.007	-0.004	-0.005	0.003
C	0.075	0.007	0.041	-0.068
C	0.069	-0.001	0.034	-0.069
C	0.002	-0.005	-0.001	-0.007
C	0.098	0.015	0.057	-0.083
C	0.102	0.003	0.053	-0.099
C	-0.012	-0.005	-0.009	0.007
C	0.017	0.049	0.033	0.032
C	0.042	0.027	0.035	-0.015
C	-0.015	0.007	-0.004	0.022
C	0.004	-0.012	-0.004	-0.016
C	0.007	-0.009	-0.001	-0.016
C	0.003	0.233	0.118	0.230
O	0.000	0.099	0.049	0.098
O	0.011	0.193	0.102	0.182
H	0.009	0.053	0.031	0.044
H	-0.004	0.054	0.025	0.059
H	0.007	0.090	0.048	0.083
H	0.015	0.020	0.017	0.006
H	-0.001	0.036	0.017	0.038
H	-0.007	0.017	0.005	0.024
H	0.027	0.027	0.027	-0.000
H	0.034	0.019	0.026	-0.015
H	0.017	0.034	0.025	0.017
H	0.037	-0.003	0.017	-0.040
H	0.037	0.016	0.026	-0.021
H	0.063	0.003	0.033	-0.061
H	0.053	0.016	0.035	-0.037
H	0.049	0.004	0.027	-0.045
H	0.057	-0.007	0.025	-0.064
H	0.054	0.010	0.032	-0.044
H	0.037	0.004	0.020	-0.033
H	0.039	0.002	0.020	-0.037
H	-0.001	-0.007	-0.004	-0.006
H	0.025	0.007	0.016	-0.018
H	0.017	0.006	0.012	-0.011
H	0.010	0.003	0.006	-0.007
H	-0.010	-0.009	-0.010	0.000
H	0.013	0.007	0.010	-0.006
H	0.004	-0.001	0.002	-0.005
H	-0.006	-0.010	-0.008	-0.005
H	0.001	0.002	0.002	0.001
H	0.005	0.006	0.006	0.001
H	0.002	-0.000	0.001	-0.003
H	-0.003	-0.008	-0.006	-0.005
H	-0.000	0.001	0.001	0.002
H	0.010	0.006	0.008	-0.004

Figura 44: Tabla de resultados totales obtenidos de la Función de Fukui de la molécula ARA.

*** MULLIKEN CONDENSED FUKUI FUNCTIONS ***

Atom	F(HOMO)	F(LUMO)	Average	Difference
C	0.003	0.020	0.011	0.016
O	0.002	0.018	0.010	0.015
O	0.003	0.012	0.007	0.008
H	0.006	0.012	0.009	0.006
C	0.003	0.002	0.003	-0.001
H	-0.004	0.005	0.000	0.009
H	0.007	0.014	0.010	0.007
C	-0.002	-0.009	-0.005	-0.007
H	-0.002	0.001	-0.000	0.003
H	0.012	0.023	0.017	0.011
C	-0.007	-0.008	-0.007	-0.001
H	-0.003	0.005	0.001	0.007
H	0.017	0.026	0.021	0.009
C	0.025	0.058	0.042	0.032
C	0.011	0.037	0.024	0.026
H	0.020	0.031	0.025	0.011
H	0.005	0.020	0.013	0.014
C	-0.009	-0.014	-0.011	-0.005
H	0.005	0.017	0.011	0.012
H	0.023	0.026	0.024	0.003
C	0.048	0.071	0.060	0.024
C	0.031	0.064	0.047	0.033
H	0.019	0.034	0.026	0.015
H	0.033	0.038	0.035	0.005
C	-0.009	-0.014	-0.012	-0.005
H	0.018	0.026	0.022	0.008
H	0.031	0.025	0.028	-0.006
C	0.064	0.058	0.061	-0.006
C	0.055	0.069	0.062	0.014
H	0.041	0.032	0.036	-0.009
H	0.034	0.038	0.036	0.003
C	-0.009	-0.012	-0.010	-0.004
H	0.030	0.026	0.028	-0.004
H	0.031	0.015	0.023	-0.016
C	0.059	0.031	0.045	-0.028
C	0.065	0.053	0.059	-0.013
H	0.037	0.018	0.027	-0.019
H	0.041	0.030	0.036	-0.011
C	-0.009	-0.010	-0.010	-0.001
H	0.020	0.004	0.012	-0.016
H	0.033	0.020	0.026	-0.014
C	0.037	0.009	0.023	-0.028
C	0.050	0.024	0.037	-0.026
H	0.038	0.020	0.029	-0.019
H	0.021	0.005	0.013	-0.016
C	-0.005	-0.004	-0.004	0.001
H	0.027	0.014	0.020	-0.013
H	0.001	-0.004	-0.002	-0.005
C	0.018	0.009	0.013	-0.009
H	0.001	-0.001	-0.000	-0.003
H	0.012	0.007	0.009	-0.004
H	0.019	0.011	0.015	-0.008

Figura 45: Tabla de resultados totales obtenidos de la Función de Fukui de la molécula EPA.

*** MULLIKEN CONDENSED FUKUI FUNCTIONS ***

Atom	F(HOMO)	F(LUMO)	Average	Difference
C	0.009	0.003	0.006	-0.005
C	-0.004	-0.001	-0.003	0.003
C	0.005	0.001	0.003	-0.004
C	0.001	-0.000	0.001	-0.002
C	-0.002	-0.000	-0.001	0.002
C	0.015	0.003	0.009	-0.012
C	0.000	-0.002	-0.001	-0.002
C	-0.023	-0.001	-0.012	0.022
C	0.070	0.003	0.037	-0.067
C	0.058	-0.004	0.027	-0.062
C	-0.002	-0.002	-0.002	0.001
C	0.070	0.010	0.040	-0.060
C	0.070	-0.003	0.034	-0.073
C	-0.001	-0.007	-0.004	-0.007
C	0.058	0.019	0.039	-0.039
C	0.073	0.002	0.037	-0.071
C	-0.013	-0.007	-0.010	0.006
C	0.005	0.059	0.032	0.054
C	0.024	0.022	0.023	-0.002
C	-0.008	-0.013	-0.011	-0.005
C	0.003	0.009	0.006	0.006
C	0.004	0.242	0.123	0.238
O	-0.008	0.106	0.049	0.114
O	0.016	0.202	0.109	0.186
H	0.007	0.054	0.030	0.047
H	0.012	0.058	0.035	0.046
H	-0.004	0.068	0.032	0.072
H	0.018	0.035	0.027	0.016
H	-0.010	0.023	0.006	0.033
H	0.022	0.027	0.025	0.005
H	0.010	0.041	0.025	0.031
H	0.023	-0.008	0.008	-0.031
H	0.017	0.020	0.018	0.003
H	0.032	0.019	0.026	-0.013
H	0.047	0.004	0.026	-0.043
H	0.028	0.007	0.017	-0.021
H	0.048	-0.010	0.019	-0.058
H	0.044	0.004	0.024	-0.040
H	0.045	0.011	0.028	-0.035
H	0.023	-0.012	0.005	-0.034
H	0.049	0.009	0.029	-0.040
H	0.030	0.002	0.016	-0.028
H	0.048	0.006	0.027	-0.042
H	0.017	-0.008	0.004	-0.025
H	0.029	0.006	0.018	-0.023
H	0.020	0.004	0.012	-0.016
H	0.012	-0.004	0.004	-0.016
H	0.013	0.004	0.008	-0.009
H	-0.017	-0.003	-0.010	0.014
H	0.013	0.004	0.008	-0.009
H	0.008	0.002	0.005	-0.007
H	-0.015	-0.004	-0.009	0.011
H	0.003	-0.000	0.001	-0.003
H	0.009	0.003	0.006	-0.006
H	0.001	0.001	0.001	-0.000
H	0.000	-0.000	0.000	-0.000

Figura 46: Tabla de resultados totales obtenidos de la Función de Fukui de la molécula
DHA.

.3. Descripción de Archivos para Dinámica molecular

Archivos de extensión *.mdp necesarios para realizar la minimización de energía y dinámica molecular en cada uno de los casos utilizados previamente:

```
title           = Minimizacion
cpp             = /lib/cpp
include        = -I../top
define         =
integrator      = steep
nsteps         = 100000
nstcomm       = 10
emtoll         = 1
emstep        = 0.001
nstcgsteep    = 1000
nstxout       = 10
nstvout       = 10
nstfout       = 0
nstlog        = 1000
nstenergy     = 1000
nstxtcout    = 1
nbgscorr      = 10
xtc-precision = 1000
xtc-grps      =
energygrps    =
cutoff-scheme = Verlet
nstlist       = 10
ns-type       = grid
pbc           = xyz
optimize-fft  = yes
fourierspacing = 0.3
DispCorr      = Ener
constraints   = none
coulombtype   = Cut-off
rlist         = 0.9
rcoulomb      = 0.9
vdwtype       = Cut-off
rvdw          = 0.9
pme-order     = 4
ewald-rtol    = 1e-5
rgbradii     = 0.9
```

Figura 47: Archivo de minimización de energía que contiene la información necesaria para llevar a cabo este proceso.

```
title           = Dinamica Molecular NVT
cpp             = /lib/cpp
include         = -I../top
integrator      = md
dt             = 0.001
nsteps         = 100000000
nstxout        = 1000
nstvout        = 1000
nstlog         = 1000
nstenergy      = 200
nstxout-compressed= 1000
xtc-grps       =
energygrps     =
nstlist        = 10
ns-type        = grid
fourierspacing = 0.30
pme-order      = 4
ewald-rtol     = 1e-5
pbc            = xyz
tcoupl         = nose-hoover
tc-grps        = system
tau-t          = 0.5
ref-t          = 309.65
gen-vel        = yes
gen-seed       = 173529
constraints     = none
cutoff-scheme  = Verlet
coulombtype    = Cut-off
rlist          = 0.9
rcoulomb       = 0.9
vdwtype        = Cut-off
rvdw           = 0.9
```

Figura 48: Archivo *.mdp con la información necesaria para llevar a cabo una dinámica molecular en colectivo canónico.

```
title           = Dinamica Molecular NPT
cpp             = /lib/cpp
include        = -I../top
integrator     = md
dt             = 0.001
nsteps        = 100000000
nstxout       = 1000
nstvout       = 1000
nstlog        = 1000
nstenergy     = 200
nstxout-compressed= 1000
xtc-grps      =
energygrps    =
nstlist       = 10
ns-type       = grid
fourierspacing = 0.30
pme-order     = 4
ewald-rtol    = 1e-5
pbc           = xyz
tcoupl        = Berendsen
tc-grps       = system
tau-t         = 0.5
ref-t         = 309.65
pcoupl        = Berendsen
tau-p         = 1.0
compressibility = 4.5e-5
ref-p         = 1.0
gen-vel       = yes
gen-seed      = 173529
constraints   = none
cutoff-scheme = Verlet
coulombtype   = Cut-off
rlist         = 0.9
rcoulomb      = 0.9
vdwtype       = Cut-off
rvdw          = 0.9
```

Figura 49: Archivo *.mdp con la información necesaria para llevar a cabo una dinámica molecular en colectivo isotérmico-isobárico.

Información contenida en el archivo aminoacids.rtp y ffbondend.itp, conteniendo las cargas atómicas en cada molécula y la información relacionada al campo de fuerza OPLS-AA y la información de diedros:



```

[ ALA ]

[ atoms ]
CX1  opls_135 -0.112  1
CX2  opls_136 -0.066  2
CX3  opls_142 -0.055  3
CX4  opls_142 -0.056  4
CX5  opls_136 -0.068  5
CX6  opls_142 -0.054  6
CX7  opls_142 -0.055  7
CX8  opls_136 -0.068  8
CX9  opls_142 -0.056  9
CJ1  opls_142 -0.055 10
CJ2  opls_136 -0.068 11
CJ3  opls_136 -0.066 12
CJ4  opls_136 -0.067 13
CJ5  opls_136 -0.067 14
CJ6  opls_136 -0.066 15
CJ7  opls_136 -0.067 16
CJ8  opls_136 -0.069 17
CJ9  opls_267  0.210 18
OY1  opls_268 -0.172 18
OY2  opls_269 -0.289 18
HZ1  opls_270  0.182 19
HZ2  opls_140  0.057 17
HZ3  opls_140  0.053 17
HZ4  opls_140  0.038 16
HZ5  opls_140  0.038 16
HZ6  opls_140  0.037 15
HZ7  opls_140  0.037 15
HZ8  opls_140  0.037 14
HZ9  opls_140  0.036 14
HR1  opls_140  0.036 13
HR2  opls_140  0.035 13
HR3  opls_140  0.036 12
HR4  opls_140  0.036 12
HR5  opls_140  0.041 11
HR6  opls_140  0.040 11
HR7  opls_144  0.041  9
HR8  opls_144  0.041 10
HR9  opls_140  0.045  8
HS1  opls_140  0.044  8
HS2  opls_144  0.041  7
HS3  opls_144  0.043  6
HS4  opls_140  0.044  5
HS5  opls_140  0.046  5
HS6  opls_144  0.042  3
HS7  opls_144  0.042  4
HS8  opls_140  0.042  2
HS9  opls_140  0.040  2
HT1  opls_140  0.039  1
HT2  opls_140  0.039  1
HT3  opls_140  0.038  1
    
```

Figura 51: Archivo aminoacids.rtp que contiene la descripción para el campo de fuerza en OPLS-AA de la molécula ALA.

[ARA]

[atoms]

CX1	opls_135	-0.114	1
CX2	opls_136	-0.067	2
CX3	opls_136	-0.068	3
CX4	opls_136	-0.067	4
CX5	opls_136	-0.068	5
CX6	opls_142	-0.055	6
CX7	opls_142	-0.057	7
CX8	opls_136	-0.068	8
CX9	opls_142	-0.054	9
CJ1	opls_142	-0.057	10
CJ2	opls_136	-0.067	11
CJ3	opls_142	-0.056	12
CJ4	opls_142	-0.058	13
CJ5	opls_136	-0.068	14
CJ6	opls_142	-0.053	15
CJ7	opls_142	-0.054	16
CJ8	opls_136	-0.066	17
CJ9	opls_136	-0.064	18
CQ1	opls_136	-0.069	19
CQ2	opls_267	0.210	20
OY1	opls_268	-0.173	20
OY2	opls_269	-0.287	20
HZ1	opls_270	0.183	21
HZ2	opls_140	0.053	19
HZ3	opls_140	0.055	19
HZ4	opls_140	0.038	18
HZ5	opls_140	0.041	18
HZ6	opls_140	0.042	17
HZ7	opls_140	0.043	17
HZ8	opls_144	0.043	16
HZ9	opls_144	0.044	15
HR1	opls_140	0.045	14
HR2	opls_140	0.047	14
HR3	opls_144	0.042	13
HR4	opls_144	0.044	12
HR5	opls_140	0.046	11
HR6	opls_140	0.046	11
HR7	opls_144	0.043	9
HR8	opls_144	0.043	10
HR9	opls_140	0.046	8
HS1	opls_140	0.044	8
HS2	opls_144	0.041	6
HS3	opls_144	0.042	7
HS4	opls_140	0.042	5
HS5	opls_140	0.040	5
HS6	opls_140	0.036	4
HS7	opls_140	0.036	4
HS8	opls_140	0.035	3
HS9	opls_140	0.036	3
HT1	opls_140	0.036	2
HT2	opls_140	0.036	2
HT3	opls_140	0.037	1
HT4	opls_140	0.037	1
HT5	opls_140	0.038	1

Figura 52: Archivo aminoacids.rtp que contiene la descripción para el campo de fuerza en OPLS-AA de la molécula ARA.

[EPA]			
[atoms]			
CX1	opls_267	0.211	1
OY1	opls_269	-0.277	1
OY2	opls_268	-0.181	1
HZ1	opls_270	0.182	2
CX2	opls_136	-0.070	3
HZ2	opls_140	0.056	3
HZ3	opls_140	0.052	3
CX3	opls_136	-0.064	4
HZ4	opls_140	0.042	4
HZ5	opls_140	0.042	4
CX4	opls_136	-0.066	5
HZ6	opls_140	0.044	5
HZ7	opls_140	0.041	5
CX5	opls_142	-0.056	6
CX6	opls_142	-0.052	7
HZ8	opls_144	0.040	6
HZ9	opls_144	0.042	7
CX7	opls_136	-0.068	8
HR1	opls_140	0.045	8
HR2	opls_140	0.045	8
CX8	opls_142	-0.054	9
CX9	opls_142	-0.053	10
HR3	opls_144	0.043	10
HR4	opls_144	0.043	9
CJ1	opls_136	-0.068	11
HR5	opls_140	0.045	11
HR6	opls_140	0.045	11
CJ2	opls_142	-0.054	12
CJ3	opls_142	-0.053	13
HR7	opls_144	0.042	12
HR8	opls_144	0.042	13
CJ4	opls_136	-0.068	14
HR9	opls_140	0.045	14
HS1	opls_140	0.045	14
CJ5	opls_142	-0.054	15
CJ6	opls_142	-0.053	16
HS2	opls_144	0.042	15
HS3	opls_144	0.042	16
CJ7	opls_136	-0.068	17
HS4	opls_140	0.044	17
HS5	opls_140	0.045	17
CJ8	opls_142	-0.056	18
CJ9	opls_142	-0.054	19
HS6	opls_144	0.042	19
HS7	opls_144	0.041	18
CK1	opls_136	-0.067	20
HS8	opls_140	0.042	20
HS9	opls_140	0.041	20
CK2	opls_135	-0.111	21
HT1	opls_140	0.038	21
HT2	opls_140	0.039	21
HT3	opls_140	0.039	21

Figura 53: Archivo aminoacids.rtp que contiene la descripción para el campo de fuerza en OPLS-AA de la molécula EPA.

```

[ DHA ]

[ atoms ]
CX1  opls_135 -0.111  1
CX2  opls_136 -0.067  2
CX3  opls_142 -0.056  3
CX4  opls_142 -0.056  4
CX5  opls_136 -0.068  5
CX6  opls_142 -0.051  6
CX7  opls_142 -0.055  7
CX8  opls_136 -0.068  8
CX9  opls_142 -0.057  9
CJ1  opls_142 -0.058 10
CJ2  opls_136 -0.068 11
CJ3  opls_142 -0.054 12
CJ4  opls_142 -0.054 13
CJ5  opls_136 -0.067 14
CJ6  opls_142 -0.056 15
CJ7  opls_142 -0.057 16
CJ8  opls_136 -0.067 17
CJ9  opls_142 -0.050 18
CQ1  opls_142 -0.054 19
CQ2  opls_136 -0.062 20
CQ3  opls_136 -0.069 21
CQ4  opls_267  0.210 22
OY1  opls_268 -0.176 22
OY2  opls_269 -0.285 22
HZ1  opls_270  0.183 23
HZ2  opls_140  0.054 21
HZ3  opls_140  0.053 21
HZ4  opls_140  0.047 20
HZ5  opls_140  0.042 20
HZ6  opls_144  0.045 19
HZ7  opls_144  0.045 18
HZ8  opls_140  0.047 17
HZ9  opls_140  0.048 17
HR1  opls_144  0.043 15
HR2  opls_144  0.043 16
HR3  opls_140  0.046 14
HR4  opls_140  0.048 14
HR5  opls_144  0.043 13
HR6  opls_144  0.044 12
HR7  opls_140  0.046 11
HR8  opls_140  0.047 11
HR9  opls_144  0.042 10
HS1  opls_144  0.040  9
HS2  opls_140  0.046  8
HS3  opls_140  0.046  8
HS4  opls_144  0.043  6
HS5  opls_144  0.043  7
HS6  opls_140  0.046  5
HS7  opls_140  0.044  5
HS8  opls_144  0.042  3
HS9  opls_144  0.042  4
HT1  opls_140  0.041  2
HT2  opls_140  0.041  2
HT3  opls_140  0.039  1
HT4  opls_140  0.038  1
HT5  opls_140  0.039  1
    
```

Figura 54: Archivo aminoacids.rtp que contiene la descripción para el campo de fuerza en OPLS-AA de la molécula DHA.

[NAN]				[atoms]			
				H27	opls_140	0.060	21
				H28	opls_140	0.060	21
				C23	opls_135	-0.180	22
				H29	opls_140	0.060	22
				H30	opls_140	0.060	22
				H31	opls_140	0.060	22
				C24	opls_491	0.220	23
				H32	opls_469	0.030	23
				C25	opls_157	0.145	24
				H33	opls_140	0.060	24
				H34	opls_140	0.060	24
				C26	opls_182	0.140	25
				H35	opls_185	0.030	25
				H36	opls_185	0.030	25
				O3	opls_154	-0.683	26
				H37	opls_155	0.418	27
				O4	opls_180	-0.400	28
				C27	opls_182	0.140	29
				H38	opls_185	0.030	29
				H39	opls_185	0.030	29
				C28	opls_183	0.170	30
				H40	opls_185	0.030	30
				C29	opls_182	0.140	31
				H41	opls_185	0.030	31
				H42	opls_185	0.030	31
				O5	opls_180	-0.400	32
				O6	opls_180	-0.400	33
				C30	opls_182	0.140	34
				H43	opls_185	0.030	34
				H44	opls_185	0.030	34
				C31	opls_491	0.220	35
				H45	opls_469	0.030	35
				C32	opls_157	0.145	36
				H46	opls_140	0.060	36
				H47	opls_140	0.060	36
				C33	opls_182	0.140	37
				H48	opls_185	0.030	37
				H49	opls_185	0.030	37
				C34	opls_158	0.205	38
				H50	opls_140	0.060	38
				C35	opls_157	0.145	39
				H51	opls_140	0.060	39
				H52	opls_140	0.060	39
				O7	opls_467	-0.330	40
				O8	opls_154	-0.683	41
				H53	opls_155	0.418	42
				O9	opls_169	-0.700	43
				H54	opls_170	0.435	44
				O10	opls_169	-0.700	45
				H55	opls_170	0.435	46
				C36	opls_465	0.510	40
				C37	opls_136	-0.120	47
				H56	opls_140	0.060	47
				H57	opls_140	0.060	47
				C38	opls_136	-0.120	48
				H58	opls_140	0.060	48
				H59	opls_140	0.060	48
				O11	opls_466	-0.430	40
				C39	opls_142	-0.115	49
				H60	opls_144	0.115	49
				C40	opls_142	-0.115	50
				H61	opls_144	0.115	50
				C41	opls_136	-0.120	51
				H62	opls_140	0.060	51
				H63	opls_140	0.060	51
				C42	opls_142	-0.115	52
				H64	opls_144	0.115	52
				C43	opls_142	-0.115	53
				H65	opls_144	0.115	53
				C44	opls_136	-0.120	54
				H66	opls_140	0.060	54
				H67	opls_140	0.060	54
				C45	opls_142	-0.115	55
				H68	opls_144	0.115	55
				C46	opls_142	-0.115	56
				H69	opls_144	0.115	56
				C47	opls_136	-0.120	57
				H70	opls_140	0.060	57
				H71	opls_140	0.060	57
				C48	opls_142	-0.115	58
				H72	opls_144	0.115	58
				C49	opls_142	-0.115	59
				H73	opls_144	0.115	59
				C50	opls_136	-0.120	60
				H74	opls_140	0.060	60
				H75	opls_140	0.060	60
				C51	opls_136	-0.120	61
				H76	opls_144	0.115	62
				C52	opls_136	-0.120	63
				H77	opls_144	0.115	64
				C53	opls_136	-0.120	65
				H78	opls_140	0.060	65
				H79	opls_140	0.060	65
				C54	opls_142	-0.115	66
				H80	opls_144	0.115	66
				C55	opls_142	-0.115	67
				H81	opls_144	0.115	67
				C56	opls_136	-0.120	68
				H82	opls_140	0.060	68
				H83	opls_140	0.060	68
				C57	opls_135	-0.170	69
				H84	opls_140	0.060	69
				H85	opls_140	0.060	69
				H86	opls_140	0.060	69

Figura 55: Archivo aminoacids.rtp que contiene la descripción para el campo de fuerza en OPLS-AA de la molécula NAN (Nanotransportador).

[ABZ]											
[atoms]											
C1	opls_465	0.246	1	H36	opls_185	0.047	25	C47	opls_142	-0.054	58
C2	opls_136	-0.055	2	O3	opls_154	-0.184	26	H72	opls_144	0.042	58
H1	opls_140	0.054	2	H37	opls_155	0.146	27	C48	opls_142	-0.053	59
H2	opls_140	0.063	2	O4	opls_180	-0.164	28	H73	opls_144	0.042	59
C3	opls_136	-0.059	3	C26	opls_182	0.015	29	C49	opls_136	-0.060	60
H3	opls_140	0.042	3	H38	opls_185	0.051	29	H74	opls_140	0.043	60
H4	opls_140	0.044	3	H39	opls_185	0.050	29	H75	opls_140	0.044	60
O1	opls_467	-0.148	1	C27	opls_183	0.035	30	C50	opls_142	-0.053	61
O2	opls_466	-0.236	1	H40	opls_185	0.028	30	H76	opls_144	0.042	61
C4	opls_142	-0.056	4	C28	opls_182	0.001	31	C51	opls_142	-0.054	62
H5	opls_144	0.042	4	H41	opls_185	0.033	31	H77	opls_144	0.043	62
C5	opls_142	-0.048	5	H42	opls_185	0.047	31	C52	opls_136	-0.060	63
H6	opls_144	0.045	5	O5	opls_180	-0.185	32	H78	opls_140	0.043	63
C6	opls_136	-0.059	6	O6	opls_180	-0.196	32	H79	opls_140	0.042	63
H7	opls_140	0.043	6	C29	opls_182	0.005	34	C53	opls_142	-0.058	64
H8	opls_140	0.046	6	H43	opls_185	0.045	34	H80	opls_144	0.039	64
C7	opls_142	-0.059	7	H44	opls_185	0.028	34	C54	opls_142	-0.058	65
H9	opls_144	0.040	7	C30	opls_491	0.046	35	H81	opls_144	0.040	65
C8	opls_142	-0.055	8	H45	opls_469	0.050	35	C55	opls_136	-0.059	66
H10	opls_144	0.042	8	C31	opls_157	0.014	36	H82	opls_140	0.039	66
C9	opls_136	-0.059	9	H46	opls_140	0.050	36	H83	opls_140	0.039	66
H11	opls_140	0.042	9	H47	opls_140	0.042	36	C56	opls_135	-0.104	67
H12	opls_140	0.046	9	C32	opls_182	0.009	37	H84	opls_140	0.036	67
C10	opls_142	-0.055	10	H48	opls_185	0.049	37	H85	opls_140	0.036	67
H13	opls_144	0.042	10	H49	opls_185	0.033	37	H86	opls_140	0.036	67
C11	opls_142	-0.054	11	C33	opls_158	0.038	38	S1	opls_222	-0.036	68
H14	opls_144	0.043	11	H50	opls_140	0.050	38	O12	opls_467	-0.156	69
C12	opls_136	-0.059	12	C34	opls_157	0.008	39	O13	opls_466	-0.292	69
H15	opls_140	0.042	12	H51	opls_140	0.042	39	N1	opls_557	-0.102	70
H16	opls_140	0.046	12	H52	opls_140	0.046	39	N2	opls_559	-0.245	71
C13	opls_142	-0.057	13	O7	opls_467	-0.137	40	N3	opls_901	-0.105	72
H17	opls_144	0.041	13	O8	opls_154	-0.224	41	C57	opls_561	0.035	73
C14	opls_142	-0.056	14	H53	opls_155	0.124	42	C58	opls_560	0.024	74
H18	opls_144	0.041	14	O9	opls_169	-0.245	43	C59	opls_147	-0.023	75
C15	opls_136	-0.059	15	H54	opls_170	0.116	44	C60	opls_145	-0.071	76
H19	opls_140	0.045	15	O10	opls_169	-0.254	45	C61	opls_145	-0.046	77
H20	opls_140	0.044	15	H55	opls_170	0.166	46	C62	opls_558	0.173	78
C16	opls_142	-0.054	16	C35	opls_465	0.240	40	C63	opls_136	-0.068	79
H21	opls_144	0.041	16	C36	opls_136	-0.062	47	C64	opls_145	-0.065	80
C17	opls_142	-0.052	17	H56	opls_140	0.049	47	C65	opls_136	-0.065	81
H22	opls_144	0.042	17	H57	opls_140	0.053	47	C66	opls_135	-0.104	82
C18	opls_136	-0.060	18	C37	opls_136	-0.062	48	C67	opls_465	0.273	69
H23	opls_140	0.043	18	H58	opls_140	0.042	48	C68	opls_468	-0.003	83
H24	opls_140	0.042	18	H59	opls_140	0.041	48	H87	opls_146	0.053	76
C19	opls_142	-0.055	19	O11	opls_466	-0.274	40	H88	opls_562	0.141	84
H25	opls_144	0.040	19	C38	opls_142	-0.059	49	H89	opls_146	0.046	77
C20	opls_142	-0.053	20	H60	opls_144	0.041	49	H90	opls_140	0.036	79
H26	opls_144	0.040	20	C39	opls_142	-0.057	50	H91	opls_140	0.027	79
C21	opls_136	-0.065	21	H61	opls_144	0.039	50	H92	opls_146	0.046	80
H27	opls_140	0.031	21	C40	opls_136	-0.058	51	H93	opls_140	0.034	81
H28	opls_140	0.035	21	H62	opls_140	0.046	51	H94	opls_140	0.033	81
C22	opls_135	-0.101	22	H63	opls_140	0.046	51	H95	opls_140	0.034	82
H29	opls_140	0.030	22	C41	opls_142	-0.057	52	H96	opls_140	0.032	82
H30	opls_140	0.036	22	H64	opls_144	0.040	52	H97	opls_140	0.026	82
H31	opls_140	0.036	22	C42	opls_142	-0.056	53	H98	opls_185	0.166	72
C23	opls_491	0.051	23	H65	opls_144	0.040	53	H99	opls_469	0.056	83
H32	opls_469	0.048	23	C43	opls_136	-0.059	54	H100	opls_469	0.060	83
C24	opls_157	0.014	24	H66	opls_140	0.042	54	H101	opls_469	0.056	83
H33	opls_140	0.038	24	H67	opls_140	0.044	54				
H34	opls_140	0.045	24	C44	opls_142	-0.056	55				
C25	opls_182	0.014	25	H68	opls_144	0.041	55				
H35	opls_185	0.046	25	C45	opls_142	-0.054	56				
				H69	opls_144	0.041	56				
				C46	opls_136	-0.061	57				
				H70	opls_140	0.041	57				
				H71	opls_140	0.044	57				

Figura 56: Archivo aminoacids.rtp que contiene la descripción para el campo de fuerza en OPLS-AA de la molécula NAN y ABZ.

[MBZ]	[atoms]								
	C1	opls_465	0.242	1		C25	opls_182	0.013	25
	C2	opls_136	-0.055	2		H35	opls_185	0.046	25
	H1	opls_140	0.055	2		H36	opls_185	0.046	25
	H2	opls_140	0.062	2		O3	opls_154	-0.218	26
	C3	opls_136	-0.059	3		H37	opls_155	0.140	27
	H3	opls_140	0.042	3		O4	opls_180	-0.166	28
	H4	opls_140	0.044	3		C26	opls_182	0.014	29
	O1	opls_467	-0.149	1		H38	opls_185	0.051	29
	O2	opls_466	-0.259	1		H39	opls_185	0.048	29
	C4	opls_142	-0.058	4		C27	opls_183	0.036	30
	H5	opls_144	0.042	4		H40	opls_185	0.032	30
	C5	opls_142	-0.050	5		C28	opls_182	0.002	31
	H6	opls_144	0.044	5		H41	opls_185	0.033	31
	C6	opls_136	-0.059	6		H42	opls_185	0.047	31
	H7	opls_140	0.045	6		O5	opls_180	-0.185	32
	H8	opls_140	0.046	6		O6	opls_180	-0.198	33
	C7	opls_142	-0.058	7		C29	opls_182	0.010	34
	H9	opls_144	0.041	7		H43	opls_185	0.053	34
	C8	opls_142	-0.056	8		H44	opls_185	0.032	34
	H10	opls_144	0.042	8		C30	opls_491	0.044	35
	C9	opls_136	-0.059	9		H45	opls_469	0.047	35
	H11	opls_140	0.043	9		C31	opls_157	0.010	36
	H12	opls_140	0.044	9		H46	opls_140	0.041	36
	C10	opls_142	-0.055	10		H47	opls_140	0.045	36
	H13	opls_144	0.042	10		C32	opls_182	0.010	37
	C11	opls_142	-0.054	11		H48	opls_185	0.049	37
	H14	opls_144	0.042	11		H49	opls_185	0.034	37
	C12	opls_136	-0.059	12		C33	opls_158	0.038	38
	H15	opls_140	0.043	12		H50	opls_140	0.049	38
	H16	opls_140	0.045	12		C34	opls_157	0.000	39
	C13	opls_142	-0.057	13		H51	opls_140	0.028	39
	H17	opls_144	0.040	13		H52	opls_140	0.041	39
	C14	opls_142	-0.056	14		O7	opls_467	-0.153	40
	H18	opls_144	0.041	14		O8	opls_154	-0.218	41
	C15	opls_136	-0.059	15		H53	opls_155	0.122	42
	H19	opls_140	0.044	15		O9	opls_169	-0.224	43
	H20	opls_140	0.044	15		H54	opls_170	0.126	44
	C16	opls_142	-0.058	16		O10	opls_169	-0.263	45
	H21	opls_144	0.040	16		H55	opls_170	0.134	46
	C17	opls_142	-0.055	17		C35	opls_465	0.243	40
	H22	opls_144	0.040	17		C36	opls_136	-0.056	47
	C18	opls_136	-0.059	18		H56	opls_140	0.060	47
	H23	opls_140	0.044	18		H57	opls_140	0.054	47
	H24	opls_140	0.044	18		C37	opls_136	-0.062	48
	C19	opls_142	-0.060	19		H58	opls_140	0.039	48
	H25	opls_144	0.038	19		H59	opls_140	0.041	48
	C20	opls_142	-0.057	20		O11	opls_466	-0.247	40
	H26	opls_144	0.040	20		C38	opls_142	-0.064	49
	C21	opls_136	-0.058	21		H60	opls_144	0.037	49
	H27	opls_140	0.040	21		C39	opls_142	-0.054	50
	H28	opls_140	0.040	21		H61	opls_144	0.039	50
	C22	opls_135	-0.105	22		C40	opls_136	-0.065	51
	H29	opls_140	0.028	22		H62	opls_140	0.042	51
	H30	opls_140	0.034	22		H63	opls_140	0.041	51
	H31	opls_140	0.034	22		C41	opls_142	-0.060	52
	C23	opls_491	0.047	23		H64	opls_144	0.038	52
	H32	opls_469	0.045	23		C42	opls_142	-0.059	53
	C24	opls_157	0.017	24		H65	opls_144	0.037	53
	H33	opls_140	0.039	24		C43	opls_136	-0.065	54
	H34	opls_140	0.055	24		H66	opls_140	0.039	54
						H67	opls_140	0.038	54
						C44	opls_142	-0.055	55
						H68	opls_144	0.039	55
						C45	opls_142	-0.056	56
						H69	opls_144	0.039	56
						C46	opls_136	-0.061	57
						H70	opls_140	0.042	57
						H71	opls_140	0.044	57
						C47	opls_142	-0.054	58
						H72	opls_144	0.042	58
						C48	opls_142	-0.054	59
						H73	opls_144	0.042	59
						C49	opls_136	-0.060	60
						H74	opls_140	0.043	60
						H75	opls_140	0.044	60
						C50	opls_142	-0.053	61
						H76	opls_144	0.042	61
						C51	opls_142	-0.054	62
						H77	opls_144	0.042	62
						C52	opls_136	-0.060	63
						H78	opls_140	0.043	63
						H79	opls_140	0.042	63
						C53	opls_142	-0.058	64
						H80	opls_144	0.039	64
						C54	opls_142	-0.058	65
						H81	opls_144	0.040	65
						C55	opls_136	-0.059	66
						H82	opls_140	0.039	66
						H83	opls_140	0.039	66
						C56	opls_135	-0.104	67
						H84	opls_140	0.036	67
						H85	opls_140	0.036	67
						H86	opls_140	0.036	67
						O12	opls_180	-0.254	68
						O13	opls_467	-0.155	69
						O14	opls_466	-0.289	69
						N1	opls_557	-0.099	70
						N2	opls_559	-0.233	71
						N3	opls_363	-0.103	72
						C57	opls_561	0.034	73
						C58	opls_560	0.042	74
						C59	opls_147	-0.025	75
						C60	opls_145B	-0.042	76
						C61	opls_145B	-0.046	77
						C62	opls_145	-0.039	78
						C63	opls_558	0.181	79
						C64	opls_141	0.176	80
						C65	opls_147	-0.009	81
						C66	opls_145	-0.036	82
						C67	opls_145	-0.039	83
						C68	opls_145	-0.045	84
						C69	opls_145	-0.045	85
						C70	opls_145	-0.043	86
						C71	opls_465	0.275	69
						C72	opls_468	-0.002	87
						H87	opls_146	0.057	76
						H88	opls_562	0.144	88
						H89	opls_146	0.055	77
						H90	opls_146	0.050	78
						H91	opls_185	0.168	72
						H92	opls_146	0.043	82
						H93	opls_146	0.056	83
						H94	opls_146	0.044	84
						H95	opls_146	0.053	85
						H96	opls_146	0.052	86
						H97	opls_469	0.057	87
						H98	opls_469	0.061	87
						H99	opls_469	0.057	87

Figura 57: Archivo aminoacids.rtp que contiene la descripción para el campo de fuerza en OPLS-AA de la molécula NAN y MBZ.

[PRZ]	[atoms]											
	C1	opls_465	0.242	1	H36	opls_185	0.047	25	H73	opls_144	0.040	59
	C2	opls_136	-0.055	2	O3	opls_154	-0.216	26	C49	opls_136	-0.060	60
	H1	opls_140	0.055	2	H37	opls_155	0.141	27	H74	opls_140	0.045	60
	C1	opls_465	0.243	1	O4	opls_180	-0.163	28	H75	opls_140	0.045	60
	C2	opls_136	-0.055	2	C26	opls_182	0.015	29	C50	opls_142	-0.055	61
	H1	opls_140	0.054	2	H38	opls_185	0.051	29	H76	opls_144	0.038	61
	H2	opls_140	0.062	2	H39	opls_185	0.050	29	C51	opls_142	-0.051	62
	C3	opls_136	-0.059	3	C27	opls_183	0.036	30	H77	opls_144	0.043	62
	H3	opls_140	0.042	3	H40	opls_185	0.030	30	C52	opls_136	-0.060	63
	H4	opls_140	0.044	3	C28	opls_182	0.004	31	H78	opls_140	0.043	63
	O1	opls_467	-0.150	1	H41	opls_185	0.034	31	H79	opls_140	0.042	63
	O2	opls_466	-0.258	1	H42	opls_185	0.049	31	C53	opls_142	-0.059	64
	C4	opls_142	-0.058	4	O5	opls_180	-0.185	32	H80	opls_144	0.039	64
	H5	opls_144	0.042	4	O6	opls_180	-0.195	33	C54	opls_142	-0.057	65
	C5	opls_142	-0.049	5	C29	opls_182	0.010	34	H81	opls_144	0.041	65
	H6	opls_144	0.044	5	H43	opls_185	0.054	34	C55	opls_136	-0.059	66
	C6	opls_136	-0.059	6	H44	opls_185	0.031	34	H82	opls_140	0.039	66
	H7	opls_140	0.045	6	C30	opls_491	0.042	35	H83	opls_140	0.039	66
	H8	opls_140	0.046	6	H45	opls_469	0.043	35	C56	opls_135	-0.104	67
	C7	opls_142	-0.058	7	C31	opls_157	0.014	36	H84	opls_140	0.037	67
	H9	opls_144	0.040	7	H46	opls_140	0.043	36	H85	opls_140	0.036	67
	C8	opls_142	-0.055	8	H47	opls_140	0.049	36	H86	opls_140	0.036	67
	H10	opls_144	0.042	8	C32	opls_182	0.010	37	O12	opls_236	-0.287	68
	C9	opls_136	-0.059	9	H48	opls_185	0.049	37	O13	opls_236	-0.269	69
	H11	opls_140	0.043	9	H49	opls_185	0.033	37	N1	opls_239	-0.096	70
	H12	opls_140	0.044	9	C33	opls_158	0.038	38	N2	opls_239	-0.096	71
	C10	opls_142	-0.055	10	H50	opls_140	0.050	38	C57	opls_149	0.033	72
	H13	opls_144	0.042	10	C34	opls_157	0.007	39	C58	opls_137	-0.026	73
	C11	opls_142	-0.053	11	H51	opls_140	0.039	39	C59	opls_908	-0.001	74
	H14	opls_144	0.043	11	H52	opls_140	0.046	39	C60	opls_136	-0.064	75
	C12	opls_136	-0.059	12	O7	opls_467	-0.147	40	C61	opls_136	-0.066	76
	H15	opls_140	0.043	12	O8	opls_154	-0.221	41	C62	opls_235	0.197	77
	H16	opls_140	0.045	12	H53	opls_155	0.123	42	C63	opls_136	-0.063	78
	C13	opls_142	-0.057	13	O9	opls_169	-0.225	43	C64	opls_136	-0.054	79
	H17	opls_144	0.040	13	H54	opls_170	0.120	44	C65	opls_147	-0.011	80
	C14	opls_142	-0.056	14	O10	opls_169	-0.257	45	C66	opls_908	-0.002	81
	H18	opls_144	0.041	14	H55	opls_170	0.135	46	C67	opls_908	-0.006	82
	C15	opls_136	-0.059	15	C35	opls_465	0.246	40	C68	opls_136	-0.062	83
	H19	opls_140	0.044	15	C36	opls_136	-0.064	47	C69	opls_149	-0.064	84
	H20	opls_140	0.044	15	H56	opls_140	0.048	47	C70	opls_235	0.194	85
	C16	opls_142	-0.058	16	H57	opls_140	0.050	47	C71	opls_147	-0.004	86
	H21	opls_144	0.040	16	C37	opls_136	-0.062	48	C72	opls_145	-0.051	87
	C17	opls_142	-0.055	17	H58	opls_140	0.040	48	C73	opls_145	-0.048	88
	H22	opls_144	0.041	17	H59	opls_140	0.041	48	C74	opls_145	-0.051	89
	C18	opls_136	-0.059	18	O11	opls_466	-0.256	40	C75	opls_145	-0.047	90
	H23	opls_140	0.044	18	C38	opls_142	-0.064	49	H87	opls_140	0.045	72
	H24	opls_140	0.044	18	H60	opls_144	0.038	49	H88	opls_140	0.036	73
	C19	opls_142	-0.059	19	C39	opls_142	-0.052	50	H89	opls_140	0.050	74
	H25	opls_144	0.039	19	H61	opls_144	0.038	50	H90	opls_140	0.050	74
	C20	opls_142	-0.057	20	C40	opls_136	-0.068	51	H91	opls_140	0.037	75
	H26	opls_144	0.040	20	H62	opls_140	0.036	51	H92	opls_140	0.038	75
	C21	opls_136	-0.058	21	H63	opls_140	0.042	51	H93	opls_140	0.036	76
	H27	opls_140	0.039	21	C41	opls_142	-0.059	52	H94	opls_140	0.029	76
	H28	opls_140	0.040	21	H64	opls_144	0.036	52	H95	opls_140	0.039	78
	C22	opls_135	-0.105	22	C42	opls_142	-0.061	53	H96	opls_140	0.031	78
	H29	opls_140	0.027	22	H65	opls_144	0.035	53	H97	opls_140	0.036	79
	H30	opls_140	0.035	22	C43	opls_136	-0.065	54	H98	opls_140	0.036	79
	H31	opls_140	0.034	22	H66	opls_140	0.037	54	H99	opls_140	0.041	81
	C23	opls_491	0.047	23	H67	opls_140	0.043	54	H100	opls_140	0.044	81
	H32	opls_469	0.046	23	C44	opls_142	-0.051	55	H101	opls_140	0.063	82
	C24	opls_157	0.017	24	H68	opls_144	0.040	55	H102	opls_140	0.049	82
	H33	opls_140	0.037	24	C45	opls_142	-0.060	56	H103	opls_140	0.037	83
	H34	opls_140	0.055	24	H69	opls_144	0.038	56	H104	opls_140	0.038	83
	C25	opls_182	0.013	25	C46	opls_136	-0.059	57	H105	opls_140	0.041	84
	H35	opls_185	0.045	25	H70	opls_140	0.045	57	H106	opls_140	0.047	84
					H71	opls_140	0.045	57	H107	opls_146	0.047	87
					C47	opls_142	-0.048	58	H108	opls_146	0.052	88
					H72	opls_144	0.042	58	H109	opls_146	0.051	89
					C48	opls_142	-0.054	59	H110	opls_146	0.052	90

Figura 58: Archivo aminoacids.rtp que contiene la descripción para el campo de fuerza en OPLS-AA de la molécula NAN y PBZ.

CM	CM	CT	CM	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; ARA
HC	CM	CT	CM	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; ARA
CT	CT	CM	HC	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; ATA
CM	CM	CT	CM	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; ATA
HC	CM	CT	CM	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; ATA
CT	CT	CM	HC	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; DHA
CM	CM	CT	CM	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; DHA
HC	CM	CT	CM	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; DHA
CT	CT	CM	HC	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; EPA
CM	CM	CT	CM	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; EPA
HC	CM	CT	CM	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; EPA
C_2	CT	CT	CM	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CA	S	CT	CT	3	3.92459	-3.92459	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CT	OS	C_2	NT	3	1.67360	0.00000	-1.67360	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
C_2	NT	CR	NA	3	41.84000	0.00000	-41.84000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
C_2	NT	CR	NB	3	41.84000	0.00000	-41.84000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
HC	NT	CR	NA	3	0.54601	1.63803	0.00000	-2.18405	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
HC	NT	CR	NB	3	0.54601	1.63803	0.00000	-2.18405	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CR	NT	C_2	OS	3	-3.13800	-3.13800	6.27600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CR	NT	C_2	O_2	3	-3.13800	-3.13800	6.27600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
HC	NT	C_2	OS	3	20.50160	0.00000	-20.50160	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
HC	NT	C_2	O_2	3	20.50160	0.00000	-20.50160	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
NB	CV	CA	CA	3	5.77183	-2.67148	0.95814	-4.05848	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
NB	CV	CA	HA	3	0.97069	2.91206	0.00000	-3.88275	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CW	CV	CA	CA	3	-1.49369	1.49369	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CW	CV	CA	HA	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
N	CT	CT	N	3	19.59994	-21.39070	4.05011	-2.25936	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CA	CT	CT	N	3	-0.76567	2.70705	4.02501	-5.96639	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
N	CT	CT	CA	3	-0.76567	2.70705	4.02501	-5.96639	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
N	CT	C	N	3	19.59994	-21.39070	4.05011	-2.25936	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CT	OS	C_2	NC	3	-3.13800	-3.13800	6.27600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CR	NC	C_2	OS	3	-3.13800	-3.13800	6.27600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CR	NC	C_2	O_2	3	-3.13800	-3.13800	6.27600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
HC	NC	C_2	OS	3	20.50160	0.00000	-20.50160	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
HC	NC	C_2	O_2	3	20.50160	0.00000	-20.50160	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
NA	CW	C1	CA	3	5.77183	-2.67148	0.95814	-4.05848	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
NA	CW	C1	HA	3	0.97069	2.91206	0.00000	-3.88275	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CV	CW	C1	CA	3	-1.49369	1.49369	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CV	CW	C1	HA	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
NB	CV	C1	CA	3	-1.49369	1.49369	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
NB	CV	C1	HA	3	0.97069	2.91206	0.00000	-3.88275	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CW	CV	C1	CA	3	-1.49369	1.49369	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CW	CV	C1	HA	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CA	CA	C1	CW	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CA	CA	C1	HA	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CM	CA	C1	CW	3	-1.49369	1.49369	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CM	CA	C1	HA	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
C1	CA	CM	OS	3	1.04600	-1.04600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
C1	CA	CM	CA	3	-1.49369	1.49369	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CA	CA	CM	OS	3	1.04600	-1.04600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CA	CA	CM	CA	3	-1.49369	1.49369	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CV	C1	CA	CA	3	-1.49369	1.49369	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CV	C1	CA	HA	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
HA	C1	CA	CA	3	58.57600	0.00000	-58.57600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
HA	C1	CA	HA	3	0.97905	2.93716	0.00000	-3.91622	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino
CA	CM	CA	CA	3	-1.49369	1.49369	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	; NaNo_Echino

Figura 59: Archivo ffbonded.itp que describe los diedros formados entre los átomos de las moléculas estudiadas.