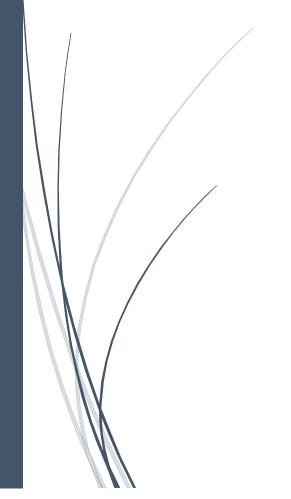
Curso 2019/2020

Simulación del Proceso de Absorción de Cisplatino en una Bicapa Lipídica DOPC mediante Dinámica Molecular Clásica



Lorena Ruano de Domingo TUTOR: JUAN JOSÉ NOGUEIRA

Departamento de Química

# ÍNDICE

1.	AB	3STRACT	
2.	IN'	TRODUCCIÓN	1
		BJETIVOS	
		AN DE TRABAJO	
5.	MI	ÉTODOS TEÓRICOS	4
	5.1.	DINÁMICA MOLECULAR	4
	5.2.	UMBRELLA SAMPLING	6
6.	RE	ESULTADOS	7
	6.1.	MONTAJE Y EQUILIBRADO DEL SISTEMA	8
	6.2.	UMBRELLA SAMPLING	10
	6.3.	ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES INTERMOLECULARES	13
7.	CC	ONCLUSIONES	26
8.	RE	EFERENCIAS	26

#### 1. ABSTRACT

Cisplatin is a widely used compound in chemotherapeutic treatments despite some side effects as its toxicity and resistance mechanisms. This molecule enters the cells through the membrane by passive diffusion interacting with its lipids. The nature of the interactions involved in the diffusion regulates the uptake efficiency of the drugs in the cancer cells and are involved in resistance mechanisms.

This bachelor thesis research is focused on the study and characterization of the interactions that take place in the absorption process of this therapeutic molecule in a dioleoylphosphocholine (DOPC) solvated lipid bilayer, used as model membrane, by means of computational simulations using Classic Molecular Dynamics combined with the enhanced-sampling method called Umbrella Sampling.

The interactions that control the first step of the absorption into the outer region of the membrane are mainly Coulomb interactions with the hydrophilic heads of the lipids, and in particular, with their phosphate group. The free-energy profile shows that this first step is thermodynamically and kinetically favourable. Furthermore, when the cisplatin penetrates more in depth, van der Waals interactions with the non-polar tails of the lipids become more relevant, while Coulomb interactions are largely reduced.

## 2. INTRODUCCIÓN

El cáncer engloba un conjunto de enfermedades producidas por un crecimiento anormal de las células que tienden a proliferar de manera incontrolada, y puede expandirse produciendo metástasis. <sup>1</sup> En muchos tratamientos anticancerígenos de quimioterapia se emplean diferentes complejos de platino (II) como el cisplatino, carboplatino y oxaliplatino (Figura 1), entre otros.

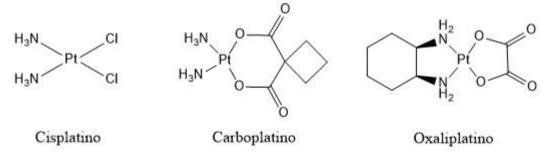


Figura 1. Estructuras del cisplatino (izquierda), carboplatino (centro) y oxaliplatino (derecha).

Este trabajo se va a centrar en el cisplatino o cis-diaminodicloroplatino(II), que es un complejo con estructura plano cuadrada, compuesto por un átomo central de platino (II), coordinado por dos cloruros y dos moléculas de amoníaco en configuración cis, como se puede ver en la Figura 1.<sup>2</sup> Este medicamento se emplea en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, principalmente tumores de cabeza y cuello, y se suministra vía intravenosa.<sup>3</sup> A pesar de su efectividad en ciertos casos, el cisplatino muestra efectos adversos debidos a su toxicidad cuando interacciona con células sanas, y mecanismos de resistencia mediante los cuales el medicamento deja de ser efectivo.<sup>2</sup>

Este compuesto se introduce en las células mediante difusión simple o por difusión facilitada. La difusión simple es un proceso en el que las sustancias pasan a través de la membrana plasmática, por lo que depende del tamaño y de la naturaleza de la molécula. En cambio, la difusión facilitada necesita la presencia de transportadores para la entrada de sustancias al interior celular. Puesto que el cisplatino tiene un tamaño pequeño y no presenta carga neta, éste puede entrar por difusión simple a pesar de su naturaleza hidrofilica.<sup>2</sup> Una vez en el interior de la célula, el cisplatino se activa mediante hidrólisis formando dos complejos cargados positivamente, [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(OH<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> y [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, que son más reactivos que la molécula inicial. Esta reacción de hidrólisis en el citoplasma es una sustitución nucleófila bimolecular (S<sub>N</sub>2), en la que el agua ataca al platino y se liberan los cloruros. Estas moléculas con carga positiva son capaces de interaccionar con especies nucleófilas dentro de la célula, es decir, pueden reaccionar con el ácido desoxirribonucléico (ADN), cargado negativamente, después de atravesar la membrana nuclear y entrar en el núcleo. Durante la reacción del cisplatino activado y el ADN se forma un enlace covalente con el nitrógeno 7 de la guanina (ver Figura 2D), dando lugar a tres tipos de lesiones: monoaductos, cruzamientos intracatenarios y cruzamientos intercatenarios (Figura 2A-C). Los monoaductos se forman primero, cuando se pierde una molécula de agua del agente platinante. Después, la mayoría (90%) suele reaccionar para formar entrecruzamientos, sobre todo intracatenarios, que consiste en la unión covalente del átomo de platino a dos guaninas adyacentes de la misma cadena de ADN. La formación del aducto cisplatino-ADN intracatenario provoca la deformación de la doble hélice hacia el surco mayor, mientras que el cruzamiento intercatenario lo hace hacia el surco menor. Este aducto es reconocido por grupos proteicos HMG (high mobility group), a los que se enlaza de forma no covalente, y se forma entonces el complejo ternario cisplatino-ADN-HMG, que es capaz de bloquear la transcripción y replicación del material genético, iniciando así la muerte celular mediante apoptosis.<sup>3</sup>

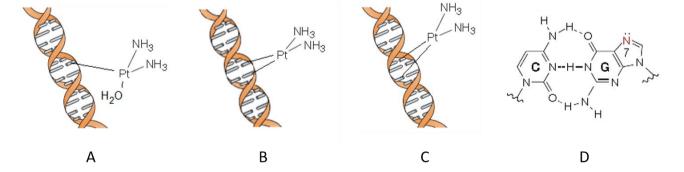


Figura 2. A: Monoaducto. B: Cruzamiento intracatenario. C: Cruzamiento intercatenario. D: Par de bases citosina-quanina.

Además de sus efectos a nivel intracelular, se conoce que los efectos inducidos por el cisplatino empiezan en la membrana plasmática, donde interacciona directamente con proteínas y lípidos causando la alteración de la estructura de la membrana y sus propiedades biofísicas.<sup>2</sup> Las membranas

biológicas están formadas por diferentes dominios, cada uno de ellos con diferentes propiedades biofísicas que afectan a la interacción con los medicamentos. Los mecanismos de interacción complejo de platino-membrana dependen de la estructura del complejo de platino (II) y de la composición lipídica de la membrana. Los complejos de platino (II) aumentan la temperatura de transición de la bicapa, resultando en un incremento del orden de los lípidos en la membrana, reduciendo así la difusión lateral y la fluidez de la membrana. En el caso de los lípidos, la carga del grupo de la cabeza hidrofílica de estos también influye en las interacciones electrostáticas que se establecen entre el platino (II) y los fosfolípidos, resultando en una mayor rigidez y menor fluidez de la membrana. Además, estas interacciones entre el cisplatino y las membranas dependen de varios factores externos como el pH, la concentración de cloruros y la composición de la membrana. Estos cambios en las propiedades biofísicas de la bicapa lipídica alteran su funcionamiento y la respuesta a la quimioterapia, produciendo mecanismos de resistencia.<sup>2</sup> Cualquier evento intracelular que interfiera en la función del cisplatino, inhibirá la apoptosis y dará lugar a resistencia. Los mecanismos de resistencia son consecuencia de cuatro factores principalmente: limitación de los niveles de medicamento; incremento de los niveles de tioles, ya que, el cisplatino una vez solvatado en el interior celular, interacciona fácilmente con este tipo de grupos funcionales; mejora de la reparación del ADN; y fracaso de las rutas de muerte celular.<sup>5</sup>

Como ya se ha mencionado, una de las etapas claves en el modo de acción de estos compuestos de platino es la conducción y la penetración del medicamento dentro de las células cancerígenas. De hecho, la nanotecnología estudia la posibilidad de emplear transportadores de medicamentos que liberen el cisplatino de una manera más controlada. Por ejemplo, se pueden utilizar liposomas que protejan al cisplatino de reaccionar con biomoléculas extracelulares antes de fusionarse con las células cancerígenas liberando su contenido. El uso de la nanotecnología también facilita la posibilidad de modificar la biodistribución del cisplatino permitiendo un mayor tiempo de circulación y la acumulación del fármaco en las células tumorales.<sup>2</sup> El conocimiento de las interacciones intermoleculares entre el medicamento y la membrana es crucial para el diseño de nuevos fármacos, que atraviesen la membrana celular de una manera más eficiente, y para el diseño de nuevos transportadores, que liberen el medicamento en la membrana de una manera más controlada.

#### 3. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es investigar mediante simulaciones computacionales el tipo de interacciones que controlan el proceso de difusión pasiva del cisplatino a través de una membrana modelo dioleil fosfatidil colina (DOPC). Para ello se van a llevar a cabo una serie de objetivos específicos:

• Preparación del montaje del sistema de estudio.

- Equilibrado de la estructura y la densidad del sistema mediante la realización de simulaciones de Dinámica Molecular Clásica.
- Modelización del proceso de absorción del cisplatino en la membrana mediante la realización de simulaciones de *Umbrella Sampling* combinadas con Dinámica Molecular Clásica.
- Cálculo de la energía libre de Gibbs para comprobar si la absorción del cisplatino a través de la membrana plasmática celular es termodinámica y/o cinéticamente favorable.
- Estudio de las interacciones que establece este fármaco con la membrana una vez se encuentre en su interior.

#### 4. PLAN DE TRABAJO

- Semanas 1-2: Búsqueda bibliográfica y lectura sobre el modo de acción del cisplatino en el organismo y sobre los métodos teóricos a emplear.
- Semanas 2-3: Familiarización con los comandos más utilizados en el sistema operativo Linux y aprendizaje de dos programas esenciales: el programa de Dinámica Molecular, *Amber18*, <sup>6</sup> y el programa de visualización, *Visual Molecular Dynamics (VMD)*. <sup>7</sup> Además, estas primeras semanas se preparó y realizó una presentación oral a los integrantes del grupo de investigación del Dr. Juan José Nogueira en el que se está realizando este proyecto.
- Semana 4: Montaje teórico del sistema de estudio: cisplatino y membrana DOPC en una disolución acuosa de KCl.
- Semana 5: Realización de las simulaciones de Dinámica Molecular Clásica para equilibrar la estructura y la densidad del sistema.
- Semanas 6-8: Realización de las simulaciones de *Umbrella Sampling*, para conocer el perfil de energía libre a lo largo del proceso de absorción del cisplatino.
- Semanas 9-13: Análisis de las interacciones intermoleculares que regulan el proceso de absorción.
- Semanas 14-18: Escritura de esta memoria y preparación de la presentación.

## 5. MÉTODOS TEÓRICOS

### 5.1. DINÁMICA MOLECULAR

Las simulaciones de Dinámica Molecular implican el cálculo numérico reiterativo de las fuerzas presentes en todas las partículas que forman el sistema, que regulan el movimiento de dichas partículas. Este movimiento se puede describir mediante las ecuaciones clásicas del movimiento o ecuaciones de Hamilton:<sup>8</sup>

$$\frac{dp_i}{dt} = -\frac{dV(q_i)}{dq_i} \tag{1}$$

$$\frac{dq_i}{dt} = -\frac{dT_i(p_i)}{dp_i} \tag{2}$$

Donde  $p_i$  es el momento lineal del átomo i de un sistema compuesto por N átomos; V es la energía potencial del sistema;  $q_i$  son las coordenadas del átomo i; t es el tiempo; y  $T_i$  es la energía cinética asociada al movimiento del átomo i.

La resolución de estas ecuaciones requiere el cálculo de la derivada de la energía potencial con respecto a las coordenadas de cada uno de los átomos, es decir, el gradiente de energía potencial. Este gradiente puede ser calculado de tres formas diferentes: usando un campo de fuerzas, dando lugar al método de Dinámica Molecular Clásica; resolviendo la ecuación de Schrödinger, teniendo así el método de Dinámica Molecular *ab initio*; o usando una combinación de ambos con Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular (QM/MM, por las iniciales en inglés), en donde parte del sistema es descrito cuánticamente y el resto se calcula de manera clásica. Esta última técnica se denomina Dinámica Molecular QM/MM. En este proyecto, se va a emplear Dinámica Molecular Clásica.

Las ecuaciones (1) y (2) no tienen solución exacta, sino que tienen que ser resueltas numéricamente para conocer la evolución temporal de las coordenadas y momentos. Esta resolución aproximada puede llevarse a cabo empleando una expansión de Taylor alrededor de un punto conocido en el espacio de coordenadas y momentos. Si se tienen en cuenta solamente los términos de orden cero, uno y dos del desarrollo de Taylor, se llega a la siguiente solución que se conoce como "Velocity Verlet Algorithm". 9

$$q(t + \Delta t) = q(t) + \Delta t v(t) - \frac{\Delta t^2}{2m} \frac{dV(t)}{dq}$$
(3)

$$v(t + \Delta t) = v(t) - \frac{\Delta t}{2m} \left( \frac{dV(t + \Delta t)}{dq} + \frac{dV(t)}{dq} \right)$$
(4)

Donde v es la velocidad y m es la masa. Empleando estas ecuaciones se pueden calcular las coordenadas y velocidades a un tiempo  $t + \Delta t$  a partir de las coordenadas y velocidades de un tiempo t anterior cercano para que la resolución aproximada proporcione un resultado preciso.

En Dinámica Molecular Clásica se utiliza un campo de fuerzas para describir las interacciones entre las partículas. Un campo de fuerzas es una ecuación empírica que relaciona la energía potencial del sistema con sus coordenadas internas (distancias de enlace, ángulos, etc.). Habitualmente los campos de fuerzas dividen la energía potencial en interacciones enlazantes y no enlazantes:

$$V_{total} = \sum_{i=1}^{N_{enlace}} V_{enlace} + \sum_{i=1}^{N_{\acute{a}ngulo}} V_{\acute{a}ngulo} + \sum_{i=1}^{N_{diedro}} V_{diedro} + \sum_{i=1}^{N_{no\ enlaz}} V_{no\ enlaz}.$$
 (5)

Los tres primeros términos de esta ecuación forman la energía potencial enlazante, donde las distancias de enlace y los ángulos son descritos por potenciales armónicos, mientras que los ángulos diedros se describen empleando la ecuación de Fourier. Las interacciones no enlazantes tienen tres componentes: interacciones de Coulomb, de van der Waals y de repulsión. Habitualmente, no se tiene en cuenta la polarizabilidad de las moléculas, es decir, la carga de los átomos se considera la misma durante todo el proceso. A este tipo de campos de fuerzas se les conoce como campo de fuerzas con cargas fijas (*fixed-charges forces field*) o no polarizables. Las interacciones de van der Waals y de repulsión son modeladas a partir del potencial de Lennard-Jones, mientras que la interacción entre cargas es descrita por el potencial de Coulomb. Todo ello, se puede observar en la ecuación ( 6 ):<sup>10</sup>

$$V_{total} = \sum_{i=1}^{N_{enlace}} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{i=1}^{N_{ángulo}} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{i=1}^{N_{diedro}} k_t (1 + \cos(n\omega - \gamma))$$

$$+ \sum_{i>j}^{N_{no\ enlaz.}} \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon r_{ij}} + 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$
(6)

En esta ecuación se presentan cuatro términos. En el primero, correspondiente a la energía potencial de las distancias de enlace,  $k_b$  es la constante de fuerza, r es la distancia entre los átomos que se quiere calcular la interacción, y  $r_0$  es la distancia de equilibrio entre dichos átomos. Para el segundo término, que corresponde a la energía potencial de los ángulos,  $k_a$  es la constante de fuerza,  $\theta$  es el ángulo entre los átomos que se quiere calcular la interacción, y  $\theta_0$  el ángulo de equilibrio entre dichos átomos. Para el tercer término, que define la energía potencial de los ángulos diedros o torsiones,  $\omega$  es el ángulo diedro, n es el número de mínimos que presenta la curva de energía potencial,  $k_t$  es la barrera de energía que debe superar para pasar de un mínimo a otro, y  $\gamma$  es el ángulo que determina la posición del mínimo. Para el cuarto término, que define la energía potencial no enlazante, presenta una primera fracción que corresponde a la interacción coulómbica o electrostática, donde  $r_{ij}$  es la distancia entre el átomo i y el átomo j,  $q_i$  y  $q_j$  es la carga tanto del átomo i como el j, y  $\varepsilon$  es la permitividad. La segunda fracción, representa las interacciones repulsivas entre electrones, y la tercera fracción corresponde a las interacciones atractivas de van der Waals, que son interacciones dipolo-dipolo. En ambos casos,  $\sigma_{ij}$  es la distancia entre los átomos i y j cuando la energía potencial es cero y  $\varepsilon_{ij}$  es la energía de interacción atractiva máxima entre los átomos.

#### 5.2. UMBRELLA SAMPLING

La Dinámica Molecular Clásica es capaz de simular eventos que tienen lugar en cientos de nanosegundos o incluso unos pocos microsegundos, pero para eventos más lentos, como es el caso

del proceso de absorción del cisplatino en la membrana plasmática, es necesario el uso de técnicas de muestreo más eficientes, como las simulaciones de *Umbrella Sampling*.

Para asegurar un muestreo eficiente a lo largo de toda la coordenada de reacción  $\xi$ , que en este proyecto es la distancia entre el cisplatino y el centro de masas de la membrana, esta variable se divide en diferenciales llamados ventanas. En cada una de las ventanas se aplica un potencial *bias*,  $\omega_i(\xi)$ , para mantener el sistema dentro de la respectiva ventana (Figura 3). Se suele emplear un potencial *bias* armónico (ecuación (7)) con una constante de fuerza k, que debe ser lo suficientemente grande para superar la barrera de potencial al ir avanzando a lo largo de las ventanas, pero no demasiado porque causaría distribuciones muy estrechas a lo largo de la coordenada de reacción, necesitándose un número muy elevado de ventanas. Para cada una de estas ventanas se calcula la función de distribución  $P_i^b$  de la coordinada de reacción, y a partir de la ecuación (8), se calcula la energía libre del sistema,  $A_i$ , <sup>11</sup> siendo  $F_i$  una constante de integración,  $F_i = -\left(\frac{1}{\beta}\right) \ln\left(\exp[-\beta\omega_i(\xi)]\right)$ , y  $\beta$  la inversa de la constante de Boltzmann multiplicada por la temperatura  $1/k_BT$ .

$$\omega_i(\xi) = k/2(\xi - \xi_i^{ref})^2 \tag{7}$$

$$A_i(\xi) = -(1/\beta) ln P_i^b(\xi) - \omega_i(\xi) + F_i$$
(8)

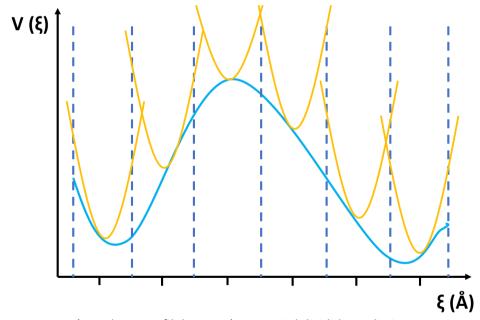


Figura 3. Figura esquemática de un perfil de energía potencial dividido en distintas ventanas centradas en sus respectivos puntos de referencia y los potenciales armónicos aplicados en cada una de ellas.

#### 6. RESULTADOS

En esta sección se procederá a explicar cómo se ha realizado el montaje y equilibrado del sistema de estudio. Posteriormente, se detallará cómo se ha llevado a cabo la simulación del proceso de absorción

del cisplatino mediante *Umbrella Sampling* y, por último, se explicarán los análisis realizados sobre las interacciones que gobiernan dicho proceso.

## 6.1. MONTAJE Y EQUILIBRADO DEL SISTEMA

El sistema ha sido montado con la ayuda del programa CHARMMGUI.<sup>12</sup> La bicapa lipídica está constituida por 144 moléculas de DOPC por cada capa. Un espesor de 25 Å de moléculas de agua ha sido añadido a cada lado de la bicapa lipídica. Al sistema se le ha incluido una cantidad de iones K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> correspondiente a una concentración de 0,15 M de KCl para reproducir la concentración fisiológica de esta sal. Finalmente, la molécula de cisplatino ha sido posicionada manualmente a una distancia de 35 Å del centro de masas de la membrana con la ayuda del módulo *tleap* de AmberTools19,<sup>6</sup> dando como resultado un sistema de 34535 átomos. La membrana lipídica ha sido descrita por el campo de fuerzas Lipid17, que es una combinación de Lipid11 y Lipid14,<sup>13,14</sup> las moléculas de agua mediante el modelo TIP3P,<sup>15</sup> y los iones K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> con parámetros presentes en la literatura,<sup>16</sup> mientras que el cisplatino ha sido modulado con parámetros descritos con anterioridad por el Grupo MoBioChem del Dr. Juan José Nogueira, de forma que algunos de estos parámetros se han cogido de moléculas similares previamente parametrizadas y otros se han escogido de manera que reproduzcan las frecuencias de vibración cuánticas de la molécula.

Después del montaje se ha llevado a cabo una simulación de Dinámica Molecular Clásica en tres etapas: minimización, calentamiento y producción. El primer paso a realizar es una minimización durante 10000 pasos, cuyo objetivo es encontrar un mínimo de energía local cercano a la estructura inicial, proporcionando una estructura energéticamente razonable a partir de la cual iniciar las simulaciones posteriores.

El siguiente paso es el calentamiento, cuyo objetivo es calentar el sistema a la temperatura deseada, en este caso 300 K, manteniendo el número de partículas, el volumen y la temperatura constantes, lo que se conoce como "NVT ensemble". Es muy importante mantener el volumen constante para evitar que el sistema se disocie durante el calentamiento. Para el control de la temperatura se emplea el termostato de Langevin, que modifica las ecuaciones del movimiento para describir colisiones y fricción entre partículas mediante términos que dependen de la temperatura. En este caso, el calentamiento hasta 300 K se realiza en tres etapas, en las que se aumentan 100 K en cada una para que el proceso no sea tan agresivo y así, evitar la destrucción de la membrana. El proceso completo dura 300 ps, por lo que cada etapa constituye 100 ps del tiempo total. Además, durante el calentamiento se han aplicado unas constantes de fuerza de 10 kcal/mol sobre los lípidos y de 5 kcal/mol sobre el cisplatino para restringir un poco su movimiento y así evitar cambios bruscos de conformación que provoquen la ruptura del sistema o movimientos poco realistas.

Después del calentamiento, para asegurar que el proceso de producción va a empezar en la temperatura deseada, se lleva a cabo una fase de pre-equilibrado mediante la realización de tres simulaciones consecutivas, cada una de 4 ns en el "NVT ensemble", en las que se han reducido gradualmente las constantes de fuerza de los lípidos: 10 kcal/mol en la primera, 5 kcal/mol en la segunda y 0 kcal/mol en la tercera.

Por último, se realiza la producción durante 100 ns, cuyo objetivo es equilibrar la densidad y la estructura del sistema manteniendo la temperatura y presión constantes, mediante el empleo del termostato de Langevin y el barostato de Berendsen, y variando el volumen, lo que se conoce como "NPT ensemble". La constante de fuerza del cisplatino se ha mantenido en 5 kcal/mol.

Una vez realizados todos los pasos descritos, el sistema debe estar equilibrado y estable. Esto se puede comprobar al observar la Figura 4, en donde se representa la evolución de varias propiedades a lo largo de la simulación.

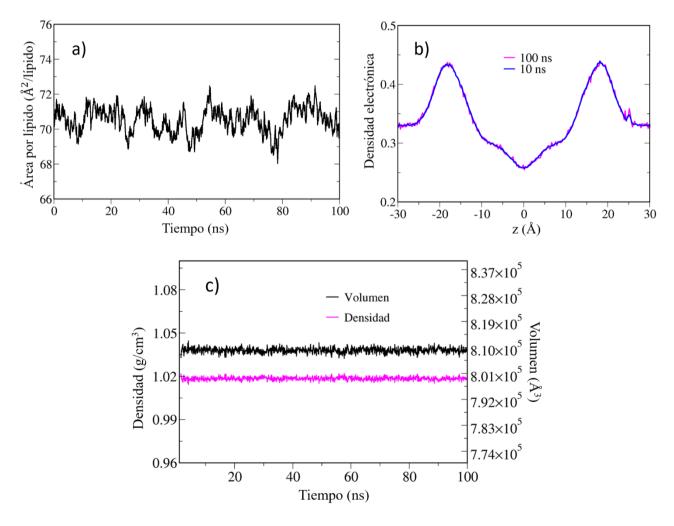


Figura 4. (a) Variación del área por lípido durante 100 ns. (b) Variación de la densidad electrónica de la membrana lipídica a lo largo del espesor de la membrana después de 10 y 100 ns. (c) Variación de la densidad y el volumen durante 100 ns.

En la Figura 4a, donde se representa el área por lípido a lo largo de los 100 ns, se puede ver cómo esta área no varía demasiado, manteniéndose en torno a 71 Ų/lípido. La estabilidad del sistema se puede corroborar también con la Figura 4b, donde está representada la densidad electrónica de la membrana celular a lo largo de la coordenada z, que es la coordenada que recorre el espesor de la membrana. Como el sistema de estudio es una bicapa lipídica, el primer pico que se observa corresponde a las cabezas de los lípidos de la primera capa, donde se encuentran átomos con mayor densidad electrónica, como N, O y P. Posteriormente se observa un descenso debido a las colas de los lípidos, que presentan átomos con menor número de electrones, H y C, y de nuevo otro pico, debido a las cabezas lipídicas de la segunda capa de lípidos. Además, se ve cómo las densidades electrónicas de los primeros 10 ns y los 100 ns de simulación son prácticamente iguales. Esto se debe a que la membrana está estabilizada y no cambia su estructura a lo largo de la simulación.

Por último, en la Figura 4c, se puede observar cómo funciona la producción. Como se ha comentado anteriormente, este paso se emplea para equilibrar la densidad del sistema. Se puede observar que, tanto la densidad como el volumen se mantienen prácticamente constantes alrededor de  $1,02 \text{ g/cm}^3 \text{ y}$   $8,1\cdot10^5 \text{ Å}^3$ , respectivamente.

#### 6.2. UMBRELLA SAMPLING

Una vez se ha comprobado que el sistema está equilibrado y es estable, se procede a la realización de la simulación del proceso de absorción del cisplatino en la membrana mediante *Umbrella sampling*. Para ello, se dividen los 34,5 Å que componen la coordenada de reacción, que es la distancia entre el cisplatino y el centro de masas de la membrana, en 69 ventanas de 0,5 Å de espesor, y en cada una de ellas se realiza una simulación de dinámica molecular durante 15 ns, y con una constante de fuerza de 5 kcal/mol en el potencial *bias* para mantener al sistema dentro de cada ventana.

Para comprobar que se ha llevado a cabo un buen muestreo, se realiza la representación de la función de distribución de la coordenada de reacción para algunas de estas ventanas, Figura 5, donde se puede observar el buen solapamiento que existe entre dichos diferenciales, asegurando así un adecuado muestreo a lo largo de toda la coordenada de reacción. Además, el cálculo del perfil de energía potencial a lo largo de la coordenada de reacción solamente es correcto si existe solapamiento entre el espacio de coordenadas de ventanas consecutivas.

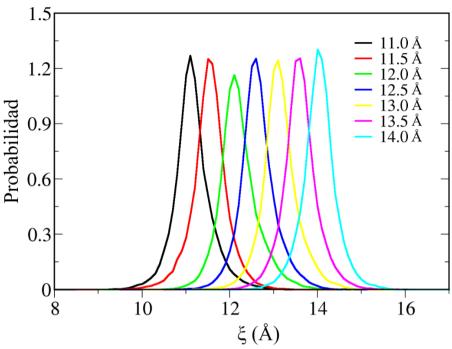


Figura 5. Función de distribución de la coordenada de reacción para algunas ventanas.

Posteriormente se calcula el perfil de energía libre de Gibbs y se representa frente a la coordenada de reacción. Cuando el sistema cambia de una ventana a otra, es probable que requiera de un cierto tiempo de equilibrado. Para comprobar qué tiempo de equilibrado por ventana es necesario, en la Figura 6 se representa la energía libre para distintos tiempos de simulación por ventana, en donde se ha eliminado el primer nanosegundo de cada ventana, los dos primeros nanosegundos de cada ventana, y así sucesivamente. Se puede observar que todas las curvas son prácticamente iguales, indicando que no es necesario demasiado tiempo de equilibrado por ventana para obtener resultados convergidos. Aun así, para no correr riesgos, en futuros análisis se eliminarán los primeros 3 nanosegundos de simulación de cada ventana. De la misma manera, se ha llevado a cabo un análisis similar del perfil de energía libre para comprobar que el tiempo de simulación por ventana de 15 ns es suficiente para obtener una energía libre convergida. Para ello, en la Figura 7 se representa el perfil de energía libre para distintos tiempos de simulación que, en este caso, se va incrementando en fracciones de 1 ns. Se puede observar que después de 4 o 5 ns la curva ya está convergida. Por tanto, el tiempo simulado por ventana de 15 ns es más que suficiente para obtener resultados fiables.

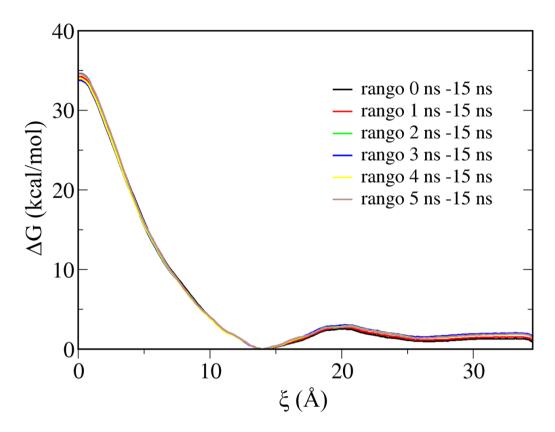


Figura 6. Perfil de energía libre de 0 ns a 5 ns.

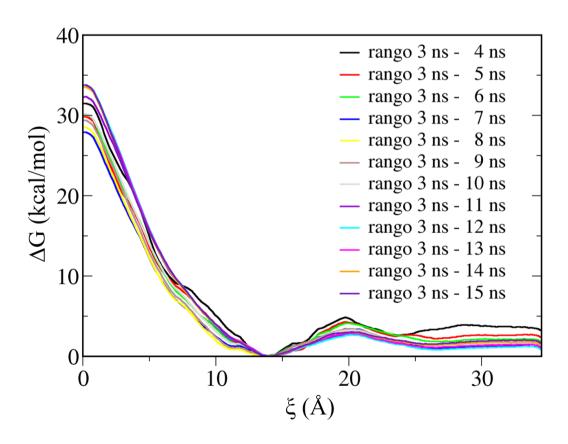


Figura 7. Perfil de energía libre de 3 ns a 15 ns.

Observando la curva de energía libre de 3 ns a 15 ns de la Figura 7, se puede ver a 26,0 Å un primer mínimo muy poco profundo en donde el cisplatino está fisisorbido, un máximo a 20,0 Å debido a la repulsión causada por la penetración del cisplatino, y un mínimo absoluto a 13,5 Å, en donde el cisplatino se encuentra cómodo. Por último, se observa un aumento de la energía libre hasta llegar al máximo absoluto a 0 Å, en donde el cisplatino se encuentra en la mitad de la bicapa.

El proceso de absorción hasta el mínimo absoluto es termodinámica y cinéticamente favorable porque la energía en este punto es menor que la energía de la molécula en el exterior de la membrana y, además, la barrera de energía es baja, 4 kcal/mol aproximadamente. En cambio, el proceso de penetración completa hasta el citoplasma, es probable que sea termodinámicamente neutro porque la energía dentro y fuera de la célula será muy parecida, ya que el perfil de energía libre sería la Figura 7 más su imagen especular para cubrir la membrana completa, pero desde un punto de vista cinético, no es nada favorable puesto que la barrera de energía de 34 kcal/mol es muy elevada. Si se emplea la ecuación de Arrhenius para calcular el tiempo de reacción de un proceso con una barrera tan alta, se obtiene un tiempo de reacción de varios años, valor que se sabe que no se corresponde con los valores experimentales, ya que este fármaco se emplea actualmente como tratamiento del cáncer. Esto lleva a pensar en la posibilidad de que el campo de fuerzas no esté describiendo adecuadamente las interacciones con las colas de los lípidos, que es donde probablemente dominan las interacciones de polarización no descritas por el campo de fuerzas de cargas fijas empleado.

## 6.3. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES INTERMOLECULARES

El siguiente paso es analizar el tipo de interacciones que tienen lugar entre el cisplatino y la membrana lipídica a lo largo del proceso de absorción. En la Figura 8, se puede observar el perfil de energía libre del sistema de estudio en cinco puntos importantes a lo largo de la coordenada de reacción: mínimo de fisisorción (Min1), el mínimo absoluto (Min2), el máximo de energía que separa a los dos mínimos (Max), el máximo absoluto que corresponde al centro de la bicapa (Max2), y un punto intermedio entre el mínimo y el máximo absoluto (Int). Además, en la Figura 8 también se listan los 10 residuos lipídicos que experimentan interacciones más importantes con el cisplatino. Estos residuos se dividen en cabezas polares (PC en azul, utilizando la nomenclatura del campo de fuerzas). La energía de interacción total con las cabezas y las colas listadas en los recuadros es mostrada, junto con su descomposición en energía de Coulomb y de van der Waals en paréntesis en unidades de kcal/mol. Se puede ver como al acercarse el cisplatino a la membrana (parte derecha de la Figura 8), las interacciones más relevantes tienen lugar con las cabezas de los lípidos (PC, azul), y según va penetrando la molécula en la bicapa (yendo hacia la izquierda), empiezan a ser importantes las interacciones con las colas de los lípidos (OL, rojo). Además, también se observa que la energía de

interacción con las cabezas está dominada por interacciones de Coulomb, mientras que las interacciones con las colas, lo están por interacciones de van der Waals. Esto puede ser de nuevo un indicativo de que el campo de fuerzas no reproduce muy adecuadamente las interacciones a partir del mínimo absoluto puesto que, generalmente, los campos de fuerza reproducen de forma bastante exacta las interacciones electroestáticas o de Coulomb, pero fallan cuando existe un grado elevado de polarización. Este puede ser el motivo de la barrera de energía tan elevada que se obtiene en el máximo absoluto, como se ha comentado anteriormente, aunque con los resultados actuales es solamente una especulación.

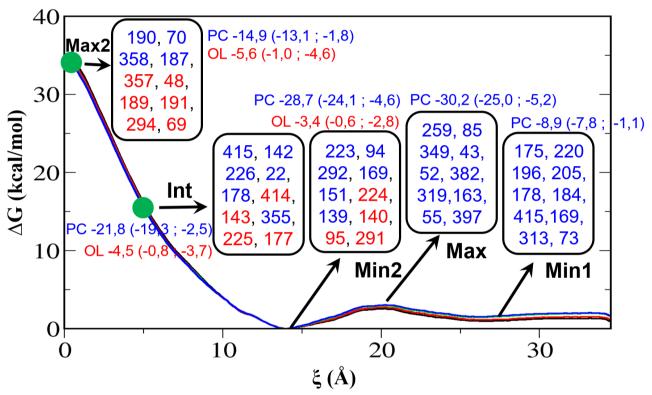


Figura 8. Perfil de energía libre con los residuos lipídicos que interaccionan de manera más fuerte con el cisplatino en cinco puntos importantes a lo largo de la coordenada de reacción.

A continuación, se analiza la evolución temporal de la energía de interacción entre el cisplatino y algunos residuos lipídicos relevantes para cada uno de los cinco puntos a lo largo de la coordenada de reacción descritos arriba. Además, también se investiga si esta energía de interacción guarda correlación con el número de contactos entre el cisplatino y el residuo. Se considera que existe un contacto si la separación entre un átomo del cisplatino y un átomo del lípido es menor a 5 Å. En la Figura 9, se presentan la variación temporal de la energía de interacción y de los contactos de los dos residuos PC más importantes del mínimo relativo. Para ambos residuos se obtienen representaciones similares, por lo que se va a explicar el caso del residuo 175. En la Figura 9a, en la cual se presenta la variación temporal de la energía, se observa la presencia de interacciones en torno a 10 ns y de 12 a 15 ns. Si ahora se compara este comportamiento de la energía de interacción con la Figura 9c, en donde se representa la variación temporal del número de contactos, se puede apreciar que en los

mismos intervalos de tiempo en los que se producen los contactos, es cuando hay interacciones y la energía del sistema disminuye, haciéndose más estable. Lo mismo ocurre para los dos residuos lipídicos más importantes en el máximo relativo (Max) representados en la Figura 10, pero en este caso, los contactos para ambos residuos son más duraderos en el tiempo, ya que el cisplatino se encuentra cerca de las cabezas de los lípidos y más en el interior de la membrana que en el mínimo relativo (Min1).

En la Figura 11, donde se representa el comportamiento de los dos residuos más importantes del mínimo absoluto (Min2), se puede observar que los contactos están presentes durante todo el tiempo de la simulación, produciendo además interacciones bastante elevadas y negativas, lo que indica que el cisplatino se encuentra ahora en el interior de la membrana, e interacciona de manera favorable con las cabezas polares lipídicas. El siguiente punto, al que se le ha llamado punto intermedio (Int), está situado a 5,0 Å en la coordenada de reacción. En este caso, representado en la Figura 12, se muestran los residuos PC y OL más importantes. El residuo polar 415, Figura 12a y c, presenta contactos durante los 15 ns y, además, las interacciones son elevadas. En cambio, para el residuo no polar 414, se puede ver que aunque hay contactos durante todo el tiempo de simulación, Figura 12d, éstos no son efectivos, ya que como se puede observar en la Figura 12b, la energía de las interacciones es muy pequeña. Además, al contrario que en todos los casos anteriormente descritos, las interacciones de van der Waals tienen mayor importancia que las interacciones electrostáticas o de Coulomb.

Por último, para el máximo absoluto, Figura 13, se muestran también los residuos PC y OL más importantes. Ambos residuos experimentan contactos con el cisplatino durante la mayor parte del tiempo (Figura 13c y d), pero sólo en el caso del residuo PC las interacciones son efectivas, como se ve en la Figura 13a. Para el residuo OL, no lo son y, además, las interacciones de Coulomb no son relevantes (Figura 13b), al igual que ocurría para el residuo OL 414 en el punto intermedio (Int).

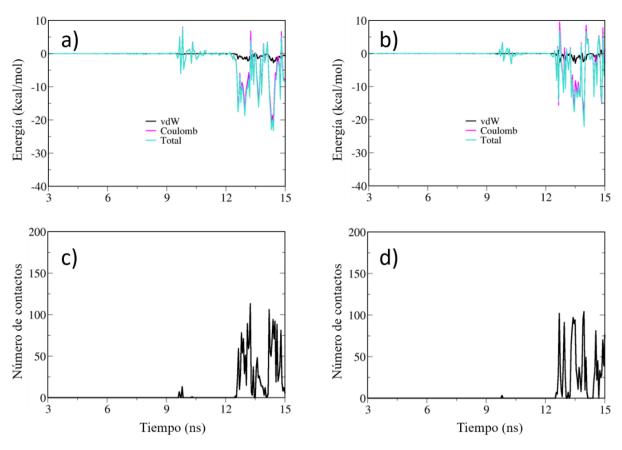


Figura 9. Mínimo relativo. (a), (b): Evolución temporal de la energía de interacción para los dos residuos PC más importantes. (c), (d): Evolución temporal de los contactos para los dos residuos PC más importantes.

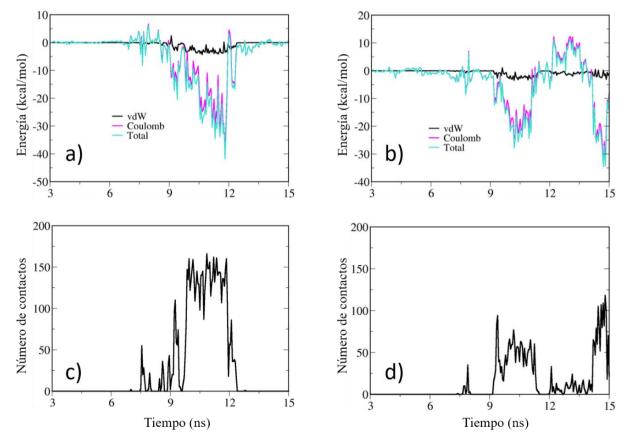


Figura 10. Máximo relativo. (a), (b): Evolución temporal de la energía de interacción para los dos residuos PC más importantes. (c), (d): Evolución temporal de los contactos para los dos residuos PC más importantes.

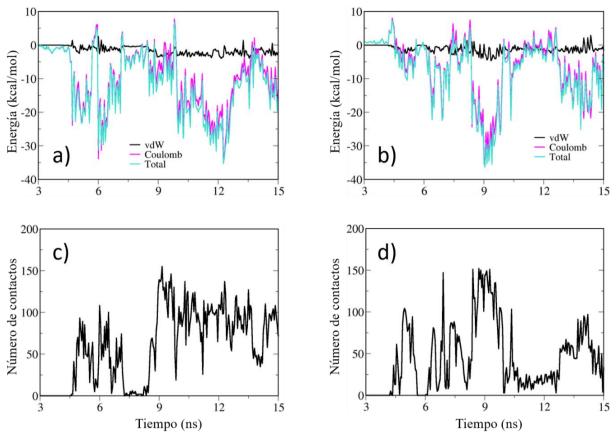


Figura 11. Mínimo absoluto. (a), (b): Evolución temporal de la energía de interacción para los dos residuos PC más importantes. (c), (d): Evolución temporal de los contactos para los dos residuos PC más importantes.

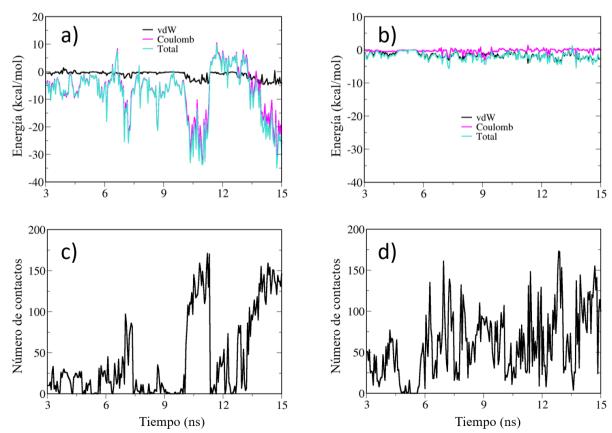


Figura 12. Punto intermedio. Evolución temporal de la energía de interacción para los residuos PC (a) y OL (b) más importantes. Evolución temporal del número de contactos de los residuos PC (c) y OL (d) más importantes.

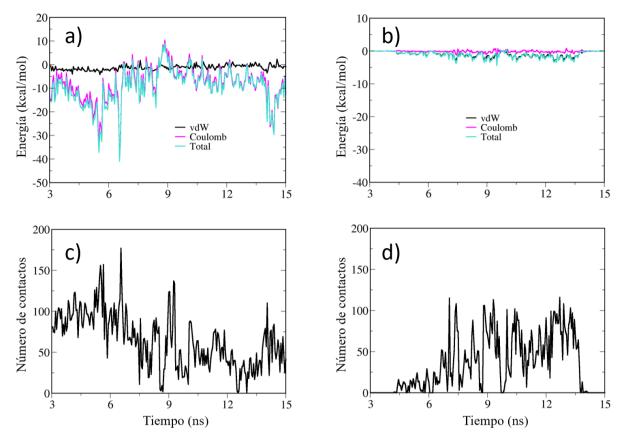


Figura 13. Máximo absoluto. Evolución temporal de la energía de interacción para los residuos PC (a) y OL (b) más importantes. Evolución temporal del número de contactos de los residuos PC (c) y OL (d) más importantes.

Ahora que se conoce que las interacciones más importantes tienen lugar con las cabezas de los lípidos, el siguiente paso es investigar con qué parte de estas cabezas lipídicas tienen lugar dichas interacciones. Para ello, la energía de interacción entre el cisplatino y la cabeza polar se descompone en interacciones con las tres partes que conforman las cabezas de los lípidos: colina, fosfato y glicerol (Figura 14). Esta descomposición se muestra en las Tablas 1-5 para los 10 residuos más importantes para cada uno de los 5 puntos anteriormente analizados a lo largo de la coordenada de reacción.

Observando las Tablas 1, 2, 3, 4 y 5 con detenimiento, se puede ver que las interacciones de Coulomb son las más relevantes para las tres partes de las cabezas (colina, fosfato y glicerol) para los cinco puntos de estudio. En el caso del mínimo relativo (Min1) y del máximo relativo (Max), las interacciones de mayor importancia tienen lugar con la colina. En la Tabla 6a y b se muestran las interacciones más importantes que involucran átomos de la colina del Min1 y Max, respectivamente. Las interacciones más fuertes se producen entre los átomos de N del cisplatino y el átomo de C en posición β con respecto al grupo amino de la colina. Para el mínimo absoluto (Min2), la energía está dominada por el grupo fosfato, siendo las interacciones entre los átomos de N del cisplatino y los átomos de P del fosfato las más importantes (Tabla 6c y d). A partir de aquí, cuando el cisplatino continúa introduciéndose más en la bicapa, para el punto intermedio (Int) y para el máximo absoluto (Max2), las interacciones con las colas lipídicas cobran importancia, siendo más importante la

contribución de las interacciones de van der Waals que las de Coulomb, aunque su magnitud es menor que las interacciones con las cabezas en los puntos anteriores. Sin embargo, cuando se analizan las contribuciones atómicas en las Tabla 6d, f y h parece que se observa lo contrario, es decir, que son las interacciones de Coulomb las dominantes. Lo que ocurre es que, en las interacciones atómicas individuales dominan las interacciones de Coulomb sobre las de van der Waals, pero las primeras pueden ser tanto repulsivas como atractivas, mientras que las últimas son mayoritariamente atractivas. Por tanto, cuando se suman todas las contribuciones atómicas para analizar el comportamiento de todo el residuo, las interacciones de Coulomb se cancelan unas a otras, dando como resultado que las interacciones atractivas de van der Waals son las dominantes.

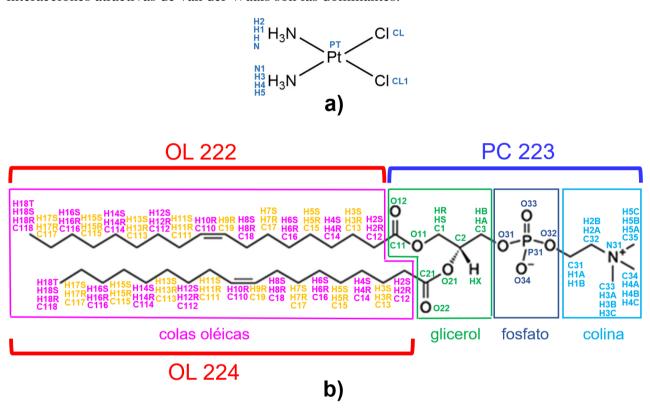


Figura 14. Nomenclatura de los átomos de (a)cisplatino y (b) un lípido constituyente de la membrana DOPC, en concreto, de los residuos OL 222 y 224, y del residuo PC 223, según el campo de fuerzas Lipid17.

En este análisis se observa la presencia de átomos electronegativos involucrados en las interacciones más relevantes, por lo que se considera la posibilidad de la existencia de enlaces de hidrógeno. Teóricamente un enlace de hidrógeno se forma cuando se establece una interacción entre un átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno enlazado covalentemente a otro átomo electronegativo. En este análisis se considera que se forma un enlace de hidrógeno cuando el ángulo formado entre estos tres átomos es superior a 135 °, y la distancia entre el átomo dador de hidrógeno y el átomo aceptor de hidrógeno es inferior a 3 Å. Dicho esto, si se observan de nuevo las Tablas 1-5, se puede ver cómo la formación de enlaces de hidrógeno entre el cisplatino y la membrana no es demasiado relevante ya que los enlaces de hidrógeno más duraderos solamente están presentes durante el 6 o el 7% de la simulación.

Tabla 1. Diez residuos más importantes del mínimo relativo (Min1) junto con su energía total de interacción con el cisplatino descompuesta en interacciones de van der Waals y Coulomb, en kcal/mol. Energía de interacción con el cisplatino de las tres partes de las que se componen las cabezas lipídicas: colina, fosfato y glicerol en kcal/mol. Enlace de Hidrógeno: átomos aceptores y donadores de H, tiempo de vida medio con respecto al tiempo total de la simulación en %, distancia en Å y ángulo en grados entre dichos átomos.

						Colina			Fosfato			Glicerol			Enlac	e de Hidro	ógeno	
Residuo	OL/PC	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	Aceptor	Donador	Tiempo de vida	Distancia	Ángulo
175	PC	-0,2	-1,6	-1,8	-0,2	-2,1	-2,3	0,0	0,6	0,6	0,0	-0,1	-0,1					
220	PC	-0,1	-1,0	-1,1	-0,1	-2,3	-2,4	0,0	1,5	1,5	0,0	-0,2	-0,2	O33	H4-N	0,4	2,72	141,7
196	PC	-0,1	-1,0	-1,1	-0,1	-1,3	-1,4	0,0	0,4	0,4	0,0	-0,1	-0,1					
205	PC	-0,2	-0,8	-1,0	-0,1	-1,5	-1,6	0,0	0,8	0,8	0,0	-0,1	-0,1					
178	PC	-0,1	-0,8	-0,9	-0,1	-0,3	-0,4	0,0	-0,6	-0,6	0,0	0,1	0,1	O33	H2-N1	0,8	2,80	163,6
184	PC	-0,1	-0,6	-0,7	-0,1	-0,6	-0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
415	PC	-0,1	-0,6	-0,7	-0,1	-0,3	-0,4	0,0	-0,3	-0,3	0,0	0,0	0,0	O33	H4-N	0,4	2,78	143,9
169	PC	-0,1	-0,5	-0,6	-0,1	-1,0	-1,1	0,0	0,6	0,6	0,0	-0,1	-0,1					
313	PC	-0,1	-0,5	-0,6	0,0	-0,4	-0,4	0,0	-0,1	-0,1	0,0	0,0	0,0					
73	PC	0,0	-0,5	-0,5	0,0	-0,8	-0,8	0,0	0,4	0,4	0,0	-0,1	-0,1					
Suma	PC	-1,1	-7,9	-9,0	-0,9	-10,6	-11,5	-0,2	3,3	3,3	0,0	-0,6	-0,6					

Tabla 2. Diez residuos más importantes del máximo relativo (Max) junto con su energía total de interacción con el cisplatino descompuesta en interacciones de van der Waals y Coulomb, en kcal/mol. Energía de interacción con el cisplatino de las tres partes de las que se componen las cabezas lipídicas: colina, fosfato y glicerol en kcal/mol. Enlace de Hidrógeno: átomos aceptores y donadores de H, tiempo de vida medio con respecto al tiempo total de la simulación en %, distancia en Å y ángulo en grados entre dichos átomos.

						Colina			Fosfato			Glicerol			Enlac	e de Hidró	geno	
Residuo	OL/PC	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	Aceptor	Donador	Tiempo de vida	Distancia	Ángulo
259	PC	-0,7	-4,4	-5,1	-0,4	-2,4	-2,8	-0,1	-2,4	-2,5	-0,1	0,4	0,3	O34	H3-N1	0,4	2,64	155,3
85	PC	-0,6	-3,5	-4,1	-0,2	-4,9	-5,1	-0,1	2,7	2,6	-0,3	-1,3	-1,6	O22	H4-N	2,1	2,89	154,9
349	PC	-0,6	-3,5	-4,1	-0,3	1,0	0,7	-0,1	-4,5	-4,6	-0,2	0,1	-0,1	O33	H1-N	0,8	2,79	163,2
43	PC	-1,3	-2,3	-3,6	-0,5	-4,0	-4,5	-0,2	3,8	3,6	-0,6	-2,1	-2,7	O34	H2-N1	0,8	2,85	153,1
52	PC	-0,3	-3,0	-3,3	-0,2	-0,6	-0,8	-0,1	-2,3	-2,4	-0,1	-0,1	-0,2	O33	H4-N	1,3	2,81	160,1
382	PC	-0,5	-2,7	-3,2	-0,3	-0,3	-0,6	-0,1	-2,7	-2,8	0,0	0,3	0,3	O32	H5-N1	0,4	2,91	135,2
319	PC	-0,3	-1,7	-2,0	-0,2	-2,9	-3,1	-0,1	1,6	1,5	0,0	-0,3	-0,3	O33	H3-N1	1,3	2,87	156,4
163	PC	-0,4	-1,4	-1,8	-0,2	-3,1	-3,3	-0,1	2,6	2,5	-0,1	-0,8	-0,9	O12	H2-N1	0,8	2,79	165,1
55	PC	-0,4	-1,3	-1,7	-0,2	-0,5	-0,7	-0,1	-1,1	-1,2	0,0	0,2	0,2	O34	H3-N1	0,8	2,79	176,4
397	PC	-0,1	-1,4	-1,5	-0,1	0,5	0,4	0,0	-2,0	-2,0	0,0	0,2	0,2	O34	H2-N1	0,4	2,99	160,2
Suma	PC	-5,2	-25,2	-30,4	-2,6	-17,2	-19,8	-1,0	-4,3	-5,3	-1,4	-3,4	-4,8					

Tabla 3. Diez residuos más importantes del mínimo absoluto (Min2) junto con su energía total de interacción con el cisplatino descompuesta en interacciones de van der Waals y Coulomb, en kcal/mol. Energía de interacción con el cisplatino de las tres partes de las que se componen las cabezas lipídicas: colina, fosfato y glicerol en kcal/mol. Enlace de Hidrógeno: átomos aceptores y donadores de H, tiempo de vida medio con respecto al tiempo total de la simulación en %, distancia en Å y ángulo en grados entre dichos átomos.

						Colina			Fosfato			Glicerol			Enlac	e de Hidro	ógeno	
Residuo	OL/PC	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	Aceptor	Donador	Tiempo de vida	Distancia	Ángulo
223	PC	-1,5	-10,2	-11,7	-0,5	0,3	-0,2	-0,3	-10,9	-11,2	-0,7	0,4	-0,3	O34	H4-N	2,9	2,82	148,7
94	PC	-1,2	-6,7	-7,9	-0,2	0,9	0,7	-0,1	-5,1	-5,2	-0,7	-1,9	-2,6	O34	H4-N	4,6	2,78	155,7
292	PC	-0,9	-2,5	-3,4	-0,2	4,7	4,5	-0,1	-6,1	-6,2	-0,6	-1,1	-1,7	O12	H3-N1	2,5	2,84	151,7
169	PC	-0,5	-2,4	-2,9	0,0	1,3	1,3	-0,1	-3,1	-3,2	-0,4	-0,6	-1,0	O21	H2-N1	0,0	2,86	144,6
151	PC	-0,2	-1,4	-1,6	0,0	1,6	1,6	0,0	-3,3	-3,3	-0,1	0,3	0,2	O12	H3-N1	0,8	2,86	143,5
224	OL	-1,2	-0,4	-1,6														
139	PC	-0,3	-0,8	-1,1	-0,1	3,6	3,5	0,0	-4,4	-4,4	-0,2	0,0	-0,2	O22	H1-N	0,8	2,86	156,0
140	OL	-0,6	-0,2	-0,8														
95	OL	-0,6	0,0	-0,6														
291	OL	-0,4	-0,1	-0,5														
Suma	PC	-4,6	-24,0	-28,6	-1,0	12,4	11,4	-0,6	-32,9	-33,5	-2,7	-2,9	-5,6					
	OL	-2,8	-0,7	-3,5														

Tabla 4. Diez residuos más importantes del punto intermedio (Int) junto con su energía total de interacción con el cisplatino descompuesta en interacciones de van der Waals y Coulomb, en kcal/mol. Energía de interacción del cisplatino de las tres partes de las que se componen las cabezas lipídicas: colina, fosfato y glicerol en kcal/mol. Enlace de Hidrógeno: átomos aceptores y donadores de H, tiempo de vida medio con respecto al tiempo total de la simulación en %, distancia en Å y ángulo en grados entre dichos átomos.

						Colina			Fosfato			Glicerol		Enlace de Hidrógeno				
Residuo	OL/PC	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	Aceptor	Donador	Tiempo de vida	Distancia	Ángulo
415	PC	-1,1	-6,9	-8,0	-0,6	2,1	1,5	-0,2	-9,1	-9,3	-0,3	0,1	-0,2	O12	H1-N	1,3	2,83	152,3
142	PC	-0,5	-3,5	-4,0	-0,1	2,2	2,1	-0,1	-4,6	-4,7	-0,3	-1,1	-1,4	O22	H3-N1	3,3	2,81	161,9
226	PC	-0,3	-3,6	-3,9	0,0	2,6	2,6	0,0	-5,3	-5,3	-0,3	-0,9	-1,2	O12	H4-N	2,5	2,81	163,9
22	PC	-0,4	-2,3	-2,7	0,0	3,0	3,0	0,0	-5,5	-5,5	-0,3	0,2	-0,1	O11	H4-N	1,3	2,90	153,4
178	PC	-0,3	-2,2	-2,5	0,0	2,5	2,5	0,0	-4,6	-4,6	-0,2	0,0	-0,2	O33	H-N	0,4	2,71	146,8
414	OL	-1,6	-0,3	-1,9														
143	OL	-1,0	-0,3	-1,3														
355	PC	0,0	-0,8	-0,8	0,0	1,3	1,3	0,0	-2,4	-2,4	0,0	0,2	0,2					
225	OL	-0,5	-0,2	-0,7														
177	OL	-0,6	-0,1	-0,7														
Suma	PC	-2,6	-19,3	-21,9	-0,7	13,7	13,0	-0,4	-31,5	-31,9	-1,4	-1,5	-2,9					
	OL	-3,7	-0,9	-4,6														

Tabla 5. Diez residuos más importantes del máximo absoluto (Max2) junto con su energía total de interacción con el cisplatino descompuesta en interacciones de van der Waals y Coulomb, en kcal/mol. Energía de interacción con el cisplatino de las tres partes de las que se componen las cabezas lipídicas: colina, fosfato y glicerol en kcal/mol. Enlace de Hidrógeno: átomos aceptores y donadores de H, tiempo de vida medio con respecto al tiempo total de la simulación en %, distancia en Å y ángulo en grados entre dichos átomos.

						Colina			Fosfato			Glicerol			Enla	ce de Hidr	ógeno	
Residuo	OL/PC	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	vdW	Coulomb	Total	Aceptor	Donador	Tiempo de vida	Distancia	Ángulo
190	PC	-1,2	-8,2	-9,4	-0,7	3,8	3,1	-0,1	-9,5	-9,6	-0,4	-2,5	-2,9	O22	H4-N	6,7	2,83	152,0
70	PC	-0,4	-2,1	-2,5	0,0	4,3	4,3	0,0	-5,3	-5,3	-0,3	-1,0	-1,3	O12	H4-N	2,1	2,94	163,7
358	PC	-0,1	-1,7	-1,8	0,0	1,7	1,7	0,0	-3,2	-3,2	-0,1	-0,2	-0,3	O12	H1-N	0,8	2,76	144,7
187	PC	-0,1	-1,1	-1,2	0,0	1,7	1,7	0,0	-3,1	-3,1	-0,1	0,4	0,3	O12	H2-N1	0,8	2,88	155,4
357	OL	-1,0	-0,1	-1,1														
48	OL	-0,9	-0,2	-1,1														
189	OL	-0,7	-0,2	-0,9														
191	OL	-0,6	-0,3	-0,9														
294	OL	-0,7	-0,1	-0,8														
69	OL	-0,6	-0,2	-0,8														
Suma	PC	-1,8	-13,1	-14,9	-0,7	11,5	10,8	-0,1	-21,1	-21,2	-0,9	-3,3	-4,2					
	OL	-4,5	-1,1	-5,6														

Tabla 6. Energías de interacción interatómicas y su descomposición en interacciones de van der Waals y Coulomb en kcal/mol de los residuos más importantes de los cinco puntos descritos. A: Residuo PC más importante del mínimo relativo (Min1). B: Residuo PC más importante del máximo relativo (Max). C: Residuo PC más importante del mínimo absoluto (Min2). D: Residuo OL más importante del mínimo absoluto (Min2). E: Residuo PC más importante del punto intermedio (Int). F: Residuo OL más importante del punto intermedio (Int). G: Residuo PC más importante del máximo absoluto (Max2).

Tabla 6A: Residuo 175											
Átomo 1	Átomo 2	VdW	Coulomb	Total							
N	C31	-1,5E-03	-3,0	-3,0							
N1	C31	-8,1E-04	-2,9	-2,9							
Н3	C34	-4,0E-04	-2,3	-2,3							
H1	C34	-2,7E-04	-2,3	-2,3							
CL1	C31	-5,3E-03	-2,3	-2,3							

Tabla 6B: Residuo 259										
Átomo 1	Átomo 2	VdW	Coulomb	Total						
N	C31	-1,8E-02	-5,6	-5,6						
N1	C31	-5,8E-03	-5,1	-5,1						
CL1	C31	-2,1E-02	-3,9	-3,9						
Н3	C35	-1,1E-03	-3,8	-3,8						
Н3	C33	-9,7E-04	-3,8	-3,8						

Tabla 6C: Residuo 223											
Átomo 1	Átomo 2	VdW	Coulomb	Total							
N	P31	-3,9E-02	-29,2	-29,2							
N1	P31	-3,0E-02	-23,9	-24,0							
N	C21	-3,5E-02	-21,8	-21,8							
N1	C21	-2,3E-02	-19,6	-19,6							
CL1	P31	-3,4E-02	-16,1	-16,1							

Tabla 6D: Residuo 224											
Átomo 1	Átomo 2	VdW	Coulomb	Total							
H1	C12	-1,9E-03	-2,3	-2,3							
H4	C12	-1,9E-03	-2,3	-2,3							
H1	C19	-3,8E-05	-2,3	-2,3							
H4	C19	-3,8E-05	-2,3	-2,3							
Н3	C19	-2,8E-05	-2,2	-2,2							

	Tabla 6E: Residuo 415										
A	Átomo 1	Átomo 2	VdW	Coulomb	Total						
	N	P31	-2,5E-02	-22,6	-22,6						
	N1	P31	-2,5E-02	-22,4	-22,4						
	N1	C11	-1,7E-02	-17,8	-17,8						
	N	C11	-1,4E-02	-17,4	-17,4						
	N	C21	-4,7E-03	-13,8	-13,8						

Tabla 6F: Residuo 414											
Átomo 1	Átomo 2	VdW	Coulomb	Total							
H2	C19	-1,6E-03	-3,2	-3,2							
Н3	C19	-1,3E-03	-3,2	-3,2							
H2	C110	-1,6E-03	-3,0	-3,0							
Н3	C110	-8,9E-04	-3,0	-3,0							
H1	C19	-3,2E-04	-2,9	-2,9							

Tabla 6G: Residuo 190					
Átomo 1	Átomo 2	VdW	Coulomb	Total	
N1	P31	-1,4E-02	-23,0	-23,0	
N1	C21	-4,0E-02	22,7	-22,7	
N	P31	-1,6E-02	-22,6	-22,6	
N	C21	-3,6E-02	-21,9	-22,0	
N1	C11	-2,3E-02	-19,1	-19,1	

Tabla 6H: Residuo 357						
Átomo 1	Átomo 2	VdW	Coulomb	Total		
H1	C19	-2,7E-04	-2,5	-2,5		
H4	C19	-2,0E-04	-2,5	-2,5		
H2	C19	-8,5E-05	-2,5	-2,5		
Н3	C19	-2,0E-04	-2,4	-2,4		
H1	C110	-1,9E-04	-2,3	-2,3		

#### 7. CONCLUSIONES

Se han empleado simulaciones de *Umbrella Sampling* combinadas con Dinámica Molecular Clásica para realizar la modelización del proceso de absorción del cisplatino en una bicapa lipídica DOPC e investigar las interacciones que tienen lugar en dicho proceso.

El proceso de absorción de la molécula de estudio en la membrana se produce por difusión simple, donde tanto para el mínimo (Min1) como el máximo (Max) relativos, la energía está dominada por las interacciones con el grupo colina, mientras que para el mínimo absoluto (Min2) está dominada por las interacciones con el grupo fosfato. Además, para este último, las interacciones tienen un tiempo de vida más largo que para el mínimo y máximo relativos. A pesar de que tanto en las colinas como en los fosfatos hay heteroátomos que establecen enlaces de hidrógeno con el cisplatino, estas interacciones no son relevantes. Las interacciones más importantes son las de Coulomb presentes entre los átomos de N del cisplatino y los átomos de P del grupo fosfato de las cabezas lipídicas. Cuando el cisplatino penetra más profundamente, se van haciendo más relevantes las interacciones con las colas no polares de los lípidos, en las cuales las interacciones de van der Waals cobran importancia y disminuyen las de Coulomb. Este hecho puede indicar que podría ser necesario emplear un campo de fuerzas polarizable en vez de uno no polarizable con cargas fijas, ya que éste podría no estar describiendo adecuadamente la situación en la que el cisplatino se encuentra muy dentro de la membrana.

#### 8. REFERENCIAS

- (1) William C. Shiel Jr., M., FACP, FACR; MedicineNet: https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=2580, Access date: 25/02/2020.
  - (2) Martinho, N.; Santos, T. C. B.; Florindo, H. F.; Silva, L. C. Frontiers in Physiology 2019, 10.
  - (3) Rabik, C. A.; Dolan, M. E. Cancer Treatment Reviews 2007, 33, 9-23.
  - (4) Wang, D.; Lippard, S. J. *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, *4*, 307-320.
  - (5) Siddik, Z. H. Oncogene **2003**, 22, 7265-7279.
- (6) D.A. Case, I. Y. B.-S., S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, D. Ghoreishi, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, D. Greene, R Harris, N. Homeyer, S. Izadi, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, D.J. Mermelstein, K.M. Merz, Y. Miao, G. Monard, C. Nguyen, H. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, F. Pan, R. Qi, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C.L. Simmerling, J. Smith, R. Salomon-Ferrer, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, H. Wei, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, D.M. York and P.A. Kollman **2018**, University of California, San Francisco.
  - (7) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. Journal of Molecular Graphics 1996, 14, 33-38.
  - (8) Adcock, S. A.; McCammon, J. A. Chemical Reviews 2006, 106, 1589-1615.
- (9) Nogueira, J. J. In *MoBioChem Youtube Channel. Molecular Dynamics: Equations of Motion.* https://www.youtube.com/watch?v=8iHER6IP6Ds&t=217s, Access date: 15/04/2020.
- (10) Nogueira, J. J. In *MoBioChem Youtube Channel. Molecular Dynamics: Force Fields.* https://www.youtube.com/watch?v=vpqo0q3zvJU&t=60s, Access date: 23/04/2020.
- (11) Kästner, J. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science **2011**, 1, 932-942.
  - (12) Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W. *Journal of Computational Chemistry* **2008**, *29*, 1859-1865.

- (13) Skjevik, A. A.; Madej, B. D.; Walker, R. C.; Teigen, K. *Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*, 11124-11136.
- (14) Dickson, C. J.; Madej, B. D.; Skjevik, A. A.; Betz, R. M.; Teigen, K.; Gould, I. R.; Walker, R. C. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2014**, *10*, 865-879.
- (15) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, *79*, 926-935.
  - (16) Joung, I. S.; Cheatham Iii, T. E. Journal of Physical Chemistry B 2008, 112, 9020-9041.