



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Simulación molecular del comportamiento mucoadhesivo de biopolímeros farmacéuticos en contacto con mucinas

Nicolás Moreno Chaparro

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2011

Simulación molecular del comportamiento mucoadhesivo de biopolímeros
farmacéuticos en contacto con mucinas

Nicolás Moreno Chaparro

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Química

Director:

Jairo Ernesto Perilla Perilla
Ingeniero Químico, MSc, PhD

Codirector:

Coray Colina
Ingeniera Química, MSc, PhD

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2011

Dedicatoria

A mi hijo

“Creo que es indiferente que yo tenga razón o que tenga razón Usted; lo importante es llegar a una conclusión, y de qué lado de la mesa se llega, de qué boca, o de qué rostro, o de qué nombre, es lo de menos.”

Jorge Luis Borges

Agradecimientos

El desarrollo del presente trabajo fue posible gracias a las siguientes personas o entidades que contribuyeron a la finalización del mismo:

En primer lugar a mi familia por su apoyo y motivación durante todas las etapas del desarrollo de mi tesis.

A mis directores, el profesor Jairo Perilla y la profesora Coray Colina por su guía y las oportunidades que me brindaron durante este tiempo que transcurrió.

A mis compañeros de posgrados de la Universidad Nacional y de Pennsylvania University por el respaldo y continua contribución en los diferentes aspectos de investigación.

A todos los profesores de la Universidad Nacional que han contribuido con mi formación, me han dado las herramientas necesarias para formarme como investigador.

A COLCIENCIAS, ya que esta investigación fue financiada parcialmente mediante el proyecto 1-521128526 y la beca Jóvenes Investigadores e Innovadores año 2009.

A la Universidad Nacional de Colombia y la Universidad Estatal de Pennsylvania por todo el soporte brindado para que la presente investigación pudiera ser llevada a cabo.

RESUMEN

En el presente documento se presenta el estudio de agregación y adsorción de los de mucina (principal componente del mucus humano) en solución polímero, mediante ensayos de simulación soportados en el método de Dinámica Partícula Disipativa (DPD). Esta técnica aplica una aproximación de grano grueso (*grained*) despreciando los detalles a nivel atómico y modelando múltiples átomos en una esfera (*bead*) con el fin de extender la escala de tiempo necesaria para simular fenómenos como adsorción a nivel de nanómetros. Para el desarrollo del proyecto se llevó a cabo un diseño experimental que permitió la identificación de los tamaños de caja de simulación, y selección de parámetros estructurales, seguidamente fueron propuestos 3 modelos de mucina con diferentes niveles de refinamiento, y se evaluó su estabilidad estructural; empleando 2 de estos modelos se llevó a cabo un estudio de agregación en solución acuosa, encontrándose mecanismos y cinéticas de agregación en sistemas proteicos reales que involucran agregaciones mediadas por asociaciones químicas. Finalmente se llevó a cabo ensayo de adsorción de un modelo simplificado de la mucina en modelos de superficies evidenciando la capacidad de la técnica para emular este tipo de fenómenos, y la influencia que tienen la naturaleza hidrofóbica de la superficie, en la orientación final que tomen las proteínas adsorbidas.

Palabras Clave: simulación molecular, mucinas, Dinámica partícula disipativa, agregación, bioadhesión

ABSTRACT

This paper presents the study of aggregation between models of mucin (the main component of human mucus) in solution with polymer supported by simulation tests in Dissipative Particle Dynamics method (DPD). This technique applies a mesoscale *grained* approach dropping the atomic level details modeling multiple atoms in a single *bead* in order to extend the timescale necessary to simulate phenomena such as adsorption nanometrically. To develop the project was carried out an experimental design that allowed the identification of the simulation box sizes, and selection of structural parameters. Then three computational models were proposed mucin with different levels of refinement, and evaluated their structural stability using 2 of these models as a study of aggregation in aqueous solution finding mechanisms and kinetics of aggregation typical of real systems involving protein aggregation mediated by chemical associations. Finally conducted adsorption tests of a simplified model mucin in surface models demonstrating the ability of the technique to emulate this kind of phenomena, and the influence of the hydrophobic nature of the surface in the final guidance take the adsorbed proteins.

Keywords: molecular simulation, mucin, dissipative particle dynamics, aggregation, bioadhesion

CONTENIDO

Resumen.....	VII
Abstract.....	.VII
Contenido.....	VIII
Lista de figuras.....	X
Lista de tablas.....	XV
Introducción.....	17
1. Marco Conceptual.....	21
1.1 BIOADHESIÓN.....	22
1.1.1 La mucina.....	22
1.1.2 Agregación de proteínas.....	26
1.1.3 Interacciones Polímero-Mucina-agua.....	31
1.2 MODELAMIENTO MOLECULAR.....	37
1.2.1 Modelamiento de bioadhesión.....	37
1.2.2 Simulación computacional.....	40
1.2.3 Dinámica molecular.....	43
1.2.4 Técnicas de Modelamiento a meso o coars-grained.....	45
1.2.5 Simulación molecular del fenómeno de mucoadhesión.....	50
2. Modelamiento molecular a meso de mucinas.....	53
2.1 Materiales y Métodos.....	54
2.1.1 Dinámica de Partícula Disipativa (DPD).....	54
2.1.2 Calibración del software de simulación.....	56
2.1.3 Modelamiento de mucinas.....	57
2.1.4 Diseño experimental.....	60
2.2 Resultados.....	64
2.2.1 Calibración y ajuste del software de simulación LAMMPS.....	64
2.2.2 Modelamiento del sistema de mucinas.....	67
2.3 Conclusiones.....	79
3. Simulación del fenómeno de agregación de mucinas.....	81
3.1 Materiales y Métodos.....	82
3.2 Resultados.....	85
3.2.1 Identificación de parámetros para caracterización de agregados.....	85

3.2.2	Modelo de mucina tipo paralelepípedo.....	86
3.2.3	Modelo de mucina tipo lineal.....	106
3.3	Conclusiones.....	120
4.	Simulación del fenómeno de adsorción de mucinas.....	121
4.1	Materiales y Métodos.....	121
	Modelamiento de la superficie polimérica, paredes reflectivas y adsorción.....	122
	Postprocesamiento: análisis de adsorción sobre superficies.....	123
4.2	Análisis de resultados.....	124
	4.2.1 Implementación se superficies y de paredes reflectivas en LAMMPS.....	124
	Adsorción de mucinas en superficie.....	126
4.3	Conclusiones.....	134
5.	Bibliografía.....	137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.a), b) Dominios que conforman la estructura básica de la proteína mucina, c), d). monómero de mucina y trímero de mucina respectivamente (Bansil and Turner, 2006).....	23
Figura 2. Esquema de las posibles conformaciones de la glicoproteína mucina (ovillo aleatorio o Rodillo) en función de la acidez del medio (Bansil and Turner, 2006).....	25
Figura 3. Comportamiento del radio hidrodinámico aparente para agregados de mucina en función del pH y concentración (Nyström et al., 2010).....	25
Figura 4. Esquema del mecanismo global de agregación de proteínas (Wang and Roberts., 2010).....	29
Figura 5. Proceso de adsorción de una proteína a una superficie, (adaptada de (Latour., 2005)).....	32
Figura 6 . Las resacas en la aplicación de la termodinámica a los problemas del equilibrio de fases (Prausnitz and Lichtenthaler, 2000).....	38
Figura .7 Métodos de simulación computacional disponibles, de acuerdo a la escala de tiempo y longitud de los fenómenos que pueden reproducir (Jara Botello, 2010).....	42
Figura 8. Esquema empleado en dinámica molecular, donde a partir de las ecuaciones de movimiento de Newton es factible determinar la posición futura de un átomo.....	44
Figura 9. Modelo atomístico de 118 átomos, y Modelo de 13 sitios para la Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) (Nielsen et al., 2004).....	45
Figura 10. Esquema de ajuste de los parámetros de interacción a meso a partir de la información que brinda la escala atomística.....	46
Figura 11. Esquema empleado en dinámica de partícula disipativa, donde a partir de las ecuaciones de movimiento de Newton es factible determinar la posición futura de un átomo, la estimación de la fuerza total incluye la fuerza disipada el medio y un componente asociado a aleatoriedad. choques.....	48
Figura 12. Diferencias entre los potenciales energéticos empleados para el método de simulación a meso DPD y molecular.....	49
Figura 13. Esquema de paralelización para disminución en tiempos de procesamiento gracias a la división del problema en subdominios de menor consumo computacional.....	57
Figura 14. Modelo de bead de agua empleado a lo largo de la presente investigación, aplicándose un criterio de 3 moléculas de agua por bead. Debido a que el tamaño de todos los beads en la simulación es el mismo, este criterio se elige para los modelos de mucina.....	58
Figura 15. Esquema de los armónicos de enlace y flexión que se implementarán para la mantener la forma de los modelos construidos.....	59
Figura 16. modelo de copolímero de dibloque empleados en los sistemas para la calibración de software.....	65
Figura 17. Formación de micelas encontrada para sistemas de copolímeros de dibloques (de 20x20x20) después de 200 mil pasos.....	65
Figura 18. diagrama de eficiencia para el método DPD, empleando el software de simulación lammps. El diagrama indica el tiempo necesario para simular 20 mil pasos en una caja de 20x20x20, con una densidad de 367.....	67
Figura 19. Modelo de mucina tipo paralelepípedo.....	68
Figura 20. Diferentes configuraciones alcanzadas tras variaciones en los parámetros estructurales.....	69
Figura 21. Configuración final para una caja de simulación de 50x50x50, con modelos de mucina de 20 unidades, donde las moléculas evidenciaron capacidad de movimiento y rotación a lo largo de la simulación, permitiéndoles explorar el espacio disponible.....	71
Figura 22. Configuración final para una caja de simulación de 50x50x50, con modelos de mucina de 40 unidades, donde solamente una fracción baja de moléculas evidencia rotación, al parecer la formación de agregados.....	71

longitudinales en las primeras etapas de la simulación no permite la posición del agregados debido a la influencia que tiene el tamaño de la caja sobre el sistema.....	72
Figura 23. Configuración final para una caja de simulación de 30x30x30, con modelos de mucina de 40 unidades, donde el tamaño de la mucina origina un sesgo en la simulación que mantiene a todas las moléculas en orientación vertical debido a fenómenos de agregación de moléculas similares al cruzar frontera periódica.	72
Figura 24. Configuración final para una caja de simulación de 50x50x50, con modelos de mucina de 50 unidades, presentando un comportamiento equivalente al de la figura anterior, sin embargo el incremento en la caja aumenta la posibilidad de que haya una reorientación.....	73
Figura 25. Configuración final para una caja de simulación de 40x40x40, con modelos de mucina de 40 unidades, donde aún es evidente el sesgo originado por el tamaño de caja, que tiende a agregarlos longitudinales en posición vertical.....	73
Figura 26. Modelo de mucina tipo lineal de cadena simple.....	74
Figura 27. Modelo de mucina tipo lineal de cadena de tipo cisteína (CE) es sus extremos.....	75
Figura 28. Modelo de mucina tipo paralelepípedo.....	84
Figura 29. Modelo de mucina tipo lineal de cadena de tipo cisteína es sus extremos.....	84
Figura 30. Agregación de modelos de mucina tipo paralelepípedo, para cajas de 100 mucinas, e interacciones fuertes. Los beads de agua no han sido incluidos para facilitar la visualización. A) 0, b) 10.000, c) 200.000 y d) 680.000 pasos.....	87
Figura 31. Agregación de modelos de mucina tipo paralelepípedo, para cajas de 10 mucinas, e interacciones fuertes. Los beads de agua no han sido incluidos para facilitar la visualización. A) 0, b) 10.000 y c) 680.000 pasos.....	87
Figura 32. Número de agregados en función del tiempo para 3 diferentes configuraciones iniciales en una caja de 50x50x50 con 10 modelos de mucina, e interacciones medias.....	89
Figura 33. Número de agregados en función del tiempo para 3 configuraciones iniciales en una caja de 50x50x50 con 10 modelos de mucina, e interacciones fuertes.....	90
Figura 34. Número de agregados en función del tiempo para 2 diferentes configuraciones iniciales, simuladas en un solo procesador (serie), y en 32 procesadores, en una caja de 50x50x50 con 100 modelos de mucina e interacciones medias. Evidenciándose que el número de procesadores puede afectar la trayectoria de la simulación debido principalmente a la partición de la caja de simulación; sin embargo el efecto neto, tiene la misma incidencia que podría tener el uso de configuraciones iniciales diferentes.....	90
Figura 35. Número de agregados en función del tiempo para 3 diferentes configuraciones iniciales en una caja de 50x50x50 con 100 modelos de mucina e interacciones fuertes. El eje de agregados se presenta en escala logarítmica para facilitar su observación.....	91
Figura 36. Número de agregados en función del tiempo, en una caja de simulación con 50 mucinas e interacciones débiles, para los valores límite de la constante de rigidez. Evidenciando similitud en la tendencia simulada; en el gráfico se incluye la diferencia relativa (agregados).....	93
Figura 37. Peso molecular en función del tiempo, en una caja de simulación con 50 mucinas e interacciones débiles, para los valores límite de la constante de rigidez.....	93
Figura 38. Configuraciones finales presentadas en sus cajas para los sistemas con 50 mucinas, para dos niveles de rigidez diferentes. Izq: $k_r = 0$, der: $k_r = 100$. Los beads de agua han sido omitidos para facilitar la observación.....	94
Figura 39. Número de agregados en función del tiempo, en una caja de simulación con 100 mucinas e interacciones débiles, para los valores límite de la constante de rigidez. Evidenciando similitud en la tendencia simulada; en el gráfico se incluye la diferencia relativa (agregados).....	95
Figura 40. Peso molecular en función del tiempo, en una simulación con 100 mucinas e interacciones débiles, para los valores límite de la constante de rigidez.....	95

Figura 41. Número de agregados en función del tiempo para 3 tipos diferentes de interacción: débil, medio y fuerte ($\epsilon = 0.1$, en una caja de 50x50x50 con 10 modelos de mucina.....	97
Figura 42. Número de agregados en función del tiempo para 3 tipos diferentes de interacción débil, medio y fuerte ($\epsilon = 0.1$, en una caja de 50x50x50 con 100 modelos de mucina.....	97
Figura 43. Esquemas factibles para que ocurra el fenómeno de agregación para los monómeros del tipo paralelepípedo, donde el esquema que induce la mayor área de contacto es el a, y el que induce mayor extensión de estructura es el tipo.c.....	98
Figura 44. Peso molecular promedio en función del tiempo para 3 diferentes tipos de interacción débil, medio y fuerte ($\epsilon = 0.1$, en una caja de 50x50x50 con 100 modelos de mucina, empezando todos con la misma configuración inicial. En esta figura se hace evidente que en el intervalo de 120, el fenómeno de agregación no se ve influenciado por las interacciones hidrofóbicas.....	99
Figura 45. estructura final de los agregados para sistemas con interacciones débiles...	100
Figura 46. estructura final de los agregados para sistemas con interacciones medias, la diferencia en los colores solo se usa para facilitar la visualización de la conformación, todas las mucinas simuladas en la caja son del mismo tipo.....	100
Figura 47. estructura final de los agregados para sistemas con interacciones fuertes. la diferencia en los colores solo se usa para facilitar la visualización de la conformación, todas las mucinas simuladas en la caja son del mismo tipo.....	101
Figura 48. Intervalos para los tres mecanismos de agregación propuestos, los cuales identifican 3 etapas en las que ocurre el fenómeno. En la presente figura se muestra además la presencia general de estas etapas para diferentes configuraciones iniciales para cajas de 100 mucinas.....	102
Figura 49. Líneas de tendencias para la etapa de agregación comprendida entre 0 y 100 pasos, para simulación con 100 modelos de mucina, e interacciones fuertes. En la figura se incluyen las ecuaciones para la línea de tendencia y coeficiente de correlación.....	104
Figura 50. Líneas de tendencias para la etapa de agregación comprendida entre 0 y 110 pasos, para simulación con 50 modelos de mucina, para dos valores límite de rigidez en la molécula.....	104
Figura 51. Líneas de tendencias para la etapa de agregación comprendida entre 0 y 180 pasos, para simulación con 10 modelos de mucina para diferentes configuraciones iniciales corridas en paralelo, y 1 corrida en serie. En la figura se incluyen las ecuaciones para la línea de tendencia y coeficiente de correlación.....	105
Figura 52. estructuras finales para diferentes sistemas simulados con modelos de mucinas lineales y un solo <i>bead</i> en cajas de 100x100x100. los números indican las identidades de los <i>beads</i> que han sido omitido para facilitar la visualización.....	109
Figura 53. Configuración final alcanzada para el sistema de concentración de mucinas (ID 97), donde se evidencia la formación de agregados longitudinales.....	109
Figura 54. Esquema propuesto el tipo de agregaciones que tiende a formar los monómeros de mucina gracias a asociaciones de sus dominios ricos en cisteína. (Lai et al., 2009).....	110
Figura 55. Configuración alcanzada después de 400 mil pasos para el ensayo de O ₂ que se omiten para facilitar la observación.....	111
Figura 56. Configuración alcanzada después de 400 mil pasos para el ensayo de O ₂ que se omiten para facilitar la observación.....	111
Figura 57. Configuración alcanzada después de 400 mil pasos para el ensayo de O ₂ que se omiten para facilitar la observación.....	111
Figura 58. Configuración alcanzada después de 400 mil pasos para el ensayo de O ₂ que se omiten para facilitar la observación.....	112

Figura 59. Configuración alcanzada después de 400 mil pasos para el ensayo de agua se omiten para facilitar la observación.....	112
Figura 60. 1/(número de agregados) en función del tiempo, de para el ensayo 101, con 13 modelos de mucina, la figura se presenta el ajuste realizado a la curva para la etapa 1, donde se encuentra un comportamiento lineal con el tiempo.....	115
Figura 61. 1/(número de agregados) en función del tiempo, de para el ensayo 102, con 26 modelos de mucina, la figura se presenta el ajuste realizado a la curva para la etapa 1, donde se encuentra un comportamiento lineal con el tiempo.....	116
Figura 62. 1/(número de agregados) en función del tiempo, de para el ensayo 103, con 135 modelos de mucina, la figura se presenta el ajuste realizado a la curva para la etapa 1, donde se encuentra un comportamiento lineal con el tiempo.....	116
Figura 63. 1/(número de agregados) en función del tiempo, de para el ensayo 104, con 284 modelos de mucina, la figura se presenta el ajuste realizado a la curva para la etapa 1, donde se encuentra un comportamiento lineal con el tiempo.....	116
Figura 64. Valor de la constante global de agregación observada (k_{obs}) en función de la cantidad inicial de especies de mucina, Para cinéticas de agregación de orden 1 y de orden 3/2. En la grafica se incluyen las líneas de tendencia y se indica la correlación existente entre los datos.....	119
Figura 65. Configuración alcanzada después de 400 mil pasos para el ensayo de agua se omiten para facilitar la observación.....	119
Figura 66. Modelo de mucina simple tipo paralelepípedo (4x4x12).....	122
Figura 67. Fracción de proteínas adsorbidas en la superficie de agua a lo largo de la simulación.....	125
Figura 68. Configuración final para sistemas a baja concentración (10 mucinas) despues de 1 millon de pasos interacciones fuertes.....	127
Figura 69. Configuración final para sistemas a baja concentración (100 mucinas) después de 1 millón de pasos interacciones fuertes, sin superficies en la parte superior de la caja.....	127
Figura 70. Fracción de mucina adsorbida en función del tiempo, para una caja con 100 modelos bajo dos criterios diferentes de fracción de adsorción.....	128
Figura 71. Fracción de mucina adsorbida en función del tiempo, para una caja con 100 modelos bajo dos criterios diferentes de fracción de adsorción.....	128
Figura 72. orientaciones estables de adsorción posibles para modelos de mucina paralelepípedo.....	129
Figura 73. fracción de mucinas adsorbidas en función del tiempo, para orientación vertical y horizontal, en superficies de baja hidrofobicidad.....	129
Figura 74. fracción de mucinas adsorbidas en función del tiempo, para orientación vertical y horizontal, en superficies de alta hidrofobicidad.....	130
Figura 75. Número de proteínas adsorbidas horizontalmente en función del tiempo para diferentes grados de hidrofobicidad de la superficie. En cajas de 50x50x50, por un total de 280 mil pasos.....	131
Figura 76. Fracción de mucinas adsorbidas en la superficie en función del tiempo para 4 diferentes posiciones iniciales de las moléculas, para cajas de 50x50x50 con 10 modelos de mucina.....	132
Figura 77. Lineas de tendencia para la primera etapa de adsorción sobre la superficie, para sistemas con diferentes posiciones iniciales en los sentidos X.y.Y.....	133

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de valores característicos experimentales para distinguir posibles rutas de agregación, con cinéticas en función del peso molecular y la fracción remanente de monómero.....	30
Tabla 2. Variables experimentales para la presente investigación.....	63
Tabla 3. Variables de respuestas propuestas para la construcción del modelo.....	64
Tabla 4. Diseño experimental para la identificación de parámetros estructurales.....	69
Tabla 5. Diseño experimental para la identificación de el tamaño de caja adecuado para la simulación.....	70
Tabla 6. Número de residuos estimados para las MUC2 y MUC5.....	76
Tabla 7. Equivalencias de concentración entre sistemas reales de mucina en solución y sistemas computacionales de modelos de mucina en solución, en cajas de 100x100x100.....	78
Tabla 8. Resumen de condiciones evaluadas para el modelo de tipo general.....	82
Tabla 9. Parámetros de repulsión empleado para el modelo Wpagina CE: cisteína, S: sacáridos..	84
Tabla 10. Condiciones finales para cajas de 50 mucinas con y sin rigidez.....	92
Tabla 11. Condiciones finales para cajas de 100 mucinas con y sin rigidez.....	95
Tabla 12. Tamaño de los agregados en sus configuraciones finales.....	100
Tabla 13. Resumen de Simulaciones llevadas a cabo durante los ensayos de agregación.....	107
Tabla 14. Reducción en el rendimiento computacional a medida que se incrementa el tamaño de la caja de simulación.....	107
Tabla 15. valores para la constante global de agregación observada para diferentes valores del número inicial de mucinas, de acuerdo al modelo cinético de agregación ajustado.....	117
Tabla 16. Valor del coeficiente gamma ajustado para la dependencia de la constante observada de agregación con la concentración inicial de mucinas. Se incluye adicionalmente los resultados para la predicción de la constante para el sistema con 284 mucinas.....	118
Tabla 17. Parámetros de repulsión empleado para simulaciones de adsorción de modelos de mucinas tipo sim W: agua, M: mucina, S: superficie.....	123

INTRODUCCIÓN

La actual demanda de formas farmacéuticas más efectivas, ha generado un gran interés en el desarrollo de nuevos materiales, dentro de los cuales, los biopolímeros han tomado un especial auge debido a sus características de biodegradabilidad, biocompatibilidad y versatilidad que tienen para usarse en diferentes condiciones. Por otra parte, uno de los fenómenos que presentan interés en el desarrollo de nuevos dispositivos farmacéuticos es la bioadhesión, entendida como la capacidad que tendría un producto para adherirse a un tejido vivo y que en muchos casos determina la funcionalidad de los medicamentos. En el caso de mucosas, el fenómeno se denomina mucoadhesión, y tiene como consecuencia que se aumenta el tiempo de residencia del sistema gastrointestinal, permitiendo una dosificación más eficiente del fármaco.

Dentro del Grupo de Procesos Químicos y Biológicos del departamento de Ingeniería Química y Ambiental se han adelantado estudios experimentales enfocados a una interpretación conceptual del mecanismo de bioadhesión. Entre los aspectos investigados se encuentra la interacción polímero/mucina vía viscosimetría de soluciones diluidas, trabajos de adhesión, y en experimentos. Estos resultados demuestran la eficiencia de algunos polímeros utilizados para aplicaciones biológicas (como los derivados del ácido láctico, el ácido hialurónico, celulosa, carbopol, alcohol polivinílico, entre otros) como materiales mucoadhesivos, y se puede inferir que este comportamiento depende de la interacción entre las moléculas de polímero y la glicoproteína presente en el mucín. A partir de las mediciones realizadas, y de los estudios reportados en la literatura, los efectos macroscópicos observados en la mucina son función de una combinación de variables del entorno en el que estas se encuentran, el cual está constituido principalmente por agua y otros componentes propios de la fuente del mucín. Como consecuencia, se plantea como un desafío dilucidar los factores determinantes a nivel molecular de la interacción polímero mucina, para contribuir en una mejor comprensión del fenómeno de bioadhesión.

Una importante herramienta de amplio uso a nivel mundial en el campo farmacéutico es la Simulación Molecular, la cual ofrece ventajas como: a) disminución de experimentación *ex vivo* y *in vivo* necesaria, b) reducción de costos, c) posibilidad de estudiar fenómenos que no pueden ser abordados con las técnicas experimentales existentes, d) capacidad de explorar un mayor espectro de variables, e) abstracción que brinda el modelo matemático y computacional de los sistemas reales, y, e) capacidad

predictiva de las interacciones entre biomoléculas previo a la experimentación. Estas simulaciones general tienen limitaciones dependiendo de la complejidad del modelo que se use para emular los sistemas reales, teniendo en la cuenta que entre más complejo sea este, los fenómenos se podrán reproducir con mayor precisión, pero requerirá un consumo computacional muy alto, lo cual hace técnicamente inviable abordar cierto tipo de sistemas con modelos que capturan la mayor cantidad de detalles (ej: simulaciones de complejos macromoleculares considerando el movimiento de los electrones en los átomos).

Para el desarrollo de medicamentos ya son ampliamente utilizados a escala atómica, como Dinámica Molecular (MD), mecánica molecular cuántica (QMM) y Monte Carlo (MC), aplicándolos principalmente a la predicción de interacción y conformación de moléculas de fármacos y biomoléculas en sistemas orden de hasta 1×10^6 átomos para modelos a escala atómica. Por otra parte, la simulación de los fenómenos (viscosos, difusionales, asociaciones, separaciones de micropartículas, bioadhesión, etc) que pueden ocurrir entre un biopolímero transportado y el ambiente biológico del cuerpo, no puede alcanzarse utilizando las técnicas ya mencionadas, requiriendo implementar modelos a meso escala.

Uno de los métodos a meso escala que se destacan en la actualidad es la Dinámica de Partícula Disipativa (DPD), por su aplicación en la simulación de sistemas poliméricos (principalmente copolímeros dibloque) con muy buenos resultados, llegando a escalas de hasta micro segundos y varios nanómetros. En el campo biológico las investigaciones han empleado DPD, para el estudio (estático y dinámico) de membranas, lípidos y micelas; evidenciando el gran potencial que tiene esta técnica para el estudio de complejos macromoleculares, y la necesidad de normalizar el ajuste de los parámetros de interacción en sistemas biológicos, y así contar con modelos de biomoléculas a meso escala.

Teniendo en la cuenta lo anteriormente mencionado, el objetivo principal de la investigación descrita en el presente documento fue el planteamiento de un modelo simplificado de la proteína mucina y el desarrollo de un modelo computacional, mediante el uso del método de Dinámica de Partícula Disipativa, que permitiera representar las propiedades de la proteína en soluciones acuosas mediada por enlaces de azufre. Para la identificación de los fenómenos relacionados con su adsorción y desorción a polímeros mucosales. Para lograr este objetivo fue necesario construir un modelo de proteína que permitiera emular las principales características de la mucina en las condiciones de simulación adecuadas para poder representar los fenómenos que se deseaban estudiar.

otra parte, para verificar la capacidad de la técnica de simulación y del modelo para representar adecuadamente los sistemas reales de mucina y polímero, se buscó caracterizar y describir los mecanismos de agregación y de adsorción entre modelos de mucina y polímeros respectivamente. Para los polímeros se consideran 3 modelos de polímero con diferentes hidrofobicidades.

El modelo de simulación aquí propuesto permitirá conceptualizar sobre la naturaleza de la interacción polímero- mucina, y dará un soporte para el desarrollo inteligente de polímeros mucoadhesivos. Además, adicionalmente el planteamiento y validación posterior de este modelo facilita la simulación y estudio de otro tipo de fenómenos donde la mucina también está involucrada como el mecanismo de acción de cierto tipo de virus, la expresión de algunas clases de cáncer, o problemas de infertilidad femenina. Vale la pena mencionar que debido a la complejidad del fenómeno de mucoadhesión y la alta demanda computacional que tiene la simulación de este tipo de sistemas, el modelo desarrollado seguirá siendo refinado con el fin de poder emular el comportamiento de polímeros mucoadhesivos con el pH de los sistemas de mucinas, ya que esta es una de las principales maneras en que se pueden comparar resultados experimentales con resultados obtenidos mediante simulaciones.

El presente documento de investigación está constituido por 4 capítulos que exponen el trabajo llevado a cabo durante la investigación, de tal forma que cada uno de los capítulos puede ser abordado independientemente. En el primer capítulo se presenta el estado del arte de la investigación en el campo de biomateriales, bioadhesión, y simulación molecular, así como las bases conceptuales necesarias para el entendimiento y desarrollo de la investigación acá expuesta. En los capítulos 2 y 3 se presentan los resultados encontrados, donde cada uno de los capítulos contendrá su propia metodología, análisis de resultados y conclusiones asociadas con el eje temático central del capítulo. En esta forma en el capítulo 2 se abordará el modelamiento molecular a meso escala de las mucinas, describiendo desde la calibración del software, hasta las condiciones de simulación y las características del modelo configuracionalmente más estable. Seguidamente en el capítulo 3, se estudia el fenómeno de agregación de las mucinas, empleando los dos modelos de simulación propuestos, evaluando este comportamiento bajo diferentes condiciones experimentales y proponiendo los posibles mecanismos de agregación los cuales se asocian este tipo de proteínas. Finalmente, el capítulo 4 trata la simulación del fenómeno de adsorción de los modelos de mucina sobre superficies, presentándose el modelamiento llevado a

la implementación a meso escala de superficies y los comportamientos encontrados para el proceso de adsorción de las mucinas.

1. MARCO CONCEPTUAL

Actualmente uno de los principales campos de investigación es el de nuevos materiales, buscando primordialmente obtener propiedades físicas y químicas especiales (resistencia, compatibilidad biológica o reactividad química, ligeros, renovables, entre otros) que les permitan ser incorporados en diferentes sistemas biológicos o artificiales. Entre los diferentes materiales que se han estudiado existe un interés creciente hacia los polímeros, específicamente los biopolímeros, debido a la versatilidad para ser empleados en diferentes sectores.

Los biopolímeros, denominados así principalmente por su origen biológico, y en algunos casos por su aplicación final (sistemas biológicos como el cuerpo humano), evidencian crecimiento en su investigación debido a su potencial para ser utilizados como: a). sustitutos de polímeros no biodegradables, b). implantes ortopédicos, c). dispositivos de liberación controlada de fármacos, entre otros, gracias a las propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad. El grupo de investigación de Procesos Químicos y Bioquímicos de la Universidad Nacional de Colombia ha desarrollado trabajos relacionados con biomateriales, enfocados en la síntesis de polímeros biodegradables (Bautista, 2009; Gaona, 2010), bioadhesivos (Vallejo, 2010) e implantes ortopédicos (Sera, 2009; Plazas, 2010).

Los materiales poliméricos presentan diversas posibilidades en aplicaciones farmacéuticas. Sin embargo, el uso de polímeros como potenciales transportadores de sustancias a través de matrices y como componentes de películas, debe considerar entre otros aspectos: i) la biocompatibilidad con ambientes fisiológicos; ii) la estabilidad de los polímeros durante el tiempo que tarda la liberación del fármaco; iii) las propiedades mecánicas cuando se encuentran cargadas con un fármaco; iv) la posibilidad de no presentar hinchamiento apreciable en medios acuosos y a temperaturas del cuerpo humano; v) la facilidad para su manufactura y el costo frente a otros sistemas terapéuticos (Fernández et al., 1998; Vega et al., 2005).

La biodisponibilidad se define como la habilidad de un fármaco de ser absorbido en el sitio de acción en el cuerpo después de ser administrado, por ende, una baja biodisponibilidad representa, para un compuesto activo, una baja eficiencia en el cumplimiento de su objetivo (Smart, 2005). Se cree que la principal barrera en la absorción de un principio activo cuando el medicamento es administrado en

forma oral, el mucus intestinal, el cual principalmente ofrece protección para las células epiteliales consiste en una membrana viscosa a través de la cual el fármaco debe difundirse para que pueda ser absorbido por la corriente sanguínea. Sin embargo, los aspectos relacionados con la absorción del fármaco en el organismo, no están claramente estudiados. Las interacciones moleculares entre el sistema de entrega del fármaco y la membrana mucosa, siendo objeto de estudio (Pardilla and Vallejo, 2008)

1.1 BIOADHESIÓN

La bioadhesión se puede definir como el estado en el cual dos superficies, al menos una de naturaleza biológica se mantienen unidas por largos periodos mediante fuerzas intermoleculares (Soria et al., 2005). Si la adhesión se da sobre una membrana mucosa, el fenómeno se denomina mucoadhesión. Los polímeros mucoadhesivos corresponden entonces, a macromoléculas sintéticas o naturales que son capaces de adherirse a estas superficies por un fenómeno de hidratación o por interacción intermoleculares (Pardilla and Vallejo, 2008)

La bioadhesión de sistemas para liberación controlada de fármacos ofrece varias ventajas entre las que pueden mencionar las siguientes (Hojas and Amiji, 2003)

- ◁ Largos tiempos de residencia de las dosis en el estómago. Esto incrementa la absorción del fármaco
- ◁ Altas concentraciones de fármaco en el sitio de adhesión, creando la fuerza impulsora para la captación por parte de la célula.
- ◁ Inmediata fijación del sistema sin previa dilución, ni posible degradación.
- ◁ Mejora la acción de antibióticos, contra tipos de bacterias que colonizan el estómago

1.1.1 LA MUCINA

Las mucinas son una familia de proteínas de alto peso molecular, altamente glicosiladas, producidas por algunos tejidos epiteliales en los vertebrados (Stearns, 2005). Aunque algunas mucinas están unidas a la membrana debido a la presencia de dominios hidrofóbicos que favorecen su retención, la mayoría de las mucinas son secretadas sobre las superficies mucosas o como un depósito mucoso. Estas mucinas poseen un núcleo lineal de proteínas, típicamente con un alto contenido de serina y treonina, que

glicosidado por cadenas laterales de oligosacáridos. El extremo N-terminal del núcleo se localiza en subdominios ricos en cisteína, los cuales se conectan con otros por enlaces disulfuro intramoleculares. En la Figura 1 se muestra el esquema de la estructura de donde se destacan sus principales dominios.

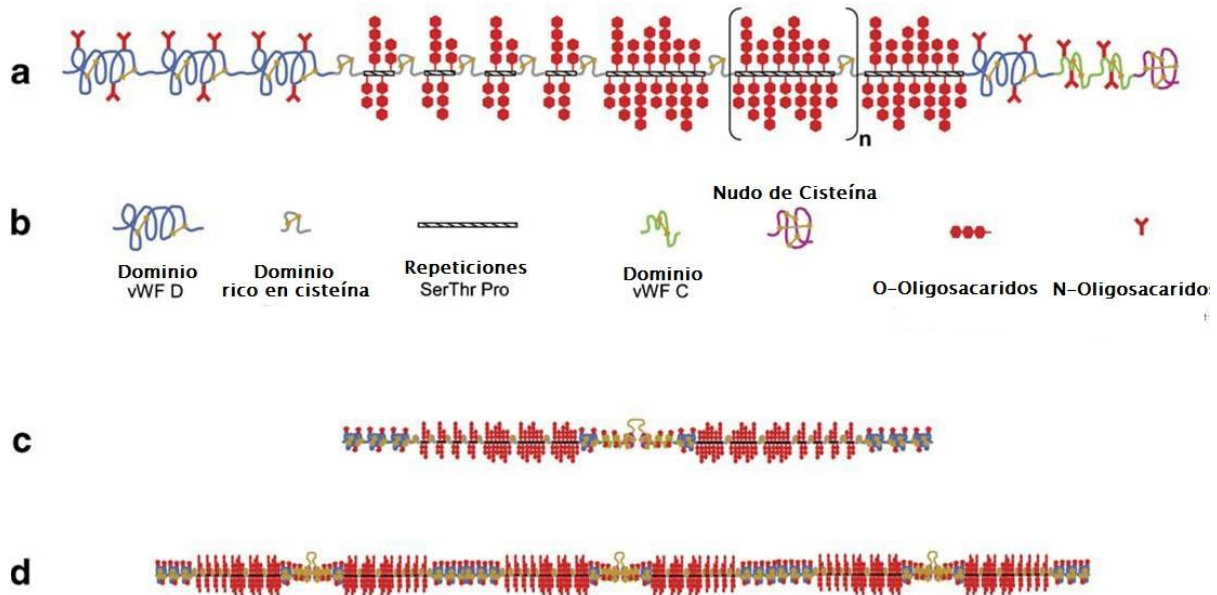


FIGURA 1. A), B) DOMINIOS QUE CONFORMAN LA ESTRUCTURA BÁSICA DE LA GLOPROTEÍNA MUCINA, (CD). MONÓMERO DE MUCINA Y TRÍMERO DE MUCINA RESPECTIVAMENTE. (BANSIL AND TURNER, 2006)

CARACTERÍSTICAS DE MUCINA

Una de las principales cualidades que exhiben las sustancia natural a agregarse y formar geles (Bansil et al., 1995) por lo cual gran número de investigaciones han sido realizadas al respecto empleando técnicas reológicas que han evidenciado comportamiento en soluciones acuosas de mucina (Celli J, 2005). Algunos estudios reportan la formación del gel a temperaturas inferiores a 30°C en concentraciones superiores a 14 mg por mililitro. Adicionalmente esta tendencia se ve ampliamente influenciada por el pH del medio, en donde se observan incrementos notables de la viscosidad en soluciones de mucina, gelificándose a pH inferior a 4 (Bansil and Turner, 2006).

La microscopía de fuerza atómica ha mostrado que mientras la mucina gástrica de cerdo existe como una molécula sencilla a pH 6 (radio de 400 nm), a pH inferior a 4 ésta tiende a agregarse

Turner, 2006) a pH 2 la mucina no tiene carga o tiene una baja densidad de carga, por lo cual las interacciones hidrofóbicas promueven la formación de agregados. La formación de agregados de mucina depende entonces principalmente del pH al que se encuentre el medio ya que determina la conformación de la molécula. De acuerdo con Bansal y Turner, 2006 a pH superior a 4 la estructura de la mucina será del tipo ovillo aleatorio, debido a la formación de enlaces entre grupos amino y ácido de las diferentes subunidades de la proteína, lo cual adicionalmente hace que los grupos hidrofóbicos de la molécula se oculten, como se ilustra en la Figura 2. Por otra parte, al reducir el pH de una solución de mucina por debajo de 4, la estructura característica es de tipo vara o gusano, ya que alargado las regiones hidrofóbicas son expuestas y se facilita la asociación entre diferentes monómeros mediante interacciones hidrofóbicas, como se ilustra en la Figura 3. adicionalmente se destaca el hecho de que la conformación que puedan alcanzar los agregados de mucina se ve influenciada por la cantidad de monómeros presentes. En la Figura 3 se presentan resultados experimentales encontrados para el radio hidrodinámico aparente de diferentes configuraciones de mucina en solución en función del pH y la concentración, haciéndose evidente que para el pH 4 al cual la molécula se encuentra en su tamaño de los agregados no se ve influenciado significativamente por variaciones en la concentración, mientras que a valores diferentes de acidez la carga que tenga la molécula induce una dependencia importante con la concentración.

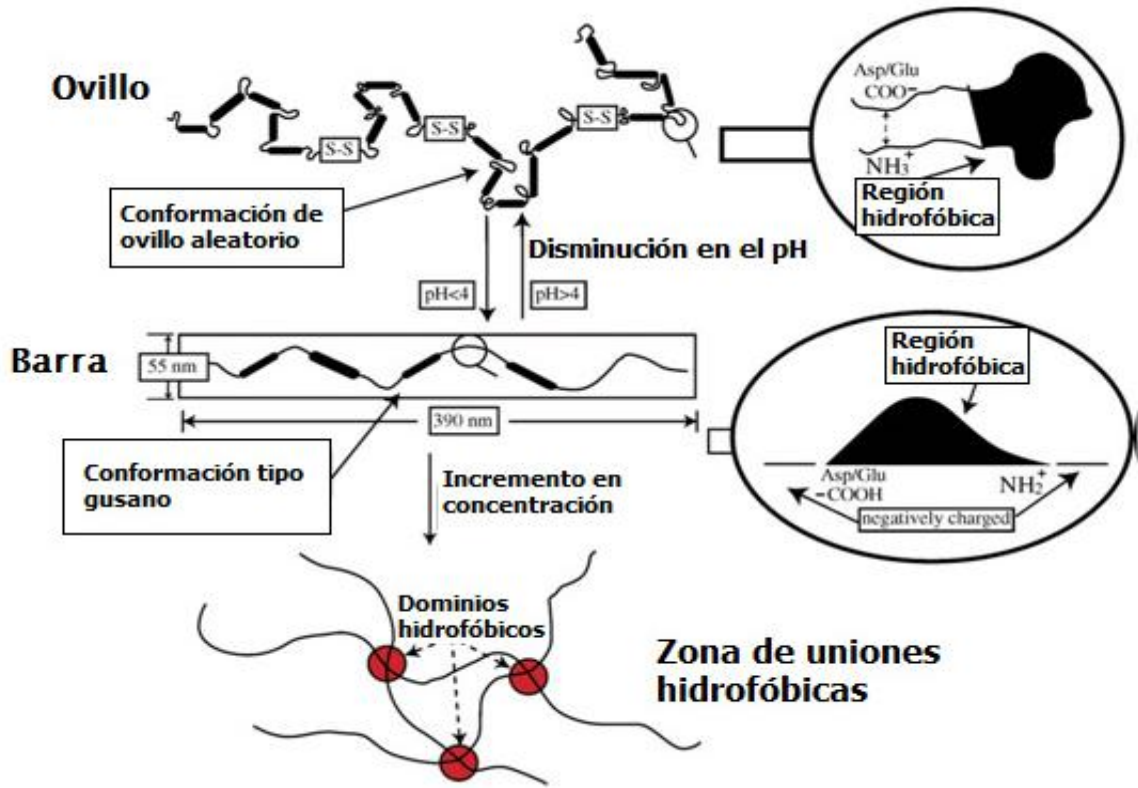


FIGURA2. ESQUEMA DE LAS DIFERENTES CONFORMACIONES DE LA GLICOPROTEÍNA MUCINA (OVILLO ALEATORIO O RODILLO) EN FUNCIÓN DE LA ACIDEZ DEL MEDIO (BANSIL AND TURNER, 2006)

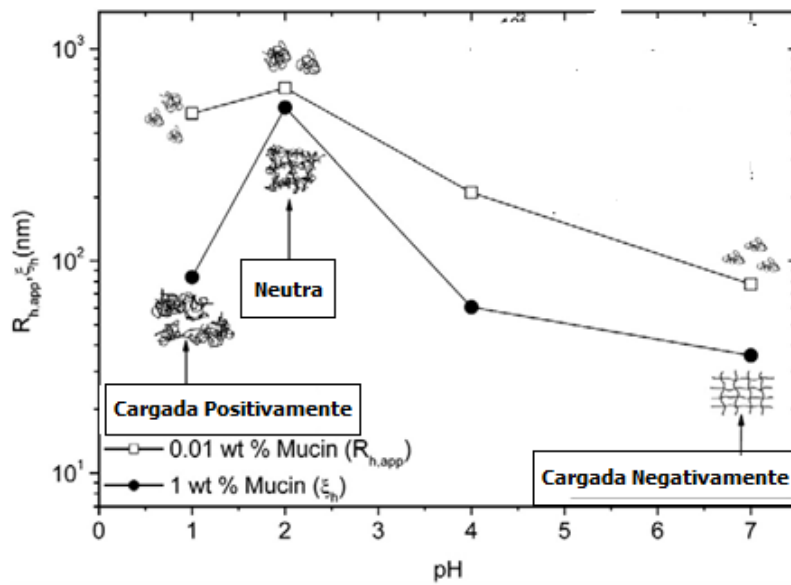


FIGURA3. COMPORTAMIENTO DEL RADIO HIDRODINÁMICO APARENTE PARA AGREGADOS DE MUCINA EN FUNCIÓN DEL PH Y LA CONCENTRACIÓN (NYSTRÖM ET AL., 2010)

Como ya se ha podido identificar previamente, la capacidad de las mucinas para formar agregados es una de las características más importantes que determina la funcionalidad de esta glicoproteína en el organismo. Por tanto para un adecuado entendimiento del fenómeno de mucoadhesión, es de vital importancia una acertada comprensión con respecto a la naturaleza de agregación entre mucinas, previo a la asociación de superficies poliméricas. La formación de estos agregados de mucina debe basarse en principios mecánicos de sistemas proteicos; a continuación se discutirá brevemente el fenómeno de agregación de proteínas.

1.1.2 AGREGACIÓN DE PROTEÍNAS

La eficacia y ciclo de vida de las proteínas puede ser ampliamente limitado por la agregación que ocurra entre ellas. Estudiar el mecanismo que gobierna la agregación entre estas especies es de vital importancia con el fin de entender la relación entre la formación de agregados y su biología. En la actualidad las nuevas técnicas experimentales han permitido aprender acerca de este fenómeno. Adicionalmente, estas técnicas de simulación computacional brindan la posibilidad de estudiar nuevos escenarios y analizar fenómenos que no pueden ser vistos desde el laboratorio. El primer paso previo que se tiene actualmente acerca de los modos de agregación es formular estrategias y sistemas biológicos que combatan asociaciones no deseadas de proteínas. Los sistemas que puedan tener interés en campos de la medicina o la farmacología (Wang and Roberts, 2010).

La agregación de proteínas está ampliamente asociada con patologías de las enfermedades. Muchas de ellas han sido ligadas con fenómenos de agregación de proteínas. Otra área donde es importante el estudio de la agregación de proteínas, concierne a la purificación y administración de proteínas que contengan agregados, los cuales han demostrado estimular la respuesta inmune del cuerpo (Wang and Roberts, 2010). Adicionalmente en algunos casos, la agregación puede no ser la causante de la enfermedad, sino la respuesta inmunológica del cuerpo como ocurre en el caso de las mucinas nasales que son sobreexpresadas en caso de una gripa, o en el estómago donde se asocia a ciertos tipos de cáncer. Por lo tanto una forma eficaz para prevenir y tratar numerosas enfermedades, sería poder identificar las características importantes de las proteínas que afectan su agregación y determinar el mecanismo por el cual éstas actúan. Los estudios empíricos son la base fundamental para poder

entender cómo prevenir la agregación de proteínas, y a partir de esto se puede determinar a través de los cuales los diferentes estados de las proteínas promueven su agregación.

Dos efectos importantes en la agregación de proteínas son los cambios químicos y las fluctuaciones térmicas. Sin embargo se ha evidenciado que las células exponen una amplia gama de formas para contrarrestar estas agregaciones, empleando en ocasiones disposiciones de las proteínas así como las fuerzas de atracción y repulsión se originan por la variedad de cambios químicos en los extremos de las proteínas, los cuales en general buscan asociaciones energéticamente favorables. La mayoría de las interacciones que contribuyen en el plegamiento de proteínas son no covalentes, sin embargo enlaces covalentes entre grupos tiol de residuos de cisteína pueden ocurrir generando enlaces disulfuro (Wang and Roberts, 2010)

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS AGREGADOS DE PROTEÍNAS

A partir de una variedad de técnicas microscópicas se ha identificado en general algunas características morfológicas comunes que los agregados se pueden categorizar como amorfas o fibrilares. La estructura de los agregados amorfos se ha asociado con asociaciones aleatorias de los grupos hidrofóbicos de las proteínas cuando no se encuentran en su estado nativo; en algunos casos estos agregados amorfos pueden tener inclusiones de proteínas con un orden definido. Los agregados fibrilares se asocian con la formación de estructuras ordenadas, encontrándose una amplia gama de longitudes, interconexiones y diámetros posibles. Las diferencias entre estos agregados se deben principalmente a la forma y condiciones de preparación (Wang and Roberts, 2010)

Algunas proteínas han mostrado rutas en las cuales a partir de sus estructuras conformacionales oligómeros antes de evidenciar la conformación fibrilar, adicionalmente los oligómeros formados caracterizan por tener números definidos de unidades de proteína. Dependiendo de la longitud de la cadena y el número de especies que participan en la oligomerización se pueden encontrar formas tanto abiertas como cerradas. En general se ha encontrado que diferentes proteínas pueden experimentar agregaciones intermedias similares que conducen a morfologías finales específicas diferentes.

MODELOS DE AGREGACIÓN

Para describir la agregación se han propuesto varios mecanismos los cuales son basados en las secuencias genéticas que han sido observadas. Los estados intermediarios metastables de monómero son responsables de la formación de agregados debido a que están parcialmente plegados exponiendo residuos que no normalmente son accesibles a otros grupos funcionales. Se ha encontrado a partir de los estudios sobre plegamiento de proteínas que una densidad de contacto hidrofóbico es requerida para estabilizar cualquier estado condensado o inducir la agregación. En varias proteínas, las condiciones apropiadas para la agregación se encuentran típicamente en condiciones en las que las proteínas están parcialmente plegadas, sin embargo experimentalmente no es posible identificar si la agregación se produce solamente a partir de estados parcialmente plegados o si moléculas completamente desplegadas forman también agregados.

Otro factor que se considera en los modelos de agregación es el efecto de las velocidades de asociación a diferentes concentraciones y condiciones de agregación para la formación de agregados de gran tamaño.

Recientemente se ha encontrado que los estados nativos de las proteínas no son alcanzados de manera simple, ya que la proteína tiene una variedad de opciones a través de las cuales puede llegar a una conformación estable, lo que a las proteínas podría imaginarse como un ensamble de posibles conformaciones. Tales modelos son basados en la mecánica estadística, en la cual los estados de mínima energía corresponden a una colección de estructuras nativas y desplegadas alcanzadas a través de cualquier trayectoria que no sea energéticamente prohibida. La mayor dificultad en la interpretación de ese fenómeno radica en la inhabilidad para observar experimentalmente conformaciones individuales; actualmente una de las herramientas experimentales más importantes que puede ser usada es NMR, sin embargo en la práctica ese tipo de técnica puede ser costosa y requerir bastante tiempo para adquirir e interpretar los datos obtenidos, por lo que el análisis computacional ha presentado como una alternativa eficiente para explorar los mecanismos que gobiernan el plegamiento y agregación de proteínas.

RUTAS CINÉTICAS DE AGREGACIÓN

El mecanismo general de agregación de proteínas se presenta en la Figura 4, en la cual se evidencia la complejidad del fenómeno que involucra múltiples etapas y se caracteriza por etapas reversibles e irreversibles, donde en cada uno de estos se tendrá que definir el mecanismo global de agregación. Adicionalmente al mecanismo presentado en la Figura 4, se ha ilustrado la posibilidad de modificar las etapas de formación de oligómeros, si en el sistema se incluyen componentes adicionales como superficies.

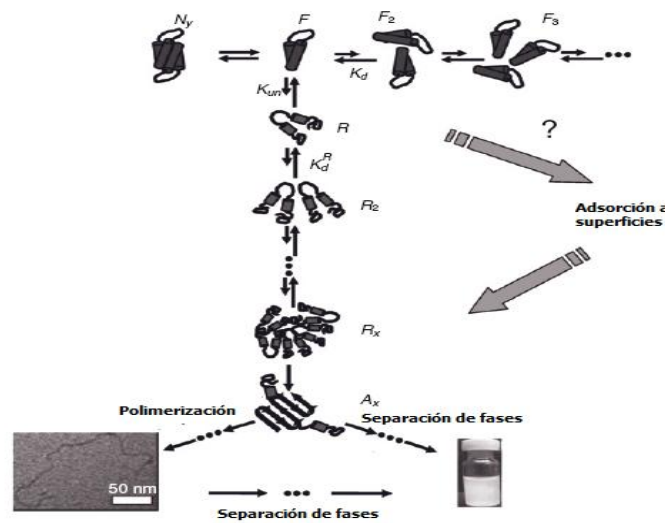


FIGURA 4. ESQUEMA DEL MECANISMO GLOBAL DE AGREGACIÓN DE PROTEÍNAS (WANG AND ROBERTS, 2010).

El mecanismo mostrado en la Figura 4 involucra etapas en las cuales el monómero inicialmente puede presentar plegamiento en su estructura, y eventualmente se asocia mediante fenómenos de nucleación para formar oligómeros de bajo peso molecular. Después de la nucleación los comportamientos de la agregación observada pueden agruparse en tres categorías (Wang and Roberts, 2010)

- < Los agregados permanecen solubles pero no crecen significativamente.
- < Los agregados permanecen solubles pero crecen rápidamente a especies de alto peso molecular.
- < Los agregados empiezan a agruparse entre ellos, experimentando una separación de fases que puede ser evidente a nivel macroscópico.

En la tabla 1, de igual forma se presentan de modo diferencial los mecanismos de agregación característicos que pueden ser identificados a partir de experimentales, y se indican los órdenes de agregación que permiten identificar dichos mecanismos.

En general se encuentran que los sistemas son difíciles de estudiar experimentalmente, la información ha brindado diferentes técnicas que ha permitido el diseño de experimentos tratables en las cuales se puede probar y refinar hipótesis sobre estructuras y mecanismos del fenómeno de agregación de proteínas.

TABLA 1. RESUMEN DE VALORES CARACTERÍSTICOS EXPERIMENTALES PARA DISTINGUIR POSIBLES VÍAS DE AGREGACIÓN CON BASE EN CINÉTICAS EN FUNCIÓN DEL PESO MOLECULAR M_w Y/O LA FRACCIÓN RESIDUAL DE MONÓMERO.

Vía cinética	Paso limitante de la velocidad	d	Agregados solubles	Z	n
Limitada por el plegamiento		1	0	<1	^a
Limitada por la asociación					
	Crecimiento lento	2	1	2	-0
	Polimerización en cadena rápida	1	1	3/2	1
	Polimerización por condensación rápida	2	1	2	>>1
Nucleación (y crecimiento)					
	Crecimiento lento	x 2	x 1	x	-0
	Polimerización en cadena rápida	1	1		1
	Polimerización por condensación rápida	>1			>>1
Químicamente controlada					
	Agregación covalente	n_c 1	0	f	-0
	Polimerización de formación de enlaces disulfuro	p_o 3/2	0	0	^e

Adaptada de Wang y Berts, 2010

- a. Orden de reacción basado en $dM/dt = k_{obs}M^v$
 b. Orden de reacción basado en $\log k_{obs}$

- c. Exponente de escala para el peso molecular del total de agregados como una función de la fracción molar de monómero convertido en agregado.

1.1.3 INTERACCIONES POLÍMERO MUCINA-AGUA

La interacción proteína-superficie polimérica y su posible efecto en el sitio de acción, es uno de los temas más importantes en el campo de los materiales bioadherentes, ya que estos determinan la biocompatibilidad del polímero y la capacidad de permanecer en contacto con la superficie por períodos prolongados. Por tal razón, se encuentran un gran número de estudios enfocados al desarrollo de técnicas que permitan entender los mecanismos que ocurren a nivel molecular, donde la química de superficie influye la orientación, conformación y organización de las proteínas adsorbidas. De entender estos procesos es crítico si se desea ir más allá del diseño de superficies basado en ensayo y error a una propuesta donde se controle directamente la bioactividad de la proteína adsorbida y por consiguiente el control de la respuesta celular.

Debido a la relevancia que tiene las interacciones superficie-proteína, en las décadas pasadas se han centrado esfuerzos en experimentos y modelos físicos relacionados con la adsorción de proteínas como finalidad medir, predecir y entender los detalles de esta interacción. Gracias a estos desarrollos, hoy en día se conocen los factores que afectan la adsorción de proteínas en superficies hidrofóbicas e hidrofílicas, la interacción de superficies cargadas con entes de carga opuesta. Sin embargo, la naturaleza del mecanismo submolecular y los reordenamientos estructurales, las múltiples interacciones entre los grupos funcionales de las proteínas, superficie del material y fluidos corporales son muy complejas y poco entendidas. Lo anterior evidencia la dificultad para predecir de manera precisa la conformación, organización y bioactividad de las proteínas, complicando el diseño de superficies con especificidad. Sin embargo, poder predecir la interacción proteína-superficie a nivel submolecular (Barnette et al., 2005).

Aunque aún no se conoce completamente los mecanismos de adsorción de la proteína a la superficie de biomateriales, los investigadores (Mans and Roberts, 2010) de algunas décadas han logrado acercarse al entendimiento del proceso complejo y multifacético de la interacción entre la superficie y la proteína. La adsorción de una proteína a una superficie se representa en la Figura 5, y puede ser descrita mediante las ecuaciones químicas 1 y 2.

(1)

(2)

Donde:

P: Proteína

S: Superficie

P.S: Proteína asociada con la superficie de forma reversible

m, n, r, v: Coeficientes estequiométricos que indican la cantidad de moléculas de agua involucradas en el proceso.

P_i : Proteína asociada con la superficie de forma irreversible.

k_r : Constante de velocidad de adsorción reversible

k_f : Constante de velocidad de desorción

k_i : Constante de velocidad de adsorción irreversible

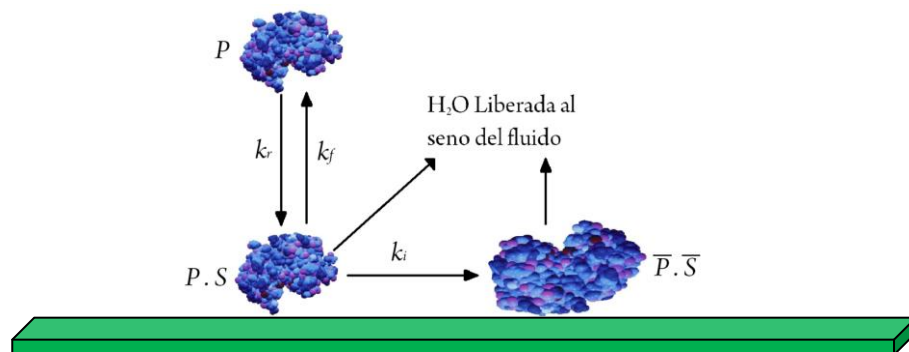


FIGURA 5. PROCESO DE ADSORCIÓN DE UNA PROTEÍNA A UNA SUPERFICIE (ADAPTADA DE LATOUR, 2005)

El cambio conformacional de la segunda reacción irreversible, es asociado a un cambio en la energía libre de Gibbs, siendo esta menor en el estado final, puesto que la proteína tiende a agruparse según sus interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas con la solución y la superficie de la proteína (Latour, 2005).

BIOPOLÍMEROS MUCOADHESIVOS

De acuerdo con el tipo de interacciones que existen entre los polímeros y la mucina, estos se pueden clasificar de acuerdo con su mecanismo de enlace en no covalentes y covalentes (Perilla and Vallejo, 2008)

En el primer grupo se encuentran los polímeros con grupos funcionales que pueden tener alguna interacción electrostática con las mucinas destacándose las moléculas con grupos carbonilo. En el segundo tipo se encuentran los polímeros capaces de formar enlaces covalentes, que son una nueva generación de polímeros, denominados tíómeros, pues tienen el grupo funcional tiol en sus cadenas. La formación de enlaces disulfuro entre el tíómero y las mucinas se lleva a cabo por dos vías: i) reacciones de intercambio tiol/disulfuro y/o ii) procesos simples de oxidación de los grupos tiol libres. Por lo tanto, los tíómeros imitan el mecanismo natural de las glicoproteínas mucosas secretadas, las cuales son también capaces de formar enlaces covalentes a la capa mucosa por la formación de enlaces disulfuro. La velocidad de formación de este tipo de enlaces depende de la concentración de aniones tiolato, los cuales son la forma reactiva de las reacciones de intercambio y procesos de oxidación (Perilla and Vallejo, 2008)

Investigación de procesos químicos de la Universidad Nacional de Ingeniería sintetizado polímeros biodegradables basados en estrellas de poli(ácido láctico), donde en los terminales de cadena se encuentran grupos funcionales tipo tiol para inducir su mucoadhesión (Pineda, 2009)

Se han encontrado dos etapas determinantes en el fenómeno de mucoadhesión: i. La etapa de contacto, en la cual se forma un contacto íntimo entre el mucoadhesivo y la capa mucosa; y, ii. La etapa de consolidación, en la cual ocurren varias interacciones fisicoquímicas para consolidar y fortalecer la unión adhesiva, permitiendo una interacción prolongada (Song et al., 2005)

En cuanto a la etapa de consolidación, se aceptan dos teorías que explican el mecanismo de mucoadhesión (Perilla and Vallejo, 2008) primera es la teoría de interpenetración de Perilla y Sahlin, en la cual las moléculas mucoadhesivas interpenetran y se enlazan con las glicoproteínas por interacciones secundarias, como fuerzas de Van der Waals o puentes de hidrógeno. La segunda es la teoría de deshidratación (Smart, 1999) la cual establece que cuando un material capaz de lograr una gelación rápida en un ambiente acuoso, es puesto en contacto con un segundo gel, ocurre un movimiento de agua entre los geles hasta que se alcanza el equilibrio. Se puede decir que las dos teorías, son compatibles con la actualidad el mecanismo de mucoadhesión es un proceso de interpenetración (Perilla and Vallejo, 2008)

Como se mencionó anteriormente, el uso de los principios de bioadhesión para el diseño de sistemas terapéuticos farmacéuticos, presenta unas posibilidades muy altas de aplicación y de diseño. En este contexto es de crucial importancia conocer la naturaleza de las interacciones entre el polímero y las proteínas que componen el tejido vivo. Una de las metodologías alternativas para estudiar el comportamiento de los polímeros en forma aislada y en mezclas, consiste en la determinación de la viscosidad intrínseca empleando viscosimetría capilar como una manera para interpretar las posibles interacciones de los polímeros con el solvente y en mezclas (Nezdyset al., 2000; Kavlak and Guner, 2006). Sin embargo, la relación entre reología de la mezcla polimérica y el comportamiento mucoadhesivo de los polímeros no es claro (Koufi et al., 2006). A lo anterior se suma la dificultad para cuantificar el fenómeno, lo cual no ha permitido tener una evidencia directa de la naturaleza de las interacciones. Las técnicas para determinar la naturaleza de la interacción bioadhesiva corresponden a las técnicas *in vitro* incluyen ensayos de destrucción de la unión adhesiva por fuerzas de corte, peeling y tensión, que se relaciona con el trabajo realizado sobre el sistema de las superficies a partir de una interface formada por un sustrato biológico y un polímero. Las técnicas *in vivo*, son mucho más complejas e incluyen la marcación del polímero con ^{99}Tc para examinar su distribución en una región específica como, el tracto gastrointestinal, mediante el empleo de análisis de imágenes, después de una administración por vía oral del producto bioadhesivo a un reactivo biológico de prueba (Peppas and P.A., 1985).

Vale la pena mencionar algunos trabajos experimentales que han permitido un acercamiento a los fenómenos que gobiernan la adsorción de la mucina; entre estos se destaca el uso de PGSE (Resonancia magnética nuclear a pulsos de gradiente de campo) para estudiar la difusión de polímeros en soluciones de mucina, evidenciando que los polímeros no cargados tienden a restringir la difusión debido a la generación de obstrucciones físicas en la red de la mucina, mientras que los polímeros cargados muestran interacciones específicas, con dependencia del pH (Occhipinti)(Occhipinti)(Occhipinti)(Occhipinti). Del trabajo de otros investigadores (Hansson)(Hansson)(Hansson)(Hansson), se ha direccionado ampliamente en la estructura y funciones de las mucinas, enfocándose principalmente a las mucinas existentes en el tracto digestivo y en el intestino. En otras investigaciones se ha evaluado la bioadhesión de mucina extraídas de intestinos de cerdos, en fluidos gástricos simulados sin pepsina y otros factores (Ofskansare et al., 2007), de manera similar a Wirth, M., et al. (Wirth et al., 2002) en la influencia de la mucina

en las propiedades citoadhesivas de las lectinas que otras interacciones entre la lecitina y la mucina son específicas, reversibles y dependen de la concentración de lecitinas; se evidencia que de ser reversible desfavorece la prematura inactivación de la lecitina (Svensson, 2008). En el año 2008 caracterizó la interacción entre la mucina, otras proteínas presentes en el gel mucoso, y con los polímeros usados en formulaciones farmacéuticas, encontrando dependencia de la adsorción con el pH y de electrolitos, así, se proponen que las interacciones están mediadas por puentes de hidrógeno. Respecto al tipo de interacciones intermoleculares que se presentan en el fenómeno de mucoadhesión encuentran dos tipos de clasificaciones: iónicas y covalentes (Perilla and Vallejo, 2008). Mientras que la adhesión en materiales poliméricos se puede clasificar por uniones físicas (Vallejo and Perilla, 2008).

En Vallejo y Perilla (Vallejo and Perilla, 2008) mencionan algunos trabajos de bioadhesión realizados con diferentes polímeros como ácido hialurónico, alginatos, almidón con gran contenido de amilosa que han permitido hacer la modificación para mejorar las propiedades adhesivas, con potenciales aplicaciones para el control de la liberación de fármacos. Con respecto a las limitaciones de los polímeros bioadhesivos de primera generación, se han realizado algunas modificaciones que emplean grupos de acoplamiento con cisteína, ácido tioglicólico o cisteamina a polímeros como carbómeros, quitosano y alginatos. Con estos polímeros se forman uniones disulfuro que pueden inhibir la sobrehidratación y la formación de mucilagos resbalosos, que hacen más estable la unión adhesiva. Un importante descubrimiento fue el empleo de las lecitinas, proteínas o glicoproteínas inmunológicas, con la capacidad para reconocer moléculas de azúcar y unirse a componentes glicosilados de la mucina. Estos son considerados bioadhesivos de segunda generación porque tienen la capacidad de interactuar específicamente, con los residuos mediante interacciones (Vallejo and Perilla, 2008).

Recientes investigaciones intentaron caracterizar y cuantificar el mecanismo de bioadhesión del quitosán, el cual es un copolímero de glucosamina y N-acetilglucosamina con una amina primaria y dos grupos hidroxilo libres por cada C6 unidades de construcción. Estos grupos amino libres le atribuyen al quitosán una carga positiva que le permiten su reacción con las especies cargadas negativamente (Perilla et al., 2009). De manera similar, Brasona, I., et al. (Brasona et al., 2007) valoraron el potencial bioadhesivo del quitosán y quitosano butilcarbodiato tiolado, en ensayos *in vivo*, evidenciando un aumento en la bioadhesión gracias a interacciones no covalentes (interacciones iónicas y puentes de hidrógeno).

hidrógeno) con las cadenas de polisacáridos se encontró también presencia de grupos tiol incrementa la capacidad mucoadhesiva. Se cree que este fenómeno se da gracias a la formación de enlaces covalentes entre los residuos de cisteína de las glicoproteínas mucosas. Otros resultados (Dedinaite) 2008 atribuyen la fuerte adsorción de quitosán a las interacciones de las cargas opuestas de ácido siálico, de los residuos peptídicos de la mucina y los grupos aminos del quitosán.

Con relación a la capacidad bioadhesiva del ácido hialurónico (HA), se llevó a cabo un estudio *in vitro* empleando HA de varios pesos moleculares y microsferas de cierta rigidez (Richard et al., 1996). Los resultados mostraron una adhesión comparable a la de HA y evidenciaron que el HA posee una excelente adhesión. La inclusión de medicamentos en dispositivos biodegradables y biocompatibles de HA, lo hacen un atractivo prospecto para la liberación transcutánea. Mayol, L., (Mayol et al., 2008) investigaron la reología, mucoadhesión y propiedades *in vitro* de poloxámeros de ácido hialurónico formando hidrogeles para la liberación de medicamentos.

En un trabajo experimental previo realizado por el grupo Procesos Químicos y Bioquímicos de Universidad Nacional del Vallejo (Vallejo, 2010) se abordó el estudio del comportamiento bioadhesivo de algunos polímeros de uso farmacéutico como carbopol, PLA, quitosán, alcohol polivinílico, celulosa, ácido hialurónico, entre otros, usando mucinas de origen animal. Se llevaron a cabo estudios de viscosidad a dilución infinita de mezclas de los polímeros y la mucina para comprender los fenómenos a nivel molecular. Se encontró que si bien estos sistemas presentan fuertes desviaciones de la idealidad, la viscosimetría de soluciones diluidas permite inferir el efecto de la interacción polímero-mucina en el comportamiento bioadhesivo. Los resultados macroscópicos del trabajo de adhesión se evaluaron en comprimidos y películas de los polímeros bajo ensayos mecánicos de tracción. Como aplicación particular del fenómeno se evaluó la propiedad de adhesión *in vivo* ensayando nanopartículas recubiertas por uno de los polímeros bajo estudio.

1.2 MODELAMIENTO MOLECULAR

Una herramienta muy utilizada para el entendimiento de los fenómenos que se dan a nivel molecular es la representación empleando un modelo (general matemático), que pueda ser estudiado con mayor facilidad, pero que reproduzca con fidelidad el comportamiento del objeto que se buscaba representar. Para ello, en primer lugar identifica el sistema a modelar mediante la selección de una parte del mundo físico cuyo comportamiento específico queremos explicar, predecir o reproducir, teorizamos una serie de hipótesis (teoría) de las cuáles intentamos derivar predicciones acerca de tal comportamiento. Este es un proceso que puede estar más o menos basado en el conocimiento de éste u otros sistemas similares a los que se modela, en forma que a partir de todo ello podemos construir simulaciones (modelos de trabajo) utilizando una metodología como la que se describe en (Dobson, 2005).

1.2.1 MODELAMIENTO DE BIOADHESIÓN

Para poder cuantificar el fenómeno de bioadhesión se debe hacer un análisis termodinámico del sistema bioadhesivo (equilibrio de fases), esto involucra el planteamiento de modelos termodinámicos matemáticos que permitan extraer propiedades del sistema. En la Figura 6 se ilustra el proceso en la cual se analiza el equilibrio de fases mediante 3 etapas, a partir de la construcción o implementación del modelo abstracto, su solución matemática o simulación, para finalmente asociarle un significado físico, que permita relacionarlo con el mundo real y sacar conclusiones acerca de este.

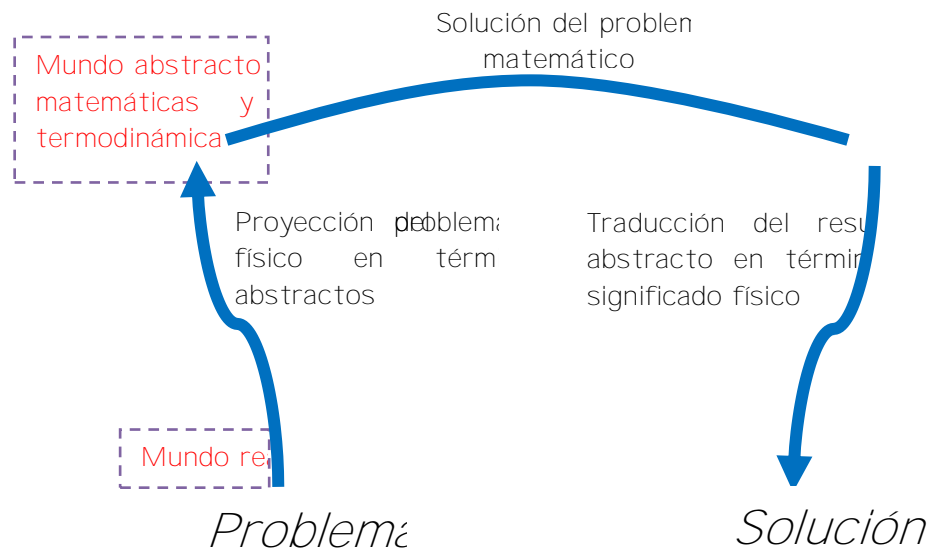


FIGURA6. LAS TRES ETAPAS EN LA APLICACIÓN DE LA TERMODINÁMICA A LOS PROBLEMAS DEL EQUILIBRIO DE FASES (GRAUSNITZ AND LICHTENTHALER, 2000)

Así, a partir de las características de los sistemas cohesivos se ha definido desde el punto de vista macroscópico el estado termodinámico de la interfase, para la cual se define la tensión interfacial como el aumento en la energía libre de Gibbs de todo el sistema, resultado del incremento en el área interfacial cuando el proceso se realiza en condiciones de temperatura, presión constante y número de moles constante (Leites and Richards, 1999). Según la ecuación

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T, P, n_i} \quad (3)$$

Donde:

γ : Tensión interfacial

G : Variación de la energía libre de Gibbs asociado al cambio en el área interfacial a temperatura, presión y moles constantes

El desarrollo para el análisis de la interface se plantea como sigue (Leites and Richards, 1999) en las Ecuaciones 4 y 5

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T, P, n_i} \quad (4)$$

$$\dots - \dots \quad (5)$$

Donde:

ΔS_{int} : Cambio de entropía asociada con la interface

ΔH_{int} : Cambio de la entalpía asociada con la interface

$\frac{d\gamma}{dT}$: Variación de la tensión interfacial asociado a la variación de la temperatura a presión y n de moles constante

T_{int} : Temperatura interfacial

En síntesis, puede considerarse que el estudio termodinámico de la interface formada implica la cuantificación de la energía en exceso y de la entropía asociada a la adsorción de la proteína en la superficie (Valderrama et al., 2008). De manera similar, Kurt y colaboradores (Kurt et al., 2007) proponen otro modelo para la energía libre total del fenómeno de adhesión en la superficie desde el punto de vista de la energía libre (Kurt et al., 2007).

$$\dots \quad (6)$$

Lo cual representa el cambio energético, asociado a tres contribuciones, debido a la adsorción de la proteína en la superficie, al cambio en las energías de enlace tanto de la especie adsorbida como de la superficie, así como las flexiones que se inician en las especies. Otras aproximaciones para el cálculo de la energía libre se encuentran en las referencias (van Oss et al., 2001; Hoff and Sergeyev and Sergeyev, 2004) y (Muller, 2005).

La cuantificación de la energía libre de Gibbs involucrada en la adhesión, se puede expresar mediante un modelo basado en la mecánica estadística y el método de relación de probabilidad (Gunsteren and Weiner,)1989).

$$\dots - \dots - \dots \quad (7)$$

Donde k_B , es la constante de Boltzmann, T_{abs} es la temperatura absoluta y P_{∞} es la densidad de probabilidad de que el ente (proteína, péptido, etc) se encuentre a una distancia r de la superficie.

SD_i y SD_∞ , respectivamente, SD un valor de referencia escogido para representar la densidad de probabilidad para un ente, a una distancia lo suficientemente separada de la superficie, de tal forma que no sienta ningún efecto por parte de esta. Este tipo de representación ha sido empleada por otros autores para el desarrollo de simulaciones moleculares (O'Brien et al., 2008; Baut et al., 2005).

Se pueden encontrar otros modelos para la cuantificación de la energía libre de adsorción, como el reportado por Wei y Latour (Wei and Latour, 2008) basada en técnicas experimentales de SPR (inglés: surface plasma resonance); (Latour, 2006) también presenta un completo análisis termodinámico para el fenómeno de adsorción de proteínas sobre superficies, en medios acuosos en un enfoque molecular.

1.2.2. SIMULACIÓN COMPUTACIONAL

Una de las posibles maneras de concebir modelos de trabajo para el análisis de fenómenos moleculares es la implementación de herramientas computacionales. Estos modelos generados por computador tienen ciertas ventajas comparadas con los modelos mecánicos, siendo una de las más importantes el hecho de poder ser interrogados para obtener información cuantitativa, tales como energía o el área superficial, sumándole a esto la capacidad que se tiene para conseguir rotar, trasladar y aumentar la imagen computacional de la molécula, así como la posibilidad que poseen algunos paquetes para generar una retroalimentación cuantitativa del efecto de alterar la estructura (Leach, 2001). La experimentación que es llevada a cabo empleando modelos computacionales se conoce como simulación por computadora, sin embargo también es común denominarla *simulación molecular*.

Existe una creciente tensión de la simulación molecular computacional en distintas áreas científicas a nivel mundial. En Colombia, se han realizado también esfuerzos importantes, vale la pena destacar algunas aproximaciones hechas en el área, por parte de grupos de investigación de la Universidad Nacional de Colombia, como el de Química Teórica, Simulación de Sistemas Gas-Físicos, Investigación en Sistemas Inteligentes para Procesos Químicos y Bioquímicos, entre otros. La ingeniería química se

está involucrando cada vez más¹, y tanto en la aplicación como el desarrollo de métodos de modelamiento molecular, y esta tendencia contribuye en la aplicación de los problemas prácticos.

La simulación computacional posee métodos que permiten el estudio de fenómenos físicos y químicos en determinadas escalas de tiempo y longitud dependiendo de las características propias del método utilizado. De modo general se pueden agrupar estas técnicas de simulación en 4 grandes áreas: Métodos cuánticos, métodos atomísticos, métodos a mesoescala y métodos del continuo, tal como se ilustra en Figura 7. Esta clasificación se da principalmente con relación a los niveles de tiempo y longitud que pueden ser alcanzados por una técnica de simulación dada, bajo los actuales recursos computacionales existentes. A nivel investigativo es común encontrar

Los métodos del continuo o macroescala se pueden considerar como todas aquellas técnicas computacionales que son empleadas en el marco de la ingeniería química tradicional, que incluyen por ejemplo modelamiento con elementos finitos, y que permiten los sistemas que se componen principalmente de fluidos continuos. Los otros 3 métodos se pueden enmarcar en el paradigma de la nueva ingeniería química, la cual incluye el diseño de producto considerando las interacciones moleculares que determinan la funcionalidad del producto.

Los métodos cuánticos o microescala se basan en la solución de la ecuación de Schrodinger mediante aproximaciones numéricas, y se puede decir con respecto a este que considera los movimientos de los electrones dentro del sistema (Leach, 2001; Frenkel and Smit, 2001). Debido a lo costoso que llega a ser computacionalmente la solución de los métodos numéricos que emplean estos métodos y la cantidad de cada uno de los electrones del sistema, este tipo de simulaciones en la actualidad solo es posible para sistemas con un orden de hasta 10³, y en periodos de hasta pico segundos.

Por otra parte los métodos atomísticos, asumen que el movimiento de los átomos se debe principalmente al movimiento de neutrones y protones, ya que el movimiento de los electrones es despreciable en comparación a la de estos, esta simplificación es conocida como la aproximación de Born-Oppenheimer. Dentro de estos métodos atomísticos se destacan principalmente Dinámica Molecular (DM) y Monte Carlo (MC).

¹ Hace diez años, al menos cincuenta grupos académicos de ingeniería química empezaban a hacer investigación en este campo. La primera conferencia temática en Simulación Molecular Aplicada y Química Computacional en 1998 en el encuentro anual de la AIChE, fue una de las más extensas y exitosas.

2001; Frenkel and Smit, 2002). La potencia computacional hoy en día permite simular con estos métodos sistemas con un orden de 10^5 átomos, y en periodos de hasta nano segundos a escala atómica o molecular, permite el cálculo de propiedades termodinámicas de estado, equilibrio de fases, y también de propiedades de transporte como viscosidad, conductividad térmica, etc. (Maryland, 1999). Vale la pena destacar que una de las principales limitante de estos modelos es la incapacidad de simular fenómenos como difusión, transformación de fases, ya que ocurren en escalas de tiempo de hasta microsegundos, y se caracterizan por ser sistemas muy grandes como macromoléculas (Gao et al., 2010).

Con respecto a los métodos de simulación a escala meso, también conocidos como métodos de grano grueso, se puede decir que estos permiten la simulación de sistemas con un mayor número de átomos por periodos más largos gracias a que inducen simplificaciones mediante el agrupamiento de átomos en esferas que tendrán determinadas características en función de los átomos que los conforman (Frenkel, 2001). Debido a las simplificaciones que son incluidas en estos métodos, por lo general que los resultados arrojadados por estas simulaciones son de tipo cualitativo; sin embargo a nivel de investigación se encuentran aplicaciones importantes de estos métodos en campos de la biología como la simulación de membranas, incluyendo su formación y transporte (Frenkel and Smit, 2001).

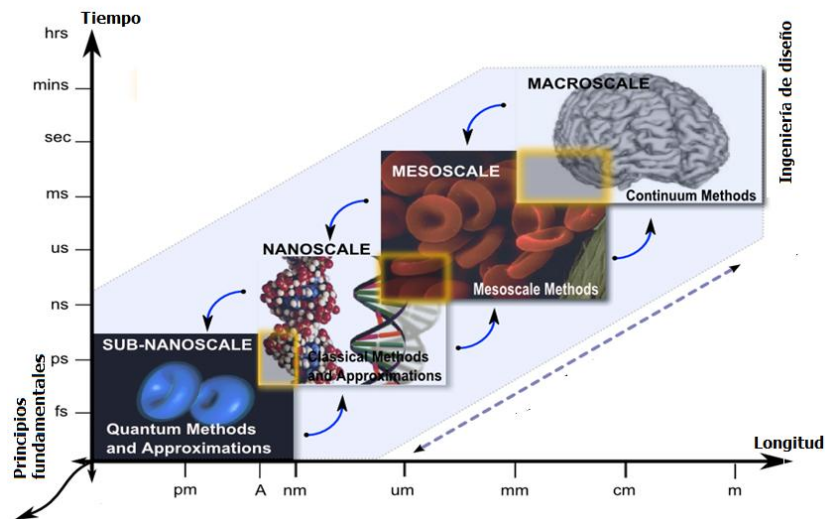


FIGURA 7. MÉTODOS DE SIMULACIÓN COMPUTACIONAL DISPONIBLES, DE ACUERDO A ESCALA DE TIEMPO Y LONGITUD DE LOS FENÓMENOS QUE PUEDEN PRODUCIRSE (BARRAMILLO BOTERO, 2010)

Es resaltable la gran importancia que tiene la información que puede ser comunicada entre las diferentes escalas y que permite un refinamiento más riguroso de los modelos trabajados. Desde esta forma de encontrar métodos de ampliación de escala (upscaling) o reducción de escala (downscaling), los cuales buscan una adecuada interpretación y ajuste de los parámetros manejados en cada nivel de simulación para que tengan validez a otros niveles.

1.2.3 DINÁMICA MOLECULAR

La minimización de energía genera configuraciones de mínima energía individual de un sistema. En algunos casos la información que se obtiene puede ser suficiente para predecir con precisión algunas propiedades del mismo. Si se tienen todas las configuraciones de mínima energía de superficie, se puede usar la mecánica estadística para derivar una función de partición de la cual se pueda calcular propiedades termodinámicas. Esto solo es posible para pequeñas moléculas en fase gaseosa. Si se quiere estudiar sistemas líquidos, sólidos, o fenómenos como la adsorción, se encuentra que estos mínimos son muy cercanos. En estos sistemas las mediciones experimentales son realizadas en condiciones macroscópicas que tienen una gran cantidad de configuraciones con una alta proporción de mínimos de superficie, por lo que una completa cuantificación se hace difícil, o en algunos casos imposible. Los métodos de simulación computacional permiten el estudio de tales sistemas, además de predecir propiedades a través del uso de técnicas que consideran pequeñas replicas del sistema macroscópico con un número manejable de átomos o moléculas (Béjar, 2001).

La dinámica molecular predice el comportamiento real del sistema, calculando el promedio de las propiedades, mediante la estimación de las trayectorias de los átomos siguiendo las ecuaciones de movimiento de Newton (Ecuación 8, Figura 8). La Dinámica Molecular es un método determinístico, según esto el estado de un sistema en un tiempo futuro se puede predecir según su estado actual. Para una descripción más real del sistema se requiere que la integración de la ecuación de movimiento, se realice en series de pasos de tiempo de del orden de 10^{-15} a 10^{-14} segundos. En cada paso de tiempo, las fuerzas en los átomos son calculadas, y combinadas con la posición y velocidad actual generando la nueva posición y velocidad en el instante de tiempo siguiente, considerando durante este periodo que la fuerza ejercida sobre cada átomo es constante. De esta forma se genera la trayectoria que a su vez define las propiedades dinámicas cambian con el tiempo (Béjar, 2001).

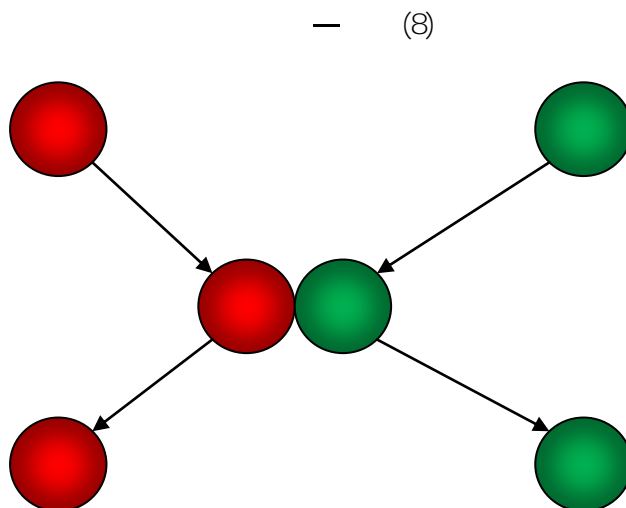


FIGURA 8 ESQUEMA EMPLEADO EN DINÁMICA MOLECULAR DONDE A PARTIR DE LAS ECUACIONES DE MOVIMIENTO DE NEWTON ES FACTIBLE DETERMINAR LA POSICIÓN FUTURA DE UN ÁTOMO.

Los promedios termodinámicos obtenidos de la dinámica molecular como promedios temporales usando la integración numérica:

— (9)

Donde M es número de pasos de tiempo, y^N y p^N representan el momento y la posición de las partículas para un tiempo $t = t_0 + N \Delta t$ (Bech, 2001)

Se encuentra que el desarrollo de métodos computacionales a nivel atómico como la dinámica molecular es una herramienta que permite abordar el análisis de fenómenos a gran escala de átomos, y especular acerca de las ventajas en procesamiento que tienen los computadores. Sin embargo, las simulaciones sobre prolongados períodos de tiempo (superiores a nano segundos) no se pueden llevar a cabo con los métodos computacionales que consideran átomos individualmente debido a limitaciones físicas en los supercomputadores (velocidad del procesador), llevando esto al desarrollo de modelos que permiten sobrellevar esta limitación mediante la adición de simplificaciones o empleando restricciones (Martyland, 1999) que, como ya se mencionó anteriormente, corresponden a escalas a

1.2.4 TÉCNICAS DE MODELAMIENTO A MESA ESCALA O COARSE GRAINED

Los modelos *coarse-grained* (grano grueso) son simplificados porque reemplazan los átomos individuales mediante una *bead* que representa a las propiedades de grupo. En la Figura 9 se presenta un ejemplo exitoso de *coarse-grain* para la dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), el cual es un componente típico de cierto tipo de membrana. En esta formación no es posible de modelar a escala atómica, mientras que empleando métodos a mesa se ha podido emular acertadamente (Nielsen et al., 2004) general con relación al procedimiento *coarse-graining* el grupo de átomos que se asociará a una *bead* puede ser definido de varias formas y por lo general se emplea de uno a seis *beads* por aminoácido. En lugar de usar todos los átomos en el modelo que emplea una *bead* se reflejan las propiedades promedio del aminoácido completo y ubica a la esfera en el centro de masa del resto de este caso pocos parámetros son reflejados tales como la geometría y las propiedades del aminoácido. Este modelo carece de ese detalle molecular necesario para tener en cuenta la contribución de las interacciones específicas a la *packing* por tanto no brinda suficiente detalle para explicar las diferencias estructurales o de mecanismos que conllevan a la formación (Wang y Roberts, 2010).

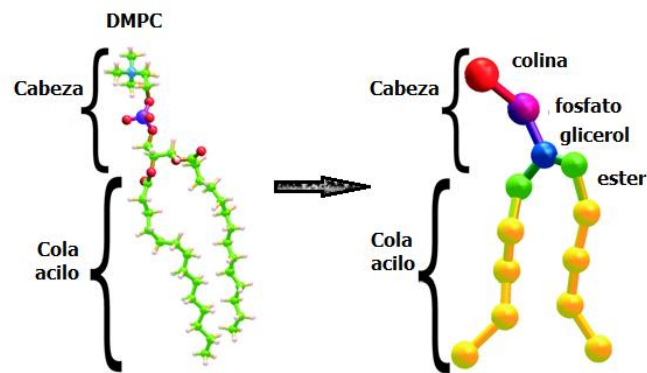


FIGURA 9. MODELO ATOMÍSTICO DE 13 SITIOS PARA LA DIMIRISTOILFOSFATIDILCOLINA (DMPC) NIENSEN ET AL., 2004

El modelo de *beads* incrementa la precisión de la predicción ya que emula la *backbone* de igual forma la adición de un *bead* más mejora la precisión del modelo *by* la *more* flexibilidad al residuo que se simula. El refinamiento de los *sup* *parámetros* *z* *beads* parece ser un reto importante, *está* *empezando* a ser tratado hoy día. Sin embargo, aún falta mayor trabajo en torno a sistemas específicos *ejemplo*, *o* unos pocos estudios computacionales han sido publicados con respecto a la agregación *de* *pro* *obstata* mayor deficiencia de esas aproximaciones es la incapacidad de reproducir la torsión de la *Swain* *and* *Roberts*, 2010

Acerca de las simplificaciones que introducen los *de* *métodos* *grain* se encuentra que la concepción que se tiene en dinámica molecular de esferas rígidas interactuando mediante un potencial energético o campo de fuerza definido, es remplazada por la implementación *de* *esferas* suaves (*que* *así* *son* otro tipo de interacciones *Figura* *10* se presenta el esquema de ajuste de parámetros para los métodos *de* *grain* *partir* de las interacciones *atomística*; el ajuste se basa entonces en la adecuada identificación de los *de* *parámetros* que permiten representación de las propiedades interacciones que se tienen cuando son considerados los átomos independientes. La selección *de* *propiedades* que se desean ajustar desde la escala atómica dependen en gran parte de los fines prácticos de la simulación o del fenómeno que se desee estudiar puntalmente, es común encontrar por ejemplo el ajuste de los parámetros *de* *escala* se haga con *el* *fin* *de* *simular* la función radial de distribución (*rdf*).

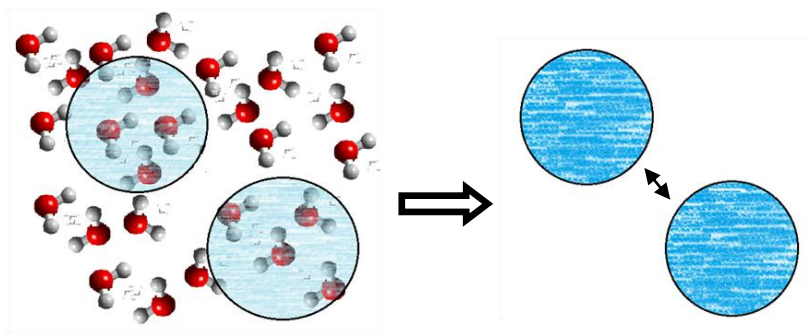


FIGURA 10 ESQUEMA DE AJUSTE DE LOS PARÁMETROS DE INTERACCIÓN A ESCALA MESOSCOPICA A PARTIR DE LA INFORMACIÓN QUE BRINDA LA ESCALA ATOMÍSTICA

DINÁMICA DE PARTÍCULAS DISIPATIVA (DPD)

Esta técnica que ya tiene más de 15 años de haber sido propuesta por Hoogerbrugge y Koelman (Hoogerbrugge and Koelman, 1992) el objetivo principal de simular adecuadamente la hidrodinámica de un fluido gracias a que el método conserva adecuadamente la cantidad de movimiento del sistema, empieza cada vez más a mostrar eficacia para modelos a meso escala, principalmente en lo que respecta a copolímeros (Yllo et al., 2009) biología de sistemas poliméricos mediante la implementación de esfuerzos cortantes (Kang et al., 1997; Chen et al., 2004; Sal and Brennan, 2007; Satoh and Majima, 2005) equilibrios de microfases hidrodinámica de sistemas poliméricos entre otros (Groot and Warren, 1997) lo que respecta a sistemas biológicos, también se encuentra una creciente aplicación (Goddard et al., 2001; Huang et al., 2009) principalmente en la simulación de membranas (Jeff and Sengupta, 2006; Groot and Rabone, 2006; Grafmüller et al., 2009) y la dinámica de formación de micelas útiles en ciencias biomédicas (Caso et al., 2010; Chen et al., 2010).

Las bondades de la técnica han sido identificadas en la simulación de sistemas biológicos, y es así como en los últimos años ha sido aplicada para el estudio de fusión de membranas (Grafmüller et al., 2009) presentando un modelo para la estimación de las energías libres de Gibbs en función de la curvatura superficial de las membranas a lo largo del proceso de fusión; (Quirós et al., 2009) muestran el comportamiento de membranas con superficies destacándose los cambios conformacionales energéticos que ocurren cuando una macromolécula con ciertas restricciones entra en contacto adhesivo con otra.

De manera general esta técnica se implementa como dinámica molecular, en el sentido que en la ecuación de movimiento de Newton tiene la ventaja respecto a técnicas a meso escala de ser una dinámica browniana que conserva la cantidad de movimiento (Freund and Smit, 2009) gracias a que incorpora dos términos adicionales para la cuantificación de la fuerza. De esta forma la fuerza se debe principalmente a tres contribuciones: una cohesiva (a) derivada de la dinámica molecular, una disipativa (D) y una aleatoria (R), como se esquematiza en la Figura 11, de tal forma que la expresión para la fuerza que siente una partícula i puede escribirse de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$(10)$$

Donde r_{ij} indica que los diferentes componentes de la fuerza son función de la distancia a la cual encuentren $beads$ de tipo i y j .

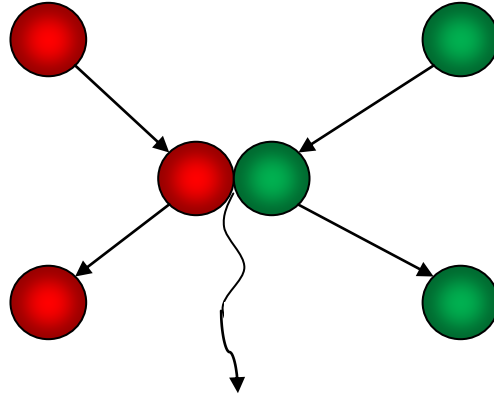


FIGURA 11. ESQUEMA EMPLEADO EN DINÁMICA DE PARTÍCULA DISTANTE DONDE A PARTIR DE LAS ECUACIONES DE MOMENTO DE NEWTON ES FACIL DETERMINAR LA POSICIÓN FUTURA DE LA BEAD LA ESTIMACIÓN DE FUERZA TOTAL Y LA FUERZA DISIPADA EL MEDIO COMPONENTE ASOCIADA ALEATORIEADA DEBES.

Como se indico previamente el componente conservativo de la fuerza es equivalente al implementado en dinámica molecular, sin embargo mientras que en métodos atomísticos los potenciales empleados asumen por lo general interacciones atractivas y repulsivas (como el potencial de Lennard-Jones), para esta técnica a meso escala el potencial energético que se emplea es de la forma potencial suave (soft potential) por lo cual asume que las interacciones $beads$ son de eminentemente repulsivas y se pueden representar de acuerdo a una ecuación de la forma:

$$(11)$$

Donde λ se conoce como el parámetro de repulsión $bead$ de tipo i y j , r_{ij} es la distancia entre los $beads$ r_c es el radio de corte e indica la longitud efectiva a la cual se debe encontrar dos $beads$ para sentir algún tipo de interacción. En la figura 12 se ilustran las principales diferencias entre los potenciales manejados por técnicas DPD, adicionalmente se hace evidente que para DPD no se maneja el modelo de esfera rígida para sino que cada $bead$ se comporta como una esfera suave que permite cierto grado de solapamiento; eventualmente si la distancia entre $beads$ es menor a r_c la energía de repulsión (y en consecuencia la fuerza) que se sentirá respecto a otro tendrá un valor

finito y corresponde a el valor del parámetro de repulsión. La evidencia que a pesar de que solo se presente repulsión entre las magnitud permite emular afinidad entre dos tipos de está es baja, o incompatibilidad si el valor es alto.

El desarrollo y modelo matemático de cada uno de los componentes de la fuerza se explica ampliamente por Groot y Warren (Groot and Warren, 1997) y otros (Español and Warren, 1995) haciendo consideraciones adicionales acerca de los criterios para la selección de los parámetros de la simulación como los intervalos en los cuales se usan típicamente. En el siguiente capítulo se expondrá con más detalle la metodología de DPD.

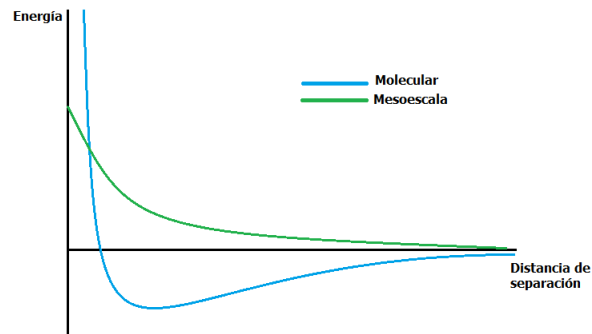


FIGURA 12 DIFERENCIAS ENTRE LOS POTENCIALES ENERGÉTICOS EMPLEADOS PARA EL MÉTODO DE SIMULACIÓN A MESOESCALA DPD Y MOLECULAR.

El estudio de mucoadhesión mediante la Dinámica de partícula disipativa (DPD), gracias a las características intrínsecas del modelo y al éxito que ha demostrado para la simulación de otros sistemas a meso escala como equilibrios de micelas de copolímeros de bloques (Zhang et al., 2006) (Chen et al., 2007) (Gus'kova et al., 2007) (Groot and Warren, 1997), exponiendo de manera general las técnicas de *coarse graining* escalado para polímeros. Para DPD la estimación de los parámetros de repulsión del método puede generarse a partir de la teoría de Flory-Huggins según la relación:

$$(12)$$

Respecto a las bases conceptuales de la técnica a partir ensayos realizados indica los valores de los parámetros de DPD, sobre los cuales el método presenta estabilidad (Groot and Warren, 1997) en embargo Rudolf, M.F., et al. (Rudolf et al., 2000) ponen sobre la mesa la necesidad de un adecuado entendimiento del significado físico de cada parámetro y la relación entre los mismos, y explicar

consecuencias de un *erosion* *grainy* escalado. Adicionalmente abre la posibilidad de ampliar las escalas de tiempo *and* de las simulaciones bajo un adecuado marco teórico.

1.2.5 SIMULACIÓN MOLECULAR DEL FENÓMENO DE MUCOADHESIÓN

La simulación molecular del fenómeno de mucoadhesión debe asociarse inicialmente a la simulación de la glicoproteína mucina que compone el mucus. Con este enfoque solamente se ha reportado una investigación que buscaba simular una pequeña región de plegamiento dinámica molecular discreta (Urbanc et al., 2009) con el fin de estudiar el efecto del pH en el plegamiento de ciertos dominios de la molécula, encontrándose una acertada simulación del comportamiento experimental observado, ya que los dominios simulados tendían a formar puentes de salinos a pH neutro, mientras que estos desaparecían al disminuir el pH, induciendo la extensión de los residuos simulados, y exponiendo zonas hidrofóbicas de los mismos.

Acerca de las técnicas de simulación que son ampliamente utilizadas se destacan dos aspectos importantes: el primero es el hecho de que debido al gran tamaño de la mucina de 500 (Barakat et al., 1995) (longitud entre 200 - 800 nm), y que los fenómenos de adhesión están del orden de los microsegundos, los métodos de simulación equivalentes a la escala atómica, son técnicamente inviables puesto que se requerirían una inmensa cantidad de recursos computacionales (tiempo y equipos). El segundo aspecto es que en los métodos existentes a meso escala aún no se presentan investigaciones en torno a esta glicoproteína y su fenómeno específico de adsorción en superficies poliméricas (hasta el alcance de la presente revisión bibliográfica).

En el último año, varios investigadores han abordado DPD como un modelo útil para el diseño inteligente de dispositivos de liberación controlada de fármacos basados principalmente en el modelamiento de nanopartículas (micelas ensambladas) para el transporte de sustancias activas, los estudios incluyen la dinámica de formación de micelas, cinética de adsorción de nanopartículas a modelos de pared celular (Djurić and Dormidontova, 2009) identificación de estados estables de adsorción de las nanopartículas incorporando Monte Carlo (Wang and Dormidontova, 2010) estos estudios sin embargo el diseño de dispositivos se centra en la simulación de dispositivos y no consideran un modelamiento riguroso de las biomoléculas, como podría ser la mucina. Por otra parte debido a que DPD es un modelo a meso escala, no es fácil de simular factores reales de los sistemas

pH (el cual influencia el fenómeno de mucoadhesión de la mucina); sin embargo un reciente trabajo (Guo et al., 2010) expone una manera relativamente sencilla de emular la HLB mediante el ajuste adecuado de los parámetros de repulsión, conociendo el comportamiento específico de la molécula en medios ácidos o básicos. Adicionalmente, obtienen esta información desde la Dinámica Molecular, mediante el cálculo de los parámetros de solubilidad, relacionándolos con el factor de Flory (χ), de la forma:

$$— \quad (13)$$

En general se encuentra que DPD posee ventajas en la simulación de sistemas a meso escala que ampliamente probadas, sin embargo se hace evidente la importancia del ajuste e interpretación de los parámetros adecuados, si se desea modelar el fenómeno de mucoadhesión entre mucinas y proteínas. Adicionalmente, vale la pena resaltar el hecho que el uso de proteínas es prometedor pero aún no ha sido abordado ampliamente en la literatura consultada, por tanto la simulación de glicoproteínas presenta como un importante paso hacia el estudio de sistemas complejos a un nivel de meso escala.

2. MODELAMIENTO MOLECULAR A MESA ESCALA DE MUCINAS

La implementación de técnicas computacionales para la simulación de sistemas biológicos complejos presenta como una herramienta importante para teorizar cierto tipo de interacciones que aún no han sido del todo entendidas, o incluso no se han abordado debido a limitaciones experimentales inherentes a las escalas de tiempo y longitud en la que ocurren dichos fenómenos. En el caso del fenómeno complejo de mucoadhesión de biopolímeros en solución está principalmente asociada al correcto modelamiento de las mucinas (principal proteína constituyente del mucus junto con el agua) y del biopolímero.

Debido al tamaño y las características de las glicoproteínas mucinas, el uso de técnicas de modelamiento a nivel atómico hoy en día es inviable debido a limitaciones computacionales, por lo que se hace necesario la implementación de técnicas de tipo meso (de tamaño grueso) a meso escala que inducen simplificaciones mediante el agrupamiento de varios grupos de átomos en un solo punto (esfera), haciendo factible computacionalmente la simulación de sistemas macromoleculares. Una de las limitaciones de estas técnicas a meso escala es la necesidad de un correcto procedimiento de escalado y modelamiento de la forma que reproduzca eficientemente el grupo de átomos que se agruparon. Proteínas como la mucina carecen de modelos que sean previamente definidos para estas.

A continuación en el presente capítulo se presentará el estudio realizado para el modelamiento de la mucina en solución acuosa mediante el método computacional de simulación molecular a meso escala dinámica de partícula disipativa (DPD). Para esto en primer lugar se verificó el software con el que se implementará la técnica, y posteriormente el método DPD mediante la identificación de los parámetros adecuados para la construcción de un modelo de mucina estable, a partir de un diseño experimental propuesto.

2_

3_

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1 DINÁMICA DE PARTÍCULA DISIPATIVA (DPD)

Como se mencionó en el capítulo 1, DPD es una técnica de simulación en la cual los sistemas macromoleculares como polímeros pueden ser simulados mediante la interacción de los átomos individuales con los de DPD. Esta técnica está basada en la mecánica molecular en el sentido que está gobernada por las leyes de movimiento de Newton, donde la fuerza de interacción aditiva, tomando como la velocidad se define como:

$$\mathbf{v}_i = \mathbf{v}_i - \mathbf{v}_j \quad (14)$$

Cada uno de los beads de DPD se tendrá una masa, una posición, un momento, e interactuarán entre ellos en pares mediante fuerzas aditivas de tipo repulsivo. Estas fuerzas representan la sumatoria de un componente de tipo conservativo (C), uno disipativo (D) y uno asociado a las partículas que se encuentren dentro de cierto radio de corte:

$$\mathbf{F}_{ij} = \mathbf{F}_{ij}^C + \mathbf{F}_{ij}^D + \mathbf{F}_{ij}^R \quad (15)$$

Dado que r_c es la única escala de longitud en el sistema, este radio de corte es usado como la unidad de longitud, por tanto $r_c = 1$; de igual forma por simplicidad las masas de los beads se toman como 1, con lo cual se tiene de acuerdo con la ecuación 1, que la fuerza de interacción es igual a la aceleración (Groot and Warren, 1997).

El componente conservativo de la fuerza se define con relación a la derivada del potencial energético de *coarse grain* mediante la ecuación:

$$\mathbf{F}_{ij}^C = -\nabla_{\mathbf{r}_{ij}} \phi(r_{ij}) \quad (16)$$

Donde $\mathbf{r}_{ij} = \mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j$, es el vector de separación entre el bead i y j , y $r_{ij} = |\mathbf{r}_{ij}|$. Como se presentó en el capítulo anterior el potencial para DPD es del tipo potencial suave (soft potential), descrito mediante la ecuación:

$$- \dots - \quad (17)$$

Por tanto la fuerza conservativa tiene la forma:

$$(18)$$

Donde α_{ij} es la máxima repulsión entre una partícula i y una partícula j , este valor es también conocido como el parámetro de repulsión. Parte para las contribuciones disipativa y aleatoria de la fuerza se tiene que:

$$(19)$$

$$(20)$$

Donde μ_i son funciones de peso dependientes del r , cuya contribución se pierde $r > r_c = 1$; μ_i es un número aleatorio que sigue una distribución de Gauss independientemente para cada pareja de partículas interactuando. σ es la amplitud de ruido y el coeficiente de fricción respectivamente, Δt es tamaño de paso, el cual se maneja durante toda la investigación en 0,05.

Español y Warren (Español and Warren, 1995) demostraron que el sistema obedece el teorema de fluctuación-disipación y muestra una distribución de probabilidad canónica si se cumplen las siguientes relaciones:

$$(21)$$

$$(22)$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura, el cual se consideró como la unidad de energía y se tomó un valor adicionalmente para el coeficiente de fricción se manejó un valor de 4 (Groot and Warren, 1997). De igual forma, a partir de estas relaciones es evidente que vez es escogida una de las dos funciones de peso la otra se fija automáticamente; de acuerdo a una elección simple es tomar para la misma forma de la componente conservativa, con lo cual se tiene:

(23)

El método DPD descrito previamente fue implementado a lo largo de la investigación realizada y como parte de la metodología que se presentará en capítulos subsecuentes.

2.1.2 CALIBRACIÓN DEL SOFTWARE DE SIMULACIÓN

La implementación de la técnica DPD puede ser llevada a cabo a partir de una variedad de software disponible académica y comercialmente, además de poder ser programado en diferentes lenguajes de programación, sin embargo para la presente investigación la modificación del código implicaba un consumo de tiempo que no estaba programado en el cronograma. Por lo anterior fue seleccionado para llevar a cabo los diferentes ensayos de simulación LAMMPS (Large Atomic/Molecular Massively Parallel Simulator, edición marzo 2010) principalmente a que es un programa libre y de código abierto, con más de 10 años de trabajo asociado para su desarrollo que lo hacen robusto y buen desempeño general.

Debido a la característica libre del programa (constante actualización) se llevó a cabo un proceso de calibración realizando simulaciones de sistemas polímeros de dibloque en agua, previamente evaluados en otros programas de simulación de tipo de "Computational Biophysics y Soft Materials" de la Pennsylvania State University (PSU) los sistemas de calibración se tomaron en los esquemas en el cual se modela un sistema compuesto por polímeros de dibloque con una cabeza hidrofílica (ca) y una cola hidrofóbica (cb), el primer sistema solo contenía 100 cadenas mientras que el segundo contenía 1000.

La calibración del software incluyó pruebas de reproducibilidad en paralelo con 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 procesadores del Xeon 3160 Core 3.0 GHz disponibles en el cluster computacional "Lion-XC" y "Lion-XJ" de PSU. Adicionalmente se construyó una curva de desempeño de paralelización implementado se basa en la división de la caja de simulación en subdominios como un problema de menor tamaño (Figura 13), pero cada subdominio deberá tener información acerca de subdominios cercanos, con el fin de evitar el movimiento de partículas entre dominios. La cantidad de

información que recibe cada uno de los dominios acerca de sus alrededores fue fijada en consideración de la distancia efectiva a la cual se considera que una partícula puede verse afectada por la información que recibe de sus alrededores, lo cual para las diferentes simulaciones se tomó como un valor adecuado la longitud que tenga el dominio simulado, ya que al considerarse como una molécula es importante que el procesador de la simulación tenga conocimiento de donde se encuentra físicamente el otro extremo del dominio simulado puesto que toda la estructura se encuentra ligada por medio de enlaces entre los diferentes componentes.

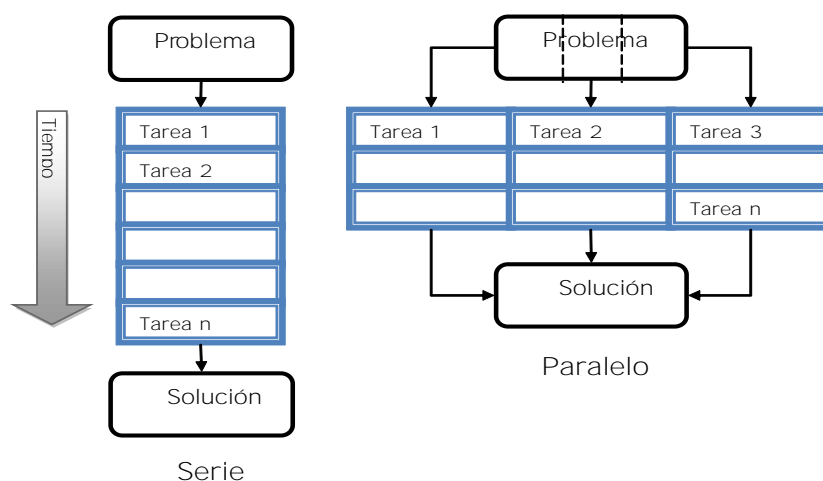


FIGURA13 ESQUEMA DE PARALIZACIÓN PARA DISMINUCIÓN EN TIEMPOS DE PROCESAMIENTO GRACIAS A LA DIVISIÓN DEL PROBLEMA EN SUBDOMINIOS DE MENOR CONSUMO COMPUTACIONAL

2.1.3 MODELAMIENTO DE MUCINA

A partir de la literatura consultada se identificaron las variables que gobiernan su interacción hidrofobicidad y grupos funcionales de la mucina a diferentes pH, así como para los polímeros; otras características importantes están asociadas a la concentración de especies, la característica de la mucina de formar agregados y geles mediados por puentes de azufre y su comportamiento viscoelástico (Basil and Turner, 2006; Basil et al., 1995; Tokansi et al., 2007; Pettersson and Dedinaite, 2008; Gac et al., 2009; Lundin et al., 2009; Thornton and Sheehan, 2004; Svensson et al., 2003; SOBL, 2005; Svensson and Arnebrant, 2001; Baskin, 1992; Ludwig, 2005). Empleando esta información se seleccionaron las propiedades de la mucina que se

asociaron con el modelo *bead* para que emulara el sistema real. La selección de las propiedades se limitó a las simplificaciones intrínsecas que posee la técnica de DPD, y a la demanda de recursos computacionales que se requerían para simular estas características. Con relación a los biopolímeros por el alcance de este proyecto sólo se emuló una estructura hidrofóbica, por consideraciones de tiempo.

Una vez consideradas las características de la *simulación* y del polímero referente a su carácter hidrofóbico y capacidad de la mucina para formar agregados mediados por grupos de cisteína, se plantearon los modelos que ajustaron y simularon el comportamiento de la glicoproteína que se siguió para el planteamiento del modelo y la simulación fue el empleado (Cottin-Cordard, 2001), en primera instancia se identificaron los componentes estructurales de las mucinas y del polímero. A continuación se propusieron 3 diferentes conformaciones tridimensionales de la mucina a partir de las características de forma encontradas en la literatura, estos modelos se probaron y evaluaron lo largo del proyecto como parte de su refinamiento. Respecto al polímero se simuló una superficie para esto se implementó una configuración tridimensional de $10 \times 10 \times 10$ *beads* con una configuración *beads* adyacentes conectados y adicionalmente atados mediante un resorte armónico a una distancia de $0.25r$ en el eje Z con relación a la distancia de r que todos los sistemas simulados se encuentran en medio acuoso, fueron incluidos en *beads* agua a partir de los cuales se definió el tamaño de *beads* de acuerdo con (Groot and Warren, 1997) asumiendo que cada *bead* de agua contiene 3 moléculas de agua (Figura 14). Para la construcción de las conformaciones se desarrolló una aplicación basada en el lenguaje de programación orientado por objetos JAVA, esta aplicación adicionalmente permitió la construcción del archivo con los parámetros de entrada para el simulador.

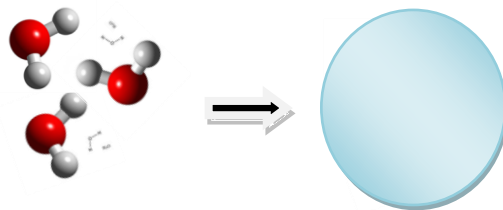


FIGURA 14 MODELO DE BEAD DE AGUA EMPLEADO A LO LARGO DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN, APLICANDO UN TAMAÑO DE $3 \times 3 \times 3$ MOLÉCULAS DE AGUA POR BEAD DEBIDO A QUE EL TAMAÑO DE TODOS LOS BEADS EN LA SIMULACIÓN ES EL MISMO, ESTE CRITERIO FIJA EL TAMAÑO DE BEAD PARA LOS MODELOS DE MUCINA

Para mantener la forma del modelo construido se emplearon potenciales (tipos harmónicos) para simular enlaces entre partículas adyacentes en las direcciones X, Y y Z, además de potenciales harmónicos para restricciones de ángulos adyacentes, fijando un ángulo de equilibrio entre las partículas de 180 grados como se ilustra en la ecuación siguiente:

$$U_{bond} = \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 \quad (24)$$

$$U_{angle} = \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 \quad (25)$$

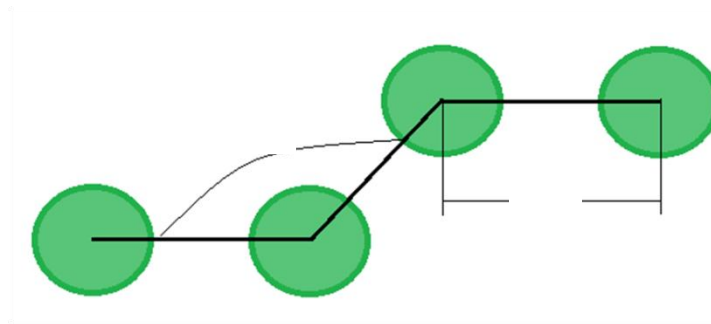


FIGURA 15. ESQUEMA DE LOS HARMÓNICOS DE ENLACE Y FLEXIÓN QUE SE IMPLEMENTARON PARA LA MANTENER LA FORMA DE LOS MODELOS CONSTRUIDOS

Las ecuaciones anteriores representan la forma en la que fueron estimadas las contribuciones por enlace y por flexión, las constantes k_b y k_a representan las constantes de enlace y flexión (o rigidez) respectivamente; adicionalmente a partir de estas ecuaciones, las contribuciones de fuerza por flexión tienen la forma:

$$F_{flexion} = -k_a (\theta - \theta_0) \quad (26)$$

$$F_{flexion} = -k_a (\theta - \theta_0) \quad (27)$$

Por tanto la fuerza que siente una partícula que pertenezca a un modelo de proteína (o superficie) se estimó mediante la ecuación:

$$F_{total} = F_C + F_D + F_R + F_S + F_b \quad (28)$$

Donde la fuerza tiene las 5 componentes, conservativo (C), disipativo (D), aleatorio (R), de superficie (S), y de flexión (b),

Posteriormente se seleccionaron los parámetros básicos de la técnica de Dinámica de Partícula que permitieran simular las interacciones de los modelos de mucina y superficie en medio

acuoso, con base en la bibliografía y el trabajo previo en el tema. Además los parámetros de la técnica de simulación de DPD de inicialmente se hizo un barrido a partir del intervalo de 5 a 75 de manera similar a lo planteado por Djohari y Dormidontova (Djohari and Dormidontova, 2009) para poder verificar que los seguros de trabajo de la técnica no distorsionaran el perfil de temperatura de la simulación predictiva de los comportamientos básicos de la mucina, como agregación.

A partir del ajuste realizado por Groot y Warren (Groot and Warren, 1997) entre modelos de DPD y Flory-Huggins encontraron que para los parámetros de beads del mismo tipo se cumple:

$$(29)$$

Donde $\rho = nBeads^3$ es la densidad de beads. De acuerdo con Groot para reproducir adecuadamente la compresibilidad del agua a temperatura ambiente se debe cumplir la relación anterior, para la cual adicionalmente se encuentra como límite práctico computacional y termodinámico un valor para la densidad de 3. A partir de lo anterior se obtiene que este valor fue fijo y se mantuvo en todas las simulaciones.

2.1.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Por otra parte en el área de la simulación computacional la disponibilidad de recursos puede no llegar a ser tan crítica ya que en teoría es factible la realización de un gran número de experimentos a un costo bajo asociado por la utilización de herramientas computacionales; sin embargo esta aparente disponibilidad de recursos se puede volver ineficiente cuando se desean evaluar un gran cantidad de parámetros para la implementación de una técnica y posterior ajuste de un modelo que se puede caer en la dinámica de evaluación de variables por ensayo y error, lo que no deja de ser ineficiente incluso para ensayos.

Para la presente investigación se propuso la elaboración de un diseño experimental previo a la ejecución de las simulaciones, con lo cual se logró reducir el tiempo de análisis al encontrarse con resultados satisfactorios. Para la construcción del diseño experimental se empleó el software StatGraphics Centurion XV, empleando un diseño de compuesto factorial 2³ con diferencias

estudiados. A partir de los experimentos del método DPD para ser implementado en general de una simulación molecular se identificaron como variables experimentales para la construcción del modelo las presentadas en la Tabla 2 y se discuten a continuación

Variables experimentales

Como ya se mencionó anteriormente algunos de los parámetros de método DPD como la temperatura, el radio de corte, y los parámetros de energía fijados desde el arranque del proyecto con base en los resultados presentados por Groot y Marrink (1997) en el mismo modo que el nivel de densidad de beads como se previó en este capítulo. Las demás variables que se consideraron experimentales fueron:

a) Tamaño de caja:

Su unidad base se fija equivalente al radio de corte, ya que esta es la unidad de longitud DPD. Esta variable determina que tan grande es la simulación de fines entre los cuales los modelos de mucina no se desplazan e interactúan. Tamaños de caja pequeños (1 *lado*) tienen bajo costo computacional, pero limitan el tamaño y la cantidad de mucinas que puede contener la caja, ya que al ser sistemas con condiciones de frontera periódica, el tamaño de la caja puede inducir sesgos de comportamiento. Los sistemas más grandes (caja de 100 *de lado*) permiten la simulación de sistemas de mucina más grandes y estructuras más elongadas sin embargo el costo computacional se incrementa a la tercera potencia aproximadamente. Tamaños por encima de 100 permitirían la simulación de sistemas del orden de micrómetros (300). Sin embargo la demanda computacional es significativamente la disponibilidad de recursos del proyecto. Para esta variable se busca identificar los valores que permitan el estudio de los sistemas de mucina sin introducir ningún tipo de sesgo, pero con la menor demanda computacional

b) Parámetros de repulsión

Esta variable asociada a la estimación de la fuerza conservativa del modelo, su mayor contribución en los valores energéticos del sistema y está asociada por ende a las conformaciones que pueden alcanzar los modelos de mucina y superficie. Esta variable fue objeto de e

principalmente las etapas de producción, donde se estudio el fenómeno de agregación y adsorción en superficies (capítulos 3 y 4 respectivamente)

c) Constante de enlace y longitud de enlace de equilibrio

Estas variables están asociadas con la inclusión de los términos de enlace mediante la ecuación 24. Contribuyen en la estimación de la energía total del sistema ya que son el parte del componente de fuerzas intramoleculares que se encuentren interconectados para formar una estructura mucina o una superficie con la energía de flexión. Si las contribuciones de enlace son significativamente más altas que las de flexión o incluso las de interacción de pares, el sistema alcanzará su energía de equilibrio forzando a los *beads* que se encuentren conectados a permanecer a una distancia equivalente a la longitud de enlace, solapando las demás contribuciones energéticas.

d) Constante de flexión o rigidez y magnitud del ángulo de equilibrio

Estas variables tienen una influencia equivalente a las relacionadas con el enlace, en cuanto a estructura (ecuación 25), y que contribuyen a la estabilidad estructural de las moléculas. La magnitud del ángulo de equilibrio se fijó para todas las simulaciones en 180 para favorecer estructuras elongadas en todos los casos.

e) Longitud del modelo de mucina largo/diámetro.

Estas variables buscan asociar la relación de tamaño que existe en una mucina real con el modelo computacional; adicionalmente tamaños de grandes de mucina influyen el tamaño que debe tener la caja de simulación (ya que debe poder contenerla). Teniendo en cuenta el nivel de *grain* manejado para el presente trabajo la longitud de la molécula permitió un mapeo preliminar por tamaño con un tipo de mucina, fijando la relación largo/diámetro para la mucina en veinte se calculó el largo correspondiente para las producciones.

f) Concentración de mucinas

Esta variable afecta el comportamiento o interacción que ocurre entre modelos de mucina o mucina y superficie, ya que está asociado con la disponibilidad que hay en el sistema.

para que las especies se encuentren con otras. Esta variable fue objeto de estudio en los capítulos 3 y 4, para el análisis de la agregación de mucinas y adsorción sobre superficies.

Por otra parte para la selección de las variables de respuesta (Tabla 3), se tuvieron en cuenta dos aspectos, *Estabilidad energética* y *Estabilidad Estructural*. El primer aspecto es muy importante en simulación molecular ya que da un indicio sobre la estabilidad de la simulación; por lo cual se llevó a cabo el seguimiento de la temperatura y de la energía total del sistema (así como de los momentos) durante todas las corridas. Entre tanto, para el segundo aspecto se consideró el radio de giro, el centro de presión, un parámetro de orientación y uno cualitativo de forma, en el cual se tomó una ponderación de uno a diez, siendo diez el puntaje para la estructura que no presentaba deformación.

Se encuentra entonces que el número de variables experimentales y de respuesta a evaluar daría como resultado un número de experimentos significativamente alto, para que el modelo estadístico tenga en cuenta las posibles interacciones que pueden existir entre los diferentes parámetros, por tal razón se agruparon las variables experimentales según la influencia que tenían sobre la simulación y de los resultados previos encontrados en Pennsylvania State University se establecieron los límites entre los cuales fueron evaluadas las variables experimentales fueron entonces separadas en dos grupos: Determinantes del tamaño de la simulación y Determinantes de la estructura de las moléculas; en el primero grupo se ubicaron el tamaño de caja, y el largo de la mucina, mientras que en el segundo grupo se ubicaron las variables relacionadas con las interacciones intramoleculares (enlace y flexión).

TABLA 2. VARIABLES EXPERIMENTALES PARA LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

	Variables experimentales [intervalo]
1	Tamaño de caja (L) [50 r_d]
2	Parámetros de repulsión (σ) [NA]
3	Constante de enlace (K) [80]
4	Constante de flexión rigidez (k) [1-30]
5	Longitud de enlace de equilibrio (b) [0.25-1.25]
6	U [180]
7	Longitud del modelo de mucina (L_M) [60]

8	Relación largo/diámetro del modelo de muc (LM/DM) $\times 20$
9	Densidad de Bead ρ_b (beads/rc ³) [3]
10	Coarse grain (# molec ρ /bead) [3]
11	Concentración de mucina ρ (Mucina/caja) $\times A$

TABLA3. VARIABLES DE RESPUESTA PROPUESTAS PARA CONSTRUCCIÓN DEL MODELO

	Variables de respuesta
1	Energía de flexión (e_f)
2	Energía de enlace (e_b)
3	Energía de interacción pares (e_{PD})
4	Radio de giro (r_{og})
5	Presión (P)
6	Centro de masa (com)
7	Temperatura
8	Parámetro de Forma orientación (P_{for})

2.2 RESULTADOS

2.2.1 CALIBRACIÓN Y AJUSTE DEL SOFTWARE DE SIMULACIÓN LAMMPS

La implementación de la técnica DBD que se usó en el desarrollo de proyecto, involucró la calibración del programa de simulación LAMMPS para lo cual se llevó a cabo una primera aproximación al software estudiando su documentación y compilando la versión de marzo de 2010 para el sistema operativo Linux, posteriormente se tomó como estudio de formación de micelas, para modelos simplificados de cabeza hidrofóbica (azul) cola hidrofílica (verde) como se muestra en la Figura 16. Este modelo corresponde a ningún polímero en particular y se escogió principalmente basado en la disponibilidad de resultados previos de simulaciones de otros grupos de investigación para estos esquemas.



FIGURA16. MODELO DE COPOLÍMERO DE DIBLOQUE EMPLEADO EN LOS SISTEMAS PARA LA CALIBRACIÓN DEL SOFTWARE

Una vez llevadas a cabo las simulaciones para el primer sistema de polímeros se encontró la asociación de las cadenas en estructuras similares (Figura 17), no la cual era consecuente con los resultados previos existentes en el grupo de investigación "Computational science y soft materials" de la *Pennsylvania State University*. Por otra parte, al realizar las simulaciones sistema de mayor concentración (1000 cadenas se lejan) a resultados bastante diferentes a lo esperado, mostrando un colapso en las estructuras y no una configuración estable. Cabe mencionar que durante las simulaciones desarrolladas también fueron estudiados otros parámetros que se consideraban afectar el comportamiento, como la etapa de minimización, velocidad de actualización de átomos etc.

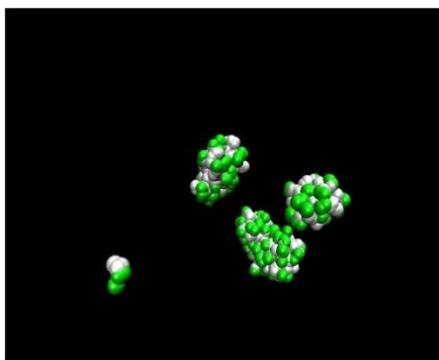


FIGURA17. FORMACIÓN DE MICELAS ENCONTRADA PARA SISTEMAS DE COPOLÍMERO DE DIBLOQUE (2-6) EN CAJAS DE 20x20x20 DESPUES DE 200 MILLONES.

Dentro de las acciones llevadas a cabo para encontrar el origen de las diferencias encontradas, se realizaron modificaciones en los parámetros de información de entrada general del programa, sin llegar a una conclusión satisfactoria; por tanto se llevaron a cabo una serie de acciones, en primer lugar para la validación del software fue necesario realizar una revisión línea a línea del código, (al menos en lo que respecta a la implementación de "Dinámica de Partícula Disipativa, DPD), a partir de lo cual se encontraron importantes diferencias con relación a la forma como es implementado tradicionalmente est

Se evidenció que por defecto el programa no tiene en cuenta 2,13 y 4,0 entre pares de "beads" interconectados pertenecientes a una molécula; lo cual estaba originando el colapso de estructuras y entrapamiento de las cadenas al desbalance en las fuerzas inter e intramoleculares. Una vez se modifica este valor por defecto, se obtienen las estructuras y separaciones de fases desde el punto de vista teórico, y de las simulaciones previas obtenidas con el programa presentando una marcada diferencia en el orden de magnitud los valores de las energías de interacción entre pares "beads", lo cual se relacionaba con la segunda diferencia encontrada, y que se mencionará en la continuación.

La diferencia en el cálculo en el orden de magnitud de la energía, pero no en la separación de fases encontrada, enfocó la depuración del código, hacia la manera como se llevaba a cabo el cálculo energético y se halló, que en el programa se estaba utilizando para la energía diferente a la reportada en la literatura (Groot and Warren, 1997) embargo la definición original de DPD, se aborda desde la hipótesis de *soft potentials* (potencial suave) asociadas a repulsiones suaves. A partir de lo anterior, se realizó la modificación del código, sustituyendo por una expresión como la presentada en la ecuación

— — (30) después se recompiló el programa, permitiendo así obtener valores de energía equivalentes a los resultados existentes en el grupo de investigación.

$$— — (30)$$

Donde:

es el componente conservativo de la energía interpartícula, r_c es el radio de corte, r_{ij} es la distancia efectiva entre 2 partículas.

Una vez se contó con resultados reproducibles se realizaron a cabo simulaciones para la obtención de sistemas lamelares cilíndricos para *block copolymers* en agua, arrojando resultados satisfactorios, ya que se logró simular el reordenamiento. Vale la pena mencionar este punto a presentarse una diferencia relacionada con la dinámica de la formación de estas estructuras, ya que el número de iteraciones necesarios para llegar al sistema equilibrado se ve afectado por factores de tipo computacional, como el número de procesadores que se usen, reordenamientos de matrices o selección de la semilla para el

⁴la cual al derivarse arrojaba efectivamente la función de fuerza de DPD tradicional.

generador de números aleatorios. El hecho anterior se explica por la existencia de un componente estocástico en el cálculo de las fuerzas, por ende se hizo evidente la necesidad de llevar a cabo una simulación para los sistemas modelados, y estudiar el posible efecto de este componente estocástico en las trayectorias promedio.

Por otra parte una vez fijados de manera inicial los parámetros estructurales del modelo, se procedió a la implementación del programa LAMMPS en paralelo, para lo cual fue necesario recompilar la versión existente en el cluster NEXJ ya que era necesario actualizarla con la modificación en la ecuación de energía corregida previamente en el proyecto.

Una vez actualizada la versión del programa fueron llevadas a cabo simulaciones con un tiempo total de 24 horas, empleando 1, 2, 4, 8, 16 y 32 procesadores en paralelo. A partir de lo cual se logró obtener el diagrama de eficiencia (Figura 18) para una caja de simulación de tamaño 20 x 20 x 20, a partir de lo cual se encuentra que el número de pasos que son alcanzados al incrementar el número de procesadores es mayor; sin embargo la diferencia porcentual existente entre usar 16 y 32 procesadores muestra que el incremento en el uso de procesadores en este punto, no es justificable pues el incremento neto en el número de pasos utilizados es

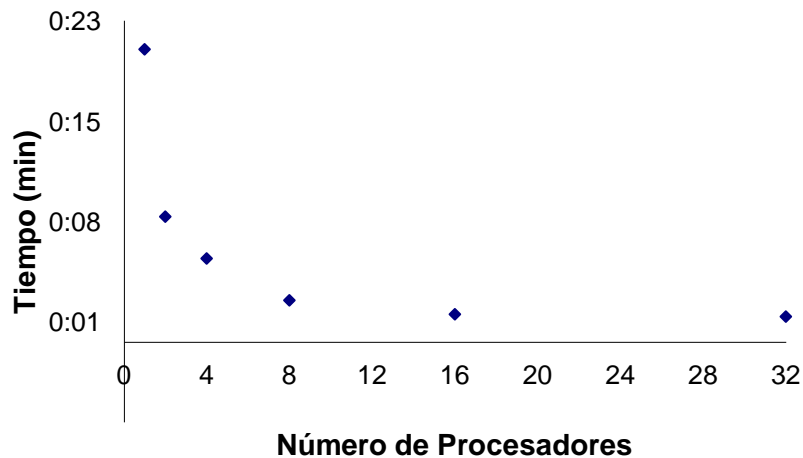


FIGURA 18 DIAGRAMA DE EFICIENCIA PARA EL MÉTODO DPD, EMPLEANDO SOFTWARE DE SIMULACIÓN LAMMPS. EL GRÁFICO INDICA EL TIEMPO NECESARIO PARA SIMULAR MIL PASOS EN UN SISTEMA DE 20X20X20 UNIDADES A UNA DENSIDAD DE

2.2.2 MODELAMIENTO DE ENLACES DE MUCINAS

Una vez obtenidos los resultados con polímeros se plantearon 3 diferentes modelos estructurales de mucina para ser evaluados, el primer modelo inicial de mucina propuesto fue un paralelepípedo elongado (4x4x12 unidades), ya que es una estructura simple para su construcción, para simular y analizar de manera inicial la forma en que se agregan y más de continuar con la puesta a punto del software LAMMPS, o encontrar diferencias sistemáticas, hubieran sido evidentes en la etapa de calibración. Los otros modelos propuestos se basan en la estructura tipo gusano que se da para la mucina (Bansil and Turner, 2006)

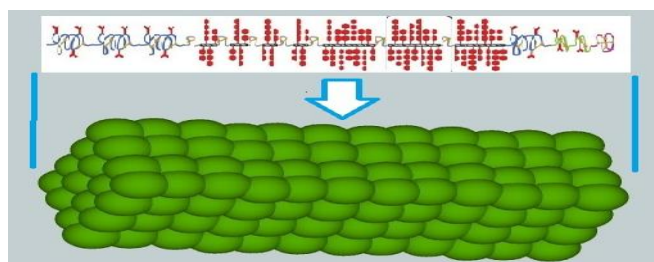


FIGURA 19. MODELO DE MUCINA PARALELEPIEDO

MODELO MUCINA PARALELEPIEDO

IDENTIFICACIÓN DE PARÁMETROS ESTRUCTURALES Y DISEÑO DE SIMULACIÓN

Para la identificación de los parámetros estructurales adecuados para la implementación del modelo de mucina se evaluaron las constantes de enlace, de flexión y longitud de enlace; para ello se hizo un diseño experimental, en el cual se evaluaron como parámetros a) energía de enlace, b) energía de flexión, c) energía de interacción de pares de átomos, d) Presión (vía). El diseño experimental se consideraron 9 puntos centrales, los cuales en este caso al tratarse de simulaciones se llevaron a cabo variando para cada caso la semilla del generador de números aleatorios, con lo cual se evalúa la desviación que puede existir entre múltiples simulaciones bajo las mismas condiciones. Todas las simulaciones fueron llevadas a cabo en cajas de tamaño 25x25x25, con un total de 10 modelos de proteína por caja, con el fin de disminuir los tiempos de simulación y evitar artefactos por el uso de caja periódica.

Tabla 4, se presenta un resumen de los experimentos llevados a cabo.

Dentro de los resultados interesantes destaca el hecho de que la variación de las constantes de enlace en un amplio intervalo, no afecta considerablemente el estado energético de la simulación (energía de DPD). Sin embargo si es evidente el cambio en las estructura de las moléculas, las cuales son ampliamente influenciadas por la constante de enlace; ya que un incremento produce un aplanamiento de la molécula, en general se observa que las condiciones estables se tienen cuando el valor de la constante de enlace es 5 veces el ángulo de configuración diferentes, inducen la deformación del modelo. Respecto a la longitud de enlace se encuentra como intervalo seguro 0,6 a 0,75; fuera de este intervalo el modelo colapsa (mayor que 0.75) o afecta el perfil de densidad (menor que 0.6). Las imágenes A, B, C y D ilustran las conformaciones encontradas en algunas simulaciones, yendo desde estructuras colapsadas hasta conformaciones regulares D.

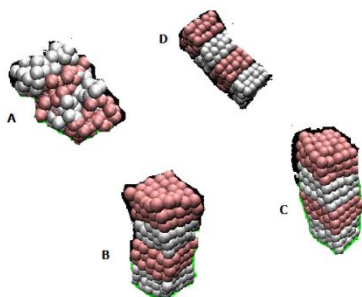


FIGURA 20 DIFERENTES CONFIGURACIONES ALCANZADAS TRAS VARIACIONES EN LOS PARÁMETROS ESTRUCTURALES

TABLA 4 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PARÁMETROS ESTRUCTURALES

Variables experimentales			Variables de respuesta				
b_L	K_s	K_b	E_s	E_r	E_{DPD}	rog	P
Distancia de enlace	Constante de enlace	Constante de flexión	Energía de enlace	Energía de flexión	Energía de interacción de pares	Radio de giro	Presión
1.25	2	20	0.0162	0.039	4.59	4.7	23.854
0.75	31	10.5	0.022	0.043	4.59	2.49	23.89
0.75	31	10.5	0.022	0.044	4.59	2.49	23.87
-0.09	31	10.5	0.83	0.027	4.82	ruptura	23.12
0.75	31	10.5	0.022	0.042	4.58	2.5	23.91
0.75	79.772	10.5	0.022	0.025	4.56	ruptura	23.85
1.25	2	1	0.023	0.029	4.6	3.9	23.87
0.25	60	1	0.35	0.011	4.78	1.58	23.03

1.25	60	1	0.041	0.011	4.6	3.8	23.86
0.75	31	10.5	0.023	0.046	4.58	2.49	23.87
0.75	31	10.5	0.021	0.042	4.58	2.49	23.92
1.25	60	20	0.033	0.036	4.6	4.08	23.89
0.25	2	1	0.051	0.027	4.6	2.25	23.84
0.75	31	10.5	0.023	0.044	4.58	2.47	23.83
0.75	-17.772	10.5	-271.2	1.99	6.02	2600	803.74
0.75	31	10.5	0.022	0.044	4.59	2.49	23.91
0.25	2	20	0.082	0.12	4.6	3.2	23.8
0.75	31	10.5	0.023	0.043	4.58	2.48	23.9
0.25	60	20	0.31	0.031	4.76	ruptura	23.1
0.75	31	26.48	0.013	0.035	4.55	ruptura	23.8
1.59	31	10.5	0.0258	0.025	4.61	5.17	23.87
0.75	31	-5.48	0.45	-2.52	4.83	1.4	22.94

Respecto al tamaño de la caja de simulación y del modelo de mucina, se propuso de nuevo un diseño experimental en el cual se evaluarían dos factores: i) el tamaño de la caja y ii) el largo de la mucina (LM). En la Tabla 5 se presenta el resumen del diseño y las simulaciones realizadas. Con el fin de mantener la similitud entre simulaciones se fijó una concentración (volumétrica) de mucina de 0.14, de tal forma que el número de proteínas cambia de acuerdo al tamaño de la caja y

TABLA 5 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE EL TAMAÑO DE LA CAJA ADECUADO PARA LA SIMULACIÓN

Número de procesadores*	Tamaño de caja (L)	Longitud de mucina (LM)	Número de mucinas
8	40	20	149
8	50	20	292
8	50	80	73
1	10	60	1
4	30	20	63
8	50	40	146
8	40	80	37
1	20	60	6
1	20	80	5
1	20	20	19
1	10	80	1

4	30	40	32
1	10	20	2
4	30	80	16
1	20	40	9
8	50	60	97
1	10	40	1
4	30	60	21
8	40	60	50
8	40	40	75

*Debido a la demanda computacional y disponibilidad de recursos en el computador para simulaciones con $L < 25$, se empleó 1 procesador, $25 < L < 35$ 4 procesadores y $L > 35$ 8 procesadores.

Previamente a las simulaciones ya mencionadas se llevaron a cabo 5 simulaciones ($L = 10, 20, 30, 40, 50$) sin modelos de mucina dentro, con el fin de tener un blanco. A partir de los parámetros de movimiento evaluados en las diferentes simulaciones, se concluye que hay una influencia significativa del tamaño de caja y mucina en los cálculos energéticos del sistema, sin embargo las conformaciones alcanzadas por las mucinas si son ampliamente afectadas por la relación L / LM . En general se demostró que un sistema con un tamaño de mucina definido LM debe ser simulado en una caja con un tamaño aproximado $2.5 * LM$, con el fin de evitar distorsiones en la dinámica y configuración final. Las figuras 21 y 25 presentan las diferentes configuraciones finales obtenidas para algunos de los sistemas si



FIGURA 21. CONFIGURACIÓN FINAL PARA UNA CAJA DE DIMENSIONES DE $50 \times 50 \times 50$, CON MODELOS DE MUCINA DE UNIDADES DONDE LAS MOLÉCULAS TUVIERON CAPACIDAD DE MOVIMIENTO Y ROTACIÓN A LO LARGO DE LA SIMULACIÓN, PERMITIÉNDOLES EXPLORAR EL ESPACIO DISPONIBLE.

Agregados longitudinales, sin rotación ←

→ Fracción de moléculas reorientadas

FIGURA22 CONFIGURACIÓN FINAL PARA UNA CAJA DE EMULACIÓN DE 50X50X50, CON MODELOS DE MUCINA DE UNIDADES DONDE SOLAMENTE UNA FRACCIÓN BAJA DE MOLÉCULAS EVIDENCIA ROTACIÓN, AL PARECER LA FORMACIÓN DE AGREGADOS LONGITUDINALES EN LAS PRIMERAS ETAPAS DE SIMULACIÓN NO PERTE LA POSTERIOR ROTACIÓN DEL AGREGADO DEBIDO A LA INFLUENCIA QUE TIENE EL TAMAÑO DE LA CAJA SOBRE EL SISTEMA

Agregación de la molécula consigo misma ←

FIGURA23 CONFIGURACIÓN FINAL PARA UNA CAJA DE EMULACIÓN DE 30X30X30, CON MODELOS DE MUCINA DE UNIDADES DONDE EL TAMAÑO DE MUCINA ORIGINAL SE MANTIENE EN LA SIMULACIÓN QUE MANTIENE A TODAS LAS MOLÉCULAS EN ORIENTACIÓN VERTICAL DEBIDO A FENÓMENOS DE AGREGACIÓN DE MOLÉCULAS CONSIGO MISMAS SIN CRUZAR FRONTERA PERIÓDICA

