

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE INSERCIÓN,
ORIENTACIÓN Y DINÁMICA DEL PÉPTIDO
PENETRADOR TP1 ACTUANDO SOBRE UN NUEVO
MIMÉTICO DE MEMBRANA**

Tesis

**Entregada a la Universidad de Chile en
cumplimiento parcial de los requisitos para optar
al grado de**

Doctorado en Química

Facultad de Ciencias

Por

Diego Alberto Muñoz Gacitúa

Noviembre, 2021

**Director de Tesis:
Dr. Boris Weiss**

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Diego Alberto Muñoz Gacitúa

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 5 de Octubre del año 2021.

Director de tesis:
Dr. Boris Weiss

Comisión de evaluación de la tesis

Dr. Renato Contreras

Dra. Carolina Julian

Dr. Maximiliano Martinez

Dr. Gerald Zapata



Diego Alberto Muñoz Gacitúa, Candidato a Doctor en Química, programador autodidacta, dedicado a la investigación de péptidos y membranas en el Laboratorio de Fisicoquímica Molecular de la Universidad de Chile. Nacido en 1992 en la ciudad de Santiago, Chile. Ingresó al programa de Doctorado en Química de la Universidad de Chile el año 2016 tras haber finalizado sus estudios de Licenciatura en ciencias con mención en Química en la misma universidad.

Agradecimientos

Principalmente, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi profesor de tesis, el Prof. Boris Weiss, por el continuo apoyo durante la investigación y desarrollo de mi doctorado, por su paciencia, motivación, entusiasmo e inmenso conocimiento. No podría haber imaginado un mejor asesor y mentor para mi estudio de doctorado.

Además de mi mentor, quiero agradecer a los miembros de la comisión evaluadora de mi tesis: Dr. Renato Contreras, Dra. Carolina Julian, Dr. Maximiliano Martinez y al Dr. Gerald Zapata, por sus perspicaces comentarios y difíciles preguntas.

Mis sinceros agradecimientos a la Prof. Fanny Guzman por sus asesorías, gran disposición y enorme conocimiento.

Quiero extender mis agradecimientos a Sofía, por su paciencia e inquebrantable apoyo.

Finalmente, pero no menos importante, quiero agradecer a mi familia: mis padres Sara Gacitúa y Juan Muñoz, por traerme a este mundo y brindarme apoyo durante toda mi vida.

Índice

1. Introducción y marco teórico	1
1.1. Miméticos de membrana	6
1.2. Resonancia magnética nuclear de deuterio	10
1.3. Dinámica molecular	14
1.4. Síntesis de péptidos	17
2. Hipótesis y objetivos	22
2.1. Hipótesis	22
2.2. Objetivos generales	22
2.3. Objetivos específicos	22
3. Metodología	31
3.1. Formulación del nuevo mimético de membrana	31
3.1.1. Primera maximización de fosfolípido en el mimético	31
3.1.2. Segunda maximización de fosfolípido en el mimético	33
3.1.3. Inclusión del tampón en el mimético	34
3.1.4. Verificación del funcionamiento como mimético	34
3.2. Síntesis del péptido TP1	35
3.3. Estudio preliminar de posicionamiento del péptido en el mimético nuevo	37
3.4. Cálculos de dinámica molecular	38
3.4.1. Selección del campo de fuerza	38
3.4.2. Perfiles de energía libre para procesos de inserción de sustratos en la membrana	42
3.5. Espectroscopía ^2H -RMN de miméticos de membrana y péptidos selec- tivamente deuterados	43
4. Resultados y discusión	47
4.1. Formulación del nuevo mimético de membrana.	47
4.2. Calibración de un modelo de simulación	50
4.3. Validación del mimético	53
4.3.1. Control con benzocaína	54
4.3.2. Control con L-Dopa	55
4.4. Síntesis del péptido TP1	57
4.5. Inserción del péptido TP1 en la membrana	59
4.5.1. Mecanismo de translocación: Efecto de la concentración	61
4.5.2. Mecanismo de translocación: Efecto del agua	63
4.5.3. Mecanismo de translocación: Efecto del fosfolípido	64
4.5.4. Mecanismo de translocación: Mecanismo paso a paso	65
4.5.5. Mecanismo de translocación: Mecanismo con fosfolípido	70
4.5.6. Mecanismo de translocación: Mecanismo sin fosfolípido	76
4.6. Estudio experimental de la conformación en equilibrio	79

4.6.1. Leucina-2: Posición y orientación promedio	87
4.6.2. Leucina-4: Posición y orientación promedio	87
4.6.3. Leucina-5: Posición y orientación promedio	90
4.6.4. Leucina-7: Posición y orientación promedio	91
4.6.5. Leucina-8: Posición y orientación promedio	92
4.6.6. Estructura del péptido TP1 en equilibrio	93

5. Conclusiones **95**

Índice de tablas

1.	Contenido de ácidos grasos en el fosfolípido extraído del poroto de soja e hidrolizado, suministrado por Sigma-Aldrich. Porcentajes en masa. .	31
2.	Composición de un mimético de membrana aniónico basado en dodecil sulfato de sodio, preparación de Bahamondes <i>et al.</i> . Porcentajes en masa.	32
3.	Formulación de mimético de membrana según resultados de una primera maximización en el contenido de fosfolípido.	33
4.	Composición de un mimético de membrana simulado, a base de dodecil sulfato de sodio con alto contenido de fosfolípido.	38
5.	Composición de mimético de membrana con alta concentración de fosfolípido.	49
6.	Desdoblamientos cuadrupolares experimentales y obtenidos en simulación.	93

Índice de figuras

1.	Mecanismos propuestos para el ingreso de CPPs hacia el interior de la célula. (Ramsey <i>et al.</i> , 2015)	3
2.	Microscopía de fluorescencia confocal de péptidos penetrantes de célula marcados con el fluoróforo TAMRA en cultivo de ovarios de <i>Cricetulus griseus</i> . Imágenes tomadas tras 20 minutos de incubación con péptido penetrante. (Marks <i>et al.</i> , 2011)	5
3.	Representación gráfica de una micela bicapa o <i>bicela</i> en comparación a una micela.	6
4.	Orientación de la mesofase frente a un campo magnético externo . . .	8
5.	Ilustración de un dipolo y un cuadrupolo eléctrico	11
6.	Origen del desdoblamiento cuadrupolar. Éste sólo se observa cuando el sistema presenta anisotropía.	12
7.	Definición del ángulo χ fuera del plano.	17
8.	Reacción de desprotección de aminoácido protegido con Fmoc	20
9.	Mecanismo de activación de un aminoácido con HBTU.	21
10.	Esquema de síntesis de péptidos en fase sólida. \circ : resina, \triangle : grupo protector α -amino, \diamond \square : grupos protectores de cadena lateral. 1 : Acoplamiento del primer aminoácido, 2 : Desprotección, 3 : Acoplamiento del siguiente aminoácido, 4 : Clivaje y desprotección de cadenas laterales.	36
11.	Configuración inicial de una bicapa para la simulación de un mimético de membrana a base de dodecil sulfato de sodio (SDS) con un alto contenido de fosfolípido. SDS coloreado en azul, 1-decanol en negro y fosfolípido en naranja	39

12.	Gráfico del potencial de Van de Waals modificado para no calcular interacciones más lejanas que 1.2nm, según lo especificado por el campo de fuerzas CHARMM36. La línea punteada indica la función sin modificaciones.	40
13.	Gráfico del potencial de Van der Waals modificado para no calcular interacciones más lejanas que 1.4nm, según lo especificado por los campos de fuerzas Berger y Gromos 53A6. La línea punteada indica la función sin modificaciones.	41
14.	Desdoblamiento cuadrupolares en señales de agua deuterada y 1-decanol- $\alpha - d_2$ en función de la concentración de fosfolípido en miméticos de membrana a base de SDS.	47
15.	Imágenes de microscopía de luz polarizada de miméticos de membrana a base de SDS con diferentes contenidos de fosfolípido. Ambas con magnificación 100x.	48
16.	Imágen de microscopía de luz polarizada de un mimético de membrana a base de SDS con 5 % de fosfolípido. Se observa un régimen mixto entre dos fases.	49
17.	Comparación entre espectros ^2H -RMN para miméticos con 22 % y 23 % de contenido de fosfolípido.	50
18.	Espectro ^2H -RMN de mimético de membrana a base de SDS con 22 % de fosfolípido natural. Las señales desdobladas de sondas de SDS- d_{25} . La señal central corresponde a la señal desdoblada (no visible) del agua deuterada en la muestra.	51
19.	Desdoblamiento cuadrupolares de SDS- d_{25} del espectro ^2H -RMN. Comparación entre resultado experimental (círculos negros) y predicho por simulaciones de dinámicas moleculares con diferentes campos de fuerza. Se muestran los resultados de CHARMM36 en cuadrados rojos, Berger con cargas según cálculo B3LYP en cruces diagonales verdes, Berger con cargas de Gromos53A6 en triángulos azules, Gromos53A6 con cargas según cálculo B3LYP en cruces rojas y Gromos53A6 con cargas según definidas en el campo de fuerza en círculos azules.	51
20.	Desdoblamiento cuadrupolares de SDS- d_{25} en ^2H -RMN. Comparación de resultados experimentales y predichos por cálculos de dinámica molecular con bicapas estabilizadas con diferentes termostatos. . .	53
21.	Perfil de potencial químico para el proceso de translocación de benzocaína a través de un mimético de membrana a base de SDS.	54
22.	Desdoblamiento cuadrupolares de SDS- d_{25} en un mimético de membrana a base de SDS. Comparación entre mimético con benzocaína y sin el anestésico.	55
23.	Perfil de potencial químico para el proceso de translocación de L-dopa a través de un mimético de membrana a través de un mimético de membrana a base de SDS.	56

24.	Espectro ^2H -RMN de una muestra de mimético de membrana con 7mg de L-Dopa- d_3 por cada gramo de muestra. Desdoblamientos de 4248 para H^A y 8228Hz para H^B	57
25.	Dicroísmo circular y espectro de masas para péptido TP1.	58
26.	Dicroísmo circular y espectro de masas para péptido TP1 sin cisteína.	59
27.	Espectros ^2H -RMN de miméticos de membrana a base de SDS con sondas de SDS- d_{25} . Comparación entre muestras con y sin péptido TP1.	60
28.	Perfil de potencial químico para el proceso de translocación del péptido TP1 a través de un mimético de membrana a base de SDS.	60
29.	Perfil de potencial para proceso de translocación de péptido TP1 a través de un mimético de membrana celular. En azul el fenómeno sin péptidos insertos previamente. Y en verde el mismo fenómeno con dos péptidos insertos en la transmembrana.	62
30.	Perfil de potencial para proceso de translocación de péptido TP1 a través de un mimético de membrana celular. En azul el fenómeno sin translocación de agua. Y en rojo el mismo fenómeno con moléculas de agua solvatando el péptido durante el mecanismo.	63
31.	Perfil de potencial para proceso de translocación de péptido TP1 a través de un mimético de membrana celular. En rojo el fenómeno ocurriendo en un mimético de membrana con alto contenido de fosfolípido. Y en púrpura la translocación a través de un mimético sin fosfolípido.	64
32.	Péptido TP1 en solución. A la izquierda en un diagrama de líneas y esferas y a la derecha en un diagrama de cintas.	65
33.	(a)Péptido TP1 con su centro de masa a 3.446 nm del centro de un mimético de membrana celular. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1	67
34.	(a)Péptido con su centro de masa TP1 a 2.634 nm del centro de un mimético de membrana celular. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1	68
35.	(a)Péptido TP1 con su centro de masa a 2.119 nm del centro de un mimético de membrana celular. En esferas amarillas se representan los radios de Van der Waals de sodio. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. Y en líneas (bajo la capa de stern) se representan los componentes de la bicapa. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.	69

36.	(a) Péptido TP1 con su centro de masa a 0.459 nm del centro de un mimético de membrana celular. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. Y en líneas se representan los componentes de la bicapa. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.	71
37.	(a) Péptido TP1 con su centro de masa a -0.663 nm del centro de un mimético de membrana celular. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. Y en líneas se representan los componentes de la bicapa. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.	73
38.	(a) Péptido TP1 con su centro de masa a -1.662 nm del centro de un mimético de membrana celular. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. Y en líneas se representan los componentes de la bicapa. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.	74
39.	(a) Péptido TP1 con su centro de masa a -2.696 nm del centro de un mimético de membrana celular. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. Y en líneas se representan los componentes de la bicapa. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.	75
40.	Péptido TP1 con su centro de masa a -2.696 nm escapando de un mimético de membrana. En diagrama de cintas se representa el péptido TP1 y en líneas los componentes del mimético.	76
41.	(a) Péptido TP1 con su centro de masa a 1.111 nm del centro de un mimético de membrana celular sin fosfolípido. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. Y en líneas se representan los componentes de la bicapa. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.	77

42.	(a) Péptido TP1 con su centro de masa a -0.304 nm del centro de un mimético de membrana celular sin fosfolípido. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. En líneas se representan los componentes de la bicapa. Y en esferas semitransparentes celestes se representan las partículas de agua. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.	78
43.	(a) Péptido TP1 con su centro de masa a -1.268 nm del centro de un mimético de membrana celular sin fosfolípido. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. En líneas se representan los componentes de la bicapa. Y en esferas semitransparentes amarillas y anaranjadas se representan las partículas de sodio y sulfato respectivamente. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.	80
44.	(a) Péptido TP1 a -2.722 nm del centro de un mimético de membrana celular sin fosfolípido. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. En líneas se representan los componentes de la bicapa. Y en esferas semitransparentes amarillas y anaranjadas se representan las partículas de sodio y sulfato respectivamente. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.	81
45.	Microscopía de luz polarizada de miméticos de membrana con péptido TP1 y (a) baja concentración de fosfolípido y (b) exceso de fosfolípido.	82
46.	Espectro ^2H -RMN de péptido TP1- d_{30} con marcas deuteradas en sus cinco leucinas. El gráfico superior corresponde al espectro completo, la zona gris corresponde a la zona expandida en el gráfico inferior. Esta ampliación hecha al gráfico completo fue para mostrar sólo las señales atribuibles al péptido TP1. En ésta, con flechas rojas se destacan las señales asignadas al péptido deuterado, mientras que con flechas verdes se destacan aquellas asignadas al HDO producto de la abundancia natural de deuterio.	83
47.	Espectros ^2H -RMN de péptidos TP1 deuterados en una de sus leucinas, dentro de un mimético de membrana sin fosfolípido.	85
48.	Comparación de espectro ^2H -RMN de péptido TP1 deuterado en sus cinco leucinas (en azul), y suma de espectros con las mismas características del péptido deuterado en sus posiciones 4, 5, 7 y 8 (en anaranjado). La diferencia entre ambos corresponde a la señal desdoblada de la leucina-2 del péptido en la membrana.	86

49.	Ángulo (θ) entre el enlace del carbono β y γ de una leucina y el eje orientador de la bicapa.	88
50.	Histograma de ángulos entre el enlace del carbono β y γ de la leucina-2 en el péptido TP1 simulado que reproduce resultados experimentales en espectroscopía $^2\text{H-RMN}$	88
51.	Histogramas de ángulos entre el enlace del carbono β y γ de la leucina-4, en sus dos orientaciones, en el péptido TP1 simulado que reproduce resultados experimentales en espectroscopía $^2\text{H-RMN}$	89
52.	Histogramas de ángulos entre el enlace del carbono β y γ de la leucina-5, en sus dos orientaciones, en el péptido TP1 simulado que reproduce resultados experimentales en espectroscopía $^2\text{H-RMN}$	90
53.	Histograma de ángulos entre el enlace del carbono β y γ de la leucina-7 en el péptido TP1 simulado que reproduce resultados experimentales en espectroscopía $^2\text{H-RMN}$	91
54.	Histograma de ángulos entre el enlace del carbono β y γ de la leucina-8 en el péptido TP1 simulado que reproduce resultados experimentales en espectroscopía $^2\text{H-RMN}$	92
55.	Posición probable de las cadenas laterales de leucina en péptido TP1 inmerso en mimético de membrana.	93
56.	Mecanismo propuesto para la translocación pasiva del péptido TP1 a través de la membrana. Variaciones con y sin fosfolípido en la membrana. Membrana representada por el fondo celeste.	97

Lista de símbolos, abreviaturas y acrónimos

Abreviatura o acrónimo	Significado
^2H -RMN	Resonancia magnética nuclear de deuterio
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARG	Arginina
ATP	Adenosín trifosfato
BPTI	Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor (Inhibidor de tripsina pancreático bovino)
CHAPSO	3-(colamidopropil)dimetilamonio-2-hidroxi-propanosulfonato
CHARMM	<i>Chemistry at Harvard Molecular Mechanics</i>
CPP	Cell Penetrating Peptide (Péptido penetrador de células)
DeOH- α -d ₂	1-Decanol deuterado en los carbonos α al grupo hidroxilo
DHPC	1,2-Dihexanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DIEA	N,N-Diisopropiletanina
DMPC	1,2-Dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
ESI-MS	Espectrómetro de masas por ionización de electrospray
FDA	Food and drug administration (Administración de medicamentos y alimentos)
GROMACS	<i>Groningen Machine for Chemical Simulations</i>
HBTU	Benzotriazol-tetrametilamonio
LEU	Leucina
MD	Dinámica molecular
NOE	Nuclear Overhauser Effect (Efecto Overhauser nuclear)
NVT	Conjunto canónico
PME	Particle mesh Ewald (Malla de partículas de Ewald)
PMF	Potential of mean force (Potencial de fuerza media)
RDF	Radial distribution function (Función de distribución radial)
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS-d25	Dodecilsulfato de sodio deuterado en toda la cadena
TAT	Proteína transactivadora de transcripción
TFA	Ácido trifluoroacético
TFE	Trifluoroetanol
TP1	Translocating peptide 1 (Péptido translocante 1)
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
WHAM	Weighted histograms analysis method (Método de análisis por peso de histogramas)

Nomenclatura de aminoácidos empleados

Nombre	Abreviatura	Sigla
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Prolina	Pro	P

Resumen

Atravesar la membrana celular es una de las principales barreras en el desarrollo de nuevos fármacos, como respuesta se han propuesto múltiples soluciones para ingresar exógenos al contenido intracelular, una de estas soluciones es el uso de *péptidos penetradores de célula* o CPP por sus siglas en inglés.

Los CPPs consisten en péptidos cortos capaces de cruzar la membrana con un cargo adherido, pudiendo ser este cargo una molécula pequeña, un péptido o material genético entre otros. Hasta hace pocos años, solo se habían desarrollado CPPs capaces de atravesar la membrana vía endocitosis, dejando como consecuencia el cargo y el CPP atrapados dentro de un endocito o vesícula. El desarrollo de CPPs apolares surgió como solución a este problema, cuya principal característica es que son capaces de ingresar al contenido intracelular mediante una translocación directa, es decir, su mecanismo de ingreso no implica la formación de vesículas.

Uno de los CPPs polares descubiertos, acuñado TP1, demostró ser capaz de atravesar membranas *in vivo* y membranas artificiales con la misma eficiencia, implicando que su mecanismo de ingreso no depende de procesos activos ni receptores específicos. Si bien se sospecha que el mecanismo de ingreso principal podría ser mediante difusión pasiva, hasta ahora no existen pruebas que corroboren esta conjetura. La investigación detallada en este documento, busca aportar evidencias hacia la teoría de que la translocación ocurre mediante difusión pasiva.

En primer lugar, se desarrolló un mimético de membrana a base del detergente dodecilsulfato sódico y con alto contenido de fosfolípidos naturales. Este mimético tiene la característica de poder orientarse frente a un campo magnético externo; esta propiedad es especialmente útil en resonancia magnética nuclear de deuterio (^2H -RMN), pues permite conocer la localización y dinámica orientacional de una sonda deuterada a partir del conocimiento de los desdoblamientos cuadrupolares. Este nuevo mimético de la membrana celular fue validado como tal al lograr reproducir las propiedades de permeabilidad de benzocaína y levodopa en el mimético. Adicionalmente, se calibró un modelo de simulación, capaz de reproducir resultados experimentales de espectroscopía del mimético de membrana.

En una segunda parte, y empleando el modelo de simulación ya calibrado, se estudió el mecanismo de translocación paso a paso del péptido TP1, se exploró el mecanismo cuando la bicapa lipídica posee fosfolípidos en su composición y cuando carece de ellos. Se encontró que la translocación es más cinéticamente factible cuando el péptido tranloca dominios carentes de fosfolípidos, como lo sería una *balsa lipídica*. Además, se encontró evidencia de una fuerte interacción entre la arginina del péptido TP1 y los fosfatos del fosfolípido de la bicapa. Luego, en un estudio con péptidos TP1 con marcas deuteradas en sus leucinas, se logró establecer que en la conformación más probable, el péptido TP1 en equilibrio se encuentra parcialmente inmerso en la transmembrana, resultado que coincide con lo encontrado en la simulación del mecanismo y lo encontrado mediante microscopía de fluorescencia por otros investigadores.

Abstract

Crossing the cellular membrane is one of the main barrier in drug discovery, many solutions have been proposed to integrate exogenes into the intracellular fluid, one of these solutions is the use of *cell penetrating peptides* (CPP)

These CPPs consist in short peptides able to cross the cellular membrane carrying a cargo, this cargo being either a small molecule, a short peptide, genetic material among others. Until few years ago, only CPPs able to cross the membrane via endocytosis had been developed. This method has the unfortunate consequence of leaving the cargo entrapped inside an endocyte or vesicle. The development of hydrophobic CPPs originated as a solution to this problem, these hydrophobic CPPs are able to translocate directly without the formation of any vesicle.

One of the discovered hydrophobic CPPs, is TP1 (Translocating peptide-1), which demonstrated being able to cross *in vivo* and artificial membranes with efficiency alike, implying that its mechanism does not require any active process or specific receptor. While it is suspected that a passive diffusion could be the translocating mechanism this CPP employs, there is not evidence that support this conjecture. The research detailed in this document, seeks to contribute with evidence towards the theory that this CPP translocates via passive diffusion.

In a first part of the research, a membrane mimetic based of sodium dodecylsulphate and a high natural phospholipid content was developed. Among many, this mimetic has the characteristic of being able to orient itself when exposed to an external magnetic field; this property is specially useful in deuterium nuclear resonance spectroscopy ($^2\text{H-NMR}$), as it allows us to probe the position and orientational dynamics of a deuterium-labeled species from the quadrupolar splitting this spectroscopy produces. This new mimetic of the cellular membrane was validated as such by reproducing the permeability properties of the drugs: benzocaine and levodopa in the proposed mimetic. The results were the ones expected as if they were performed on a cellular membrane.

In a second part of the research, a step-by-step mechanism of the TP1 peptide translocating the membrane mimetic was studied, two possible mechanisms were explored in detail, one where the membrane was rich in phospholipids and another where the membrane was devoid of it. It was found that the translocation is kinetically more viable through a bilayer with less phospholipid content, as it would be a *lipid raft*. Furthermore, evidence was found of a strong interaction between arginine of TP1 and phosphate groups in phospholipids. Additionally, in a study with TP1 synthesized with deuterium labeled leucines, it was established that the most probable configuration of TP1 in equilibrium, is with the peptide partially immersed in the membrane. This last result concurs with what was found in the simulated mechanism, and the observed via fluorescence microscopy by other researchers.

1. Introducción y marco teórico

Las células son adeptas en prevenir la entrada de moléculas, péptidos y material genético que no tengan un mecanismo específico de ingreso asociado. Debido a esta capacidad, uno de los factores más restrictivos en el desarrollo de nuevos fármacos es la incapacidad de los potenciales fármacos para cruzar la membrana celular¹; un potencial fármaco demasiado polar tiene muy pocas probabilidades de ser efectiva por su incapacidad de cruzar la membrana celular.

Actualmente, existen algunas soluciones que para el ingreso de compuestos polares usando métodos como la fusión de vesículas lipídicas², péptidos formadores de poros³ o proteínas permeabilizadoras de membrana⁴ entre otros. No obstante, estos métodos son imprácticos para su utilización *in vivo*. Una estrategia compatible con experimentos *in vivo*, es ingresar éstos compuestos vía endocitosis o fagocitosis activa^{5,6}, sin embargo, al ser estos procesos activos, es decir, que requieren de un consumo energético en forma de ATP por parte de la célula, estos métodos están limitados a fármacos cuyas estructuras sean compatibles con un receptor específico en la trans-membrana.

Con el objetivo de eliminar la membrana celular como barrera en el diseño de fármacos, en las últimas tres décadas se ha impulsado el desarrollo de los llamados *Péptidos Penetradores de Célula* (CPP por sus siglas en inglés), que consisten en péptidos relativamente cortos (entre 5 y 20 aminoácidos) que enlazados al fármaco, transportan éste hacia el interior de la célula para liberarlo ahí.

El origen de los CPPs surge del descubrimiento de la capacidad de atravesar membranas de la proteína Transactivadora de Transcripción (TAT) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Al mismo tiempo, se descubrió que la adición

de inductores de endocitosis^a incrementa la actividad penetrante de la proteína, sugiriendo que la endocitosis sería el mecanismo de entrada⁷. El mismo año, se demostró que sólo una porción de 22 de un total de 86 aminoácidos en la proteína TAT, entra a la célula y retiene su actividad en un $\sim 40\%$ ⁸. Posteriormente, no solo se demostró que una fracción de 12 aminoácidos de la proteína TAT retiene su actividad penetrante, además se demostró que al impedir completamente todo proceso activo de la célula, cómo la endocitosis, aún se detecta actividad penetrante del péptido, sugiriendo que existen mecanismos adicionales a la endocitosis⁹.

Hasta el día de hoy, se han propuesto cientos de CPPs, clasificables según sus propiedades fisicoquímicas, generando tres categorías que engloban la mayoría: catiónicos, anfifílicos e hidrofóbicos. Dado que la membrana celular posee una carga superficial negativa, existen solo casos excepcionales de CPPs aniónicos¹⁰. En la actualidad, se conoce que la secuencia mínima de TAT con actividad penetrante es la secuencia: RKKRRQRRR. Dado su alto contenido de argininas(R), un aminoácido catiónico, los CPPs derivados del TAT son clasificados como catiónicos.

Si bien, se sabe que los CPPs catiónicos ingresan principalmente mediante endocitosis¹¹, aun existe debate acerca de los mecanismos adicionales que estos CPPs llevan a cabo cuando la endocitosis no es posible. Conocer el mecanismo específico de entrada de un CPP es un problema complejo, hace pocos años se probó que los mecanismos no solo dependen de las características fisicoquímicas del CPP, sino que también de su concentración¹² y de las propiedades fisicoquímicas del cargo: Al conjugar un fluoróforo con la porción activa de TAT, se detectan pequeñas vesículas en el fluido intracelular evidenciando una entrada mediante endocitosis¹³, por otro lado, al reducir el tamaño del cargo en el mismo CPP, se detecta que la internalización es a través de endocitosis y translocación pasiva simultáneamente¹⁴, sugiriendo que

^aEndocitosis: Proceso celular en que sustancias son internalizadas a la célula mediante la formación de una vesícula llamada endocito.

las propiedades del cargo influyen en el mecanismo de entrada del CPP. La figura 1 resume algunos de los múltiples mecanismos propuestos para distintos CPPs según sus propiedades.

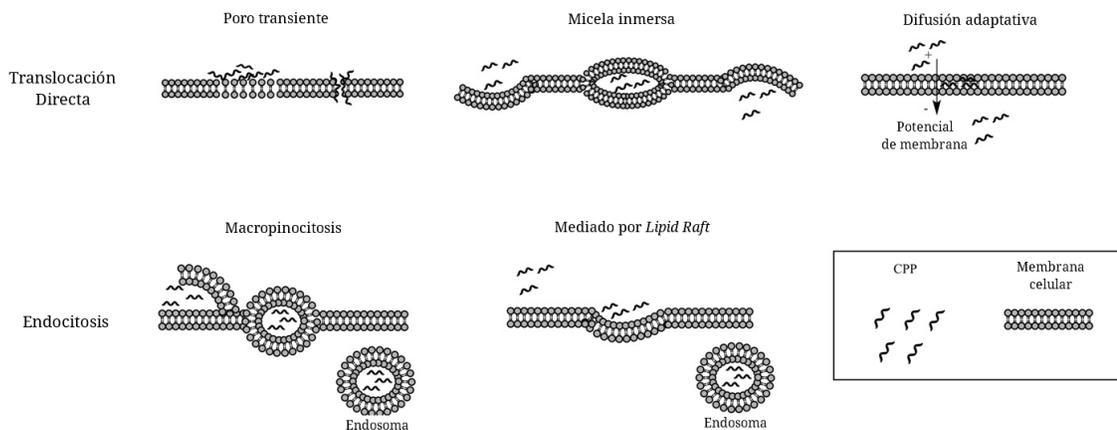


Figura 1: Mecanismos propuestos para el ingreso de CPPs hacia el interior de la célula. (Ramsey *et al.*, 2015)

En estudios derivados de la proteína TAT se descubrió que una secuencia mínima de octa-arginina (R_8) es necesaria para su absorción, además aumentar el número de argininas mejora la capacidad penetrante de la poli-arginina. Por otra parte, estudios con oligo-lisinas, otro aminoácido catiónico, resultan en una pobre actividad penetrante¹⁵. Por lo tanto no se puede atribuir la capacidad penetrante sólo a la carga positiva del CPP, sino que existe una interacción específica entre la arginina y la membrana que es esencial para la actividad del CPP. Esto concuerda con otras evidencias que indican que la interacción entre la arginina y el fosfolípido de la membrana tiene un rol especial en la permeabilidad de esta última^{16,17}.

El principal problema de los CPPs catiónicos, es que tras entrar al fluido intracelular vía endocitosis, estos son incapaces de escapar del endocito¹⁸. Estudios demuestran que CPPs basados en arginina quedan atrapados en el endocito cuando

el cargo consiste en un péptido¹⁹, oligonucleótidos²⁰ o un *quantum dot*²¹. Se ha propuesto como solución a este problema, la inclusión de un segundo cargo que asista el escape desde la vesícula²².

Existe otra solución a este problema, y es la utilización de CPPs hidrofóbicos, cuya principal característica es que son capaces de atravesar la membrana de forma pasiva y sin mediación de receptores específicos, de esta manera, el cargo entra al fluido intracelular directamente, sin la necesidad de escapar de una vesícula.

A diferencia de los CPPs catiónicos, que son desarrollados en torno a un CPP ya conocido, los CPPs hidrofóbicos son inicialmente descubiertos probando grandes librerías de péptidos generadas al azar²³

Recientemente, a través del mismo método, se desarrolló un trío de CPPs hidrofóbicos capaces de introducir un cargo unido con un enlace disulfuro hacia el interior de la célula mediante transporte pasivo²⁴. Este trío de péptidos adheridos a un fluoróforo zwitteriónico, cargo incapaz de atravesar la membrana por si solo, demostró su efectividad de igual manera en membranas sintéticas y en células *in vivo*, lo que demuestra que su mecanismo de ingreso predominante no implica procesos activos ni receptores específicos. Adicionalmente, una microscopía confocal de fluorescencia del CPP enlazado a un fluoróforo presenta a éste de manera difusa dentro de la célula (figura 2b), a diferencia del fluoróforo ingresado vía CPPs catiónicos que se aprecia como pequeñas manchas circulares bien definidas (figura 2a). Esto último sugiere que el mecanismo de entrada no implica la formación de vesículas, sino que el CPP entra directamente al contenido intracelular. Hasta el momento, se sospecha que el mecanismo corresponde a una difusión espontánea pasiva, no obstante, no existen evidencias que corroboren esta sospecha.

Éste proyecto busca indagar acerca del mecanismo específico de incorporación del

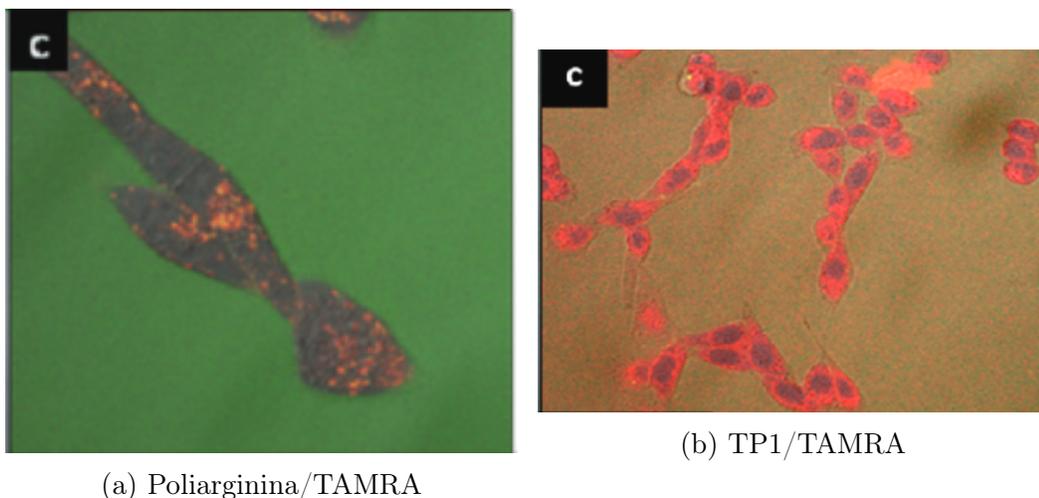


Figura 2: Microscopía de fluorescencia confocal de péptidos penetrantes de célula marcados con el fluoróforo TAMRA en cultivo de ovarios de *Cricetulus griseus*. Imágenes tomadas tras 20 minutos de incubación con péptido penetrante. (Marks *et al.*, 2011)

CPP con mayor actividad penetrante desarrollado por Marks *et al.*, acuñado *Translocating Peptide 1* o TP1. Para esto, se pretende introducir el péptido selectivamente deuterado en un mimético de membrana previamente preparado²⁵, y utilizar técnicas como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de deuterio (^2H -RMN) y cálculos de dinámica molecular para poder proponer un modelo que describa en detalle el proceso de cruce del péptido TP1 en la membrana y la orientación de éste en equilibrio dentro del mimético. Como hipótesis, se propone que el péptido cruzará la membrana mediante difusión pasiva, esto es, que el péptido cruza la membrana sólo impulsado por el gradiente de concentración que existe fuera y dentro de la célula, sin mediación de poros ni vesículas, ni gastos energéticos por parte de la célula.

1.1. Miméticos de membrana

La membrana celular es esencial para todo organismo vivo, no solo protege y delimita el contenido celular, se encarga del transporte de nutrientes, hormonas y mediadores entre otros. Está compuesta principalmente por fosfolípidos y ácidos grasos que forman una bicapa que envuelve la célula, además de una considerable porción de azúcares, colesterol y proteínas entre otros. La complejidad de la enorme maquinaria de funciones que se llevan a cabo en la membrana celular dificultan aislar un solo proceso para su estudio. Por esta razón, se ha hecho común emplear miméticos y modelos de membrana. Dado que uno de los objetivos de la investigación detallada en el presente documento es estudiar la permeabilidad del péptido TP1 en membranas celulares, se hace necesario el desarrollo de un mimético de membrana diseñado para imitar la permeabilidad de la membrana celular natural.

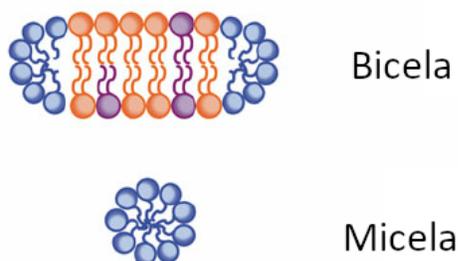


Figura 3: Representación gráfica de una micela bicapa o *bicela* en comparación a una micela.

Gracias a su capacidad de orientarse espontáneamente ante la exposición a un campo magnético, las micelas bicapa, también llamadas *bicelas* (ver figura 3), han sido ampliamente utilizadas como miméticos de membrana, dado que permiten el sondeo de información acerca de la estructura de los elementos de la bicapa y otras sustancias insertas mediante RMN.

El origen de las bicelas se remonta al 1967, año en que los investigadores Lawson

y Flautt introdujeron un cristal líquido capaz de orientarse ante un campo magnético, no obstante estos autores no reconocieron la estructura de bicela presente²⁶. No fue hasta 1979, año en que Amaral *et al.* identificaron la estructura de bicela en un cristal líquido a base de dodecil sulfato de sodio y 1-decanol²⁷. Posteriormente, en los años 90s, se descubrió que una mezcla de DMPC^b y CHAPSO^c forma bicelas que se orientan ante un campo magnético²⁸. El descubrimiento de este cristal líquido abre la puerta al uso de bicelas como miméticos de membrana, ya que contiene fosfolípidos que son el principal componente estructural de una membrana celular. Pocos años después se descubrió que es posible reemplazar el surfactante CHAPSO por DHPC^d, obteniendo una bicela compuesta completamente por dos fosfolípidos en su estructura²⁹. A pesar del alto costo monetario de sus materias primas, esta composición de bicela ha sido una de las más utilizadas como mimético de membrana.

Múltiples otras mejoras se han hecho a esta composición a lo largo de los años. Se descubrió que la adición del detergente Triton X-100 a la bicela mejora su capacidad de orientarse ante un campo magnético³⁰. Además de la adición de colesterol, que mejora la estabilidad de la bicapa³¹, se encontró que la presencia de los iones bivalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} resulta en bicapas más fuertemente orientadas, mientras que la presencia de Zn^{2+} y Cd^{2+} irrumpe la fase magnéticamente alineada. No obstante, se debe recalcar y tener en consideración que un mimético de membrana con sólo uno o dos fosfolípidos en su composición no representa la complejidad de la mezcla de compuestos que forman la bicapa en una membrana celular.

Hoy en día, las bicelas se consideran un buen mimético de membranas, se han usa-

^b1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

^c3-(colamidopropil)dimetilamonio-2-hidroxi-propanosulfonato

^d1,2-Dihexanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

do con éxito para predecir la permeabilidad de drogas en membranas y para dilucidar estructura de proteínas en la trans-membrana. Resulta ideal el uso de bicelas en los casos cuando el complejo droga-anfifilo (o proteína-anfifilo) es pequeño (<100 kDa), ya que en estos casos se puede recurrir a espectroscopías RMN en solución para estudiar estos sistemas.

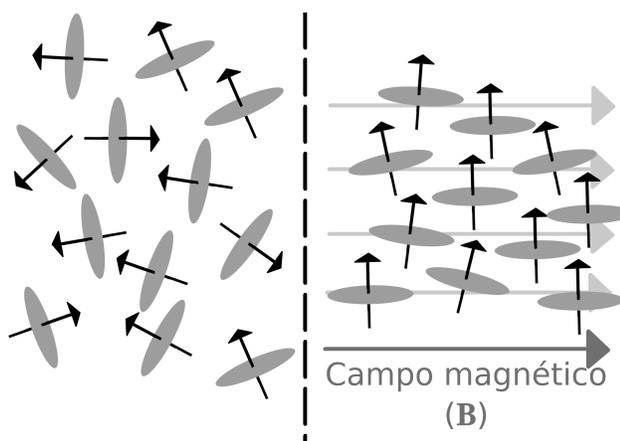


Figura 4: Orientación de la mesofase frente a un campo magnético externo

Este alto costo monetario hace poco factible hacer pruebas de permeabilidad y ensayos con sondas deuteradas de grandes cantidades de moléculas en tándem. Es por esto que se hace necesario el desarrollo de un nuevo modelo de membrana de bajo costo, pero que sea capaz de reproducir la permeabilidad de una membrana celular. Por esta razón, la investigación detallada en el presente documento incluye el desarrollo de un nuevo mimético de membrana a base del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), pero con una importante cantidad de fosfolípidos naturales extraídos del poroto de soya.

El detergente SDS es ampliamente utilizado en la fabricación de jabones, dentífricos y champú para el cabello, y no solo es inócuo, sino que gracias a la economía

de escala de su uso masivo, el SDS puro es órdenes de magnitud mas económico que un fosfolípido purificado. Por otro lado, el fosfolípido extraído del poroto de soya no solo es más barato que sus símiles purificados, sino que además contienen una mezcla natural de fosfocolinas y fosfoetanolaminas, que al estructurar una bicela serán una mejor representación de una membrana celular.

Este mimético desarrollado corresponde a un cristal líquido liotrópico nemático discoidal, que se orienta espontáneamente frente a un campo magnético, y esta basado en el mimético desarrollado por Bahamondes *et al.*³², el que a su vez está basado en la bicela primordial de Amaral *et al.*²⁷. Una ventaja de utilizar un detergente aniónico como el SDS para el mimético, es que producirá una carga superficial negativa en la interfase de la bicapa, asimilándose aun más a la mayoría de las membranas celulares encontradas en la naturaleza³³.

Tal cómo anteriormente se expuso, existen interacciones específicas entre la arginina del CPP y el fosfolípido de la membrana que son esenciales para el funcionamiento del péptido penetrante, es por esto que se requiere incluir fosfolípidos y maximizar su concentración dentro del mimético. La persistencia de los agregados como cristal líquido serán evaluados mediante el paso de luz a través de polarizadores cruzados, y los posibles cambios de fase mediante microscopía de luz polarizada. Esto es gracias a que el alto ordenamiento inherente de un cristal anisotrópico, como es el de una bicela, produce una birrefringencia en la luz que le incide, por lo tanto si se observa un cristal líquido a través de polarizadores cruzados en 90° se pueden observar diferentes patrones asociables a diferentes fases del cristal líquido.

Adicionalmente, la persistencia del cristal líquido como bicapa orientable en un campo magnético será evaluada con espectroscopía ²H-RMN de SDS deuterado en toda

la cadena alifática, en el que se esperan señales definidas y desdobladas para cada metileno ($\cdot\text{CD}_2\cdot$) y metilo ($\text{CD}_3\cdot$)

1.2. Resonancia magnética nuclear de deuterio

La resonancia magnética nuclear (RMN) tiene sus orígenes en dos investigadores: Isidor Rabi quien midió por primera vez el momento magnético en los átomos de hidrógeno y deuterio; y el investigador Felix Bloch, quien desarrolló el marco teórico, aun vigente, para la resonancia magnética nuclear. Es tal la importancia de los aportes de estos investigadores, que ambos fueron galardonados con un premio Nobel de física por sus aportes. Pero el impacto real a la química no llegaría hasta la década del 1950s, en el que Dickinson demostró que la frecuencia de resonancia magnética del flúor depende del compuesto al que el flúor está enlazado, efectivamente descubriendo lo que hoy conocemos como *corrimiento químico*^{34,35}

Desde entonces, es que el RMN se ha vuelto una poderosa herramienta para el desarrollo de la química, e indispensable para la química de síntesis, siendo incluso descrita como “los ojos del químico”³⁶. No obstante, las capacidades del RMN no sólo se limitan a la dilucidación de estructuras mediante resonancias magnéticas nucleares de protones (^1H -RMN) y/o de carbono-13 (^{13}C -RMN). Entre muchas otras posibles aplicaciones, la resonancia magnética nuclear de deuterio (^2H -RMN) ha sido esencial para el estudio de membranas y el desarrollo de sus miméticos.

El ^2H -RMN es vastamente diferente a su símil de protones. El núcleo de deuterio es poco sensible a la intensidad del campo magnético, y los acoplamientos deuterio-deuterio son 40 veces más débiles que los acoplamientos protón-protón, por lo que usualmente no se observan. Esto hace que el ^2H -RMN sea poco útil para la diluci-

dación de estructuras. No obstante, el núcleo de deuterio posee una ventaja: es un cuadrupolo eléctrico.

Un cuadrupolo se puede entender como dos dipolos (ver figura 5), sin embargo, a

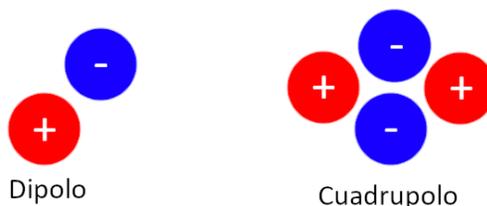


Figura 5: Ilustración de un dipolo y un cuadrupolo eléctrico

diferencia de un dipolo, un cuadrupolo no interactuará con un campo eléctrico homogéneo, dado que cualquier fuerza (o torque) aplicada desde un campo electrostático simétrico hacia el cuadrupolo, que se puede entender como un par de dipolos en dirección opuesta uno de otro, se cancelará. Un cuadrupolo sólo interactuará con un **gradiente de campo eléctrico**.

En la práctica, el núcleo de deuterio cuadrupolar se acopla con el gradiente de campo electrostático del enlace carbono-deuterio en el que se encuentra, dando origen a la *interacción cuadrupolar* en un medio anisotrópico. Dado el spin del núcleo de deuterio ($I = 1$), se observan dos transiciones de spin en un espectro ^2H -RMN por cada carbono-deuterio, en forma de un doblete de señales separados por un *desdoblamiento cuadrupolar* ($\Delta\nu$, ver figura 6). Como se describirá más adelante, si se tiene un péptido o una bicapa con sus componentes deuterados, este desdoblamiento cuadrupolar depende de los movimientos intra-moleculares y reorientaciones anisotrópicas del fragmento deuterado. Por lo tanto es posible determinar cambios en la orientación y movilidad monitoreando cambios en el desdoblamiento cuadrupolar.

En detalle, al exponer un mimético de membrana con sus componentes deuterio-

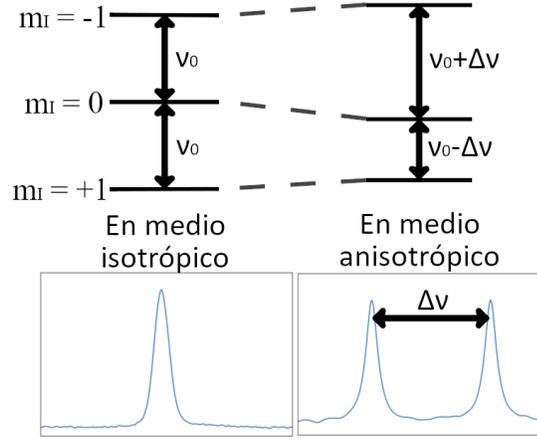


Figura 6: Origen del desdoblamiento cuadrupolar. Éste sólo se observa cuando el sistema presenta anisotropía.

dos frente a un campo magnético externo, el eje ortogonal al plano de la bicapa se orienta perpendicular a la dirección del campo magnético (ver figura 4). Bajo estas condiciones de anisotropía, las interacciones dipolares (eq. 1) y cuadrupolares (eq. 2) no promedian cero.

$$D_{ij} = -\frac{h\gamma_i\gamma_j}{4\pi r_{ij}^3} S_{ij} \quad (1)$$

$$\Delta v = \frac{3}{2} Q S_a \quad (2)$$

Donde i y j corresponden al par de núcleos acoplados (carbono y deuterio, en este caso), r_{ij} la distancia entre tales núcleos, D_{ij} la constante de acoplamiento dipolar, h a la constante de Planck, γ_i a la razón giromagnética del núcleo i , S_{ij} al parámetro de orden para el eje que une ambos núcleos respecto del campo magnético, Δv el desdoblamiento cuadrupolar, Q es la constante de acoplamiento cuadrupolar y S_a es el parámetro de orden del eje principal del gradiente de campo eléctrico, el eje del enlace carbono-deuterio en este caso, que afecta al núcleo cuadrupolar respecto al campo magnético.

Un parámetro de orden puede tener valores desde -0.5 hasta 1.0 , éste será cero si el eje de interacción rota isotrópicamente o si esta orientado a 54.7° respecto del campo magnético, este ángulo es llamado ángulo mágico y es vital en RMN de sólidos. La orientación y dinámica de un cuerpo rígido parcialmente orientado en un campo magnético pueden ser descritas por la matriz de parámetros de orden \mathbf{S} , que corresponde a una matriz de 3×3 diagonal y simétrica, cuyos elementos son:

$$\mathbf{S}_{pq} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos(\theta_p) \cos(\theta_q) - \delta_{pq} \rangle \quad (3)$$

Donde p y q son los ejes cartesianos (X , Y y Z) del cuerpo estudiado, θ_p (y θ_q) es el ángulo entre el eje p (o q) del cuerpo y la dirección del campo magnético, δ_{pq} es una delta de Kronecker, que se evalúa 1 cuando $p = q$ y 0 cuando $p \neq q$. Los paréntesis angulares ($\langle \rangle$) denotan un promedio de todas las posibles orientaciones del conjunto en el tiempo.

En resumen, y comparando señales provenientes de moléculas con orientación similar, como ocurre en bicapas, mientras mayor anisotropía tenga el movimiento del enlace carbono-deuterio, habrá un mayor desdoblamiento de su señal. Este desdoblamiento tiene directa relación con los parámetros de orden, los que en un cálculo de dinámica molecular se pueden reproducir; de esta manera, si los parámetros de orden de la simulación coinciden con los experimentales, será posible establecer que el modelo propuesto reproduce adecuadamente la dinámica de la bicapa, permitiendo desvelar información adicional del sistema con confiabilidad. Bajo esta premisa, se simuló el mimético de membrana y el péptido TP1 empleando dinámica molecular. La simulación fue ajustada de manera que esta reprodujo desdoblamientos cuadrupolares de sondas deuteradas en el mimético, medidos empleando ^2H -RMN, y de este modo, se validó la simulación en dinámica molecular.

1.3. Dinámica molecular

La dinámica molecular (MD por sus siglas en inglés) es una técnica computacional en la que se resuelven las ecuaciones de movimiento mecano-clásicas para un grupo de moléculas. Introducido por primera vez en los años 1950s como una alternativa a las, en ese entonces exitosas, simulaciones Monte-Carlo³⁷, y utilizado por primera vez para la simulación de biomoléculas en el año 1975, en el que el equipo de investigación de Martin Karplus logró simular la proteína BPTI³⁸. A pesar de haber realizado una simulación en vacío y por sólo 9.2 ps, esta simulación fue instrumental en reemplazar la percepción de proteínas rígidas, abriendo las puertas a la comprensión de las proteínas (y otras biomoléculas) como estructuras dinámicas, en el que los movimientos internos juegan un papel crucial en el rol de las proteínas. El impacto de esta nueva manera de observar las biomoléculas fue tal, que Karplus fue galardonado con un Premio Nobel de química el año 2013 por sus aportes a las simulaciones de biomoléculas.

Actualmente, una simulación en dinámica molecular puede proveer información en detalle atómico acerca del movimiento de las partículas en función del tiempo. Y esta información se puede utilizar para interpretar fenómenos incluso con mayor facilidad que con métodos experimentales. No obstante, los métodos de simulación no son un reemplazo al experimento, dado que los resultados experimentales juegan un papel crucial en la validación de los métodos de simulación. Esto es especialmente importante cuando se considera que la gran mayoría de los potenciales utilizados en dinámica molecular son ajustados con parámetros empíricos, y actualmente no se puede cuantificar el error introducido en la utilización de tales potenciales³⁹

Desde la interpretación de tiempos de relajación (T_1 y T_2) y cálculos del efecto

Overhauser nuclear (NOE) mediante dinámica molecular⁴⁰ es que la espectroscopía RMN se ha vuelto uno de los métodos experimentales más utilizados para validar resultados de simulación.

La dinámica molecular ignora todo tipo de interacciones de nivel cuántico, ya que aproxima cada átomo a una partícula de masa puntual con campos de fuerza clásicos asociados, sin incluir electrones explícitamente. No obstante, esta aproximación permite modelar sistemas de relativamente gran escala, pudiendo alcanzar cientos de nanómetros cúbicos durante incluso microsegundos. Un cálculo de dinámica molecular comienza con la segunda ley de Newton (eq. 4).

$$\vec{F}_i = m_i \frac{\delta^2 \vec{r}_i}{\delta t^2} \quad (4)$$

Si se conoce la fuerza neta \vec{F}_i que actúa sobre un átomo i , su posición \vec{r}_i y velocidad \vec{v}_i en un instante t , se puede conocer la posición que tendrá el átomo al transcurrir un tiempo Δt si se integra la ecuación (4). Existen múltiples métodos numéricos para implementar computacionalmente dicha integración, para motivos de este proyecto, se ha elegido el método *Leap-Frog*⁴¹ dado que minimiza la pérdida de precisión en simulaciones largas, manteniendo un buen desempeño computacional.

En un cálculo de dinámica molecular, las fuerzas que actúan sobre cada átomo pueden ser de dos tipos: enlazantes y no-enlazantes. Las no-enlazantes corresponden en parte a interacciones de Van der Waals, implementadas generalmente mediante un potencial de Lennard-Jones (eq. 5)

$$V_{LJ} = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (5)$$

cuyos parámetros (ϵ y σ) dependen del par de átomos que interactúan y del campo de

fuerza que se desee usar. Las interacciones no-enlazantes incluyen también las fuerzas de Coulomb, calculadas usando la distribución de cargas parciales de la molécula y la ley de Coulomb (eq. 6).

$$V_C = k_e \frac{q_1 q_2}{r} \quad (6)$$

Por otro lado, las fuerzas enlazantes asociadas al estiramiento de los enlaces, son calculadas comúnmente con un potencial armónico (eq. 7) cuyos parámetros k y la distancia de equilibrio r_0 dependen del campo de fuerza a elección.

$$V_E = \frac{1}{2} k (r - r_0)^2 \quad (7)$$

Un potencial similar es utilizado para calcular fuerzas de *bending* o ángulos de enlace (eq. 8), donde k_θ es definido por los sustituyentes en torno al enlace central y el campo de fuerza.

$$V_A = \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (8)$$

Para calcular interacciones de torsión de ángulos dihedros, se utilizan series de *Fourier* (eq. 9), donde los valores A_n son definidos por el campo de fuerza y los grupos involucrados.

$$V_{tors} = \sum_n \frac{1}{2} A_n (1 + \cos(n\tau + \tau_0)) \quad (9)$$

Finalmente, las deformaciones fuera del plano o torsiones impropias, características de enlaces sp^2 , son tratadas con un potencial armónico (eq. 10), donde se define un ángulo χ (ver figura 7) que describe tales deformaciones.

$$V_{oop} = \frac{1}{2} k_{oop} \chi^2 \quad (10)$$

Tal como se adelantó, el campo de fuerza determina las constantes de las ecuaciones

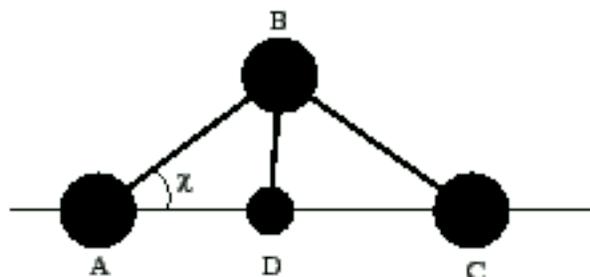


Figura 7: Definición del ángulo χ fuera del plano.

ya descritas y la distribución de las cargas parciales de las moléculas en el sistema. Existen múltiples campos de fuerza, cada uno parametrizado para reproducir diferentes propiedades experimentales. Al momento de escribir, los campos de fuerza que mejor reproducen la formación de estructuras macromoleculares a partir de SDS son *CHARMM*⁴² y *Gromos54A6*^{43,44}. Se busca reproducir los resultados espectroscópicos obtenidos por ²H-RMN, así será posible obtener información a nivel atómico del mismo sistema con mayor confiabilidad.

1.4. Síntesis de péptidos

En términos de complejidad y tamaño, los péptidos se encuentran entre las moléculas pequeñas y las proteínas. Al igual que estas últimas, los péptidos tienen una estructura modular, compuesto por cadenas de aminoácidos enlazados mediante el llamado *enlace peptídico*. El tamaño de un péptido tiene un límite arbitrario, la FDA establece tal límite en 100 aminoácidos, sobre este límite la biomolécula resultante se considerará una proteína.

El uso de péptidos como soluciones farmacéuticas no es nuevo, durante la primera guerra mundial se masificó el uso de morfina, un péptido cíclico, para tratar a heridos de batalla. Pocos años después se aislaría por primera vez la oxitocina, otro pépti-

do cíclico, actualmente utilizado ampliamente para inducir el parto y recientemente como anti-depresivo⁴⁵. No obstante, el uso de péptidos como fármacos fue pronto supeditado por el uso de moléculas pequeñas, ya que no solo los costos de la síntesis de péptidos serían mucho más altos que sintetizar una molécula pequeña, sino que además la enorme cantidad de proteasas en el sistema digestivo hace casi imposible el desarrollo de fármacos peptídicos para administrar vía oral.

Durante los últimos años el escenario ha hecho cambiar la perspectiva respecto a los fármacos peptídicos. Las cada vez más rigurosas regulaciones a la industria farmacéutica han hecho que la eficiencia de la industria descienda considerablemente; actualmente más del 90 % de los candidatos a fármaco son rechazados durante ensayos clínicos antes de llegar al mercado, la mayoría siendo rechazado por su toxicidad o falta de eficacia⁴⁶. Por lo que se hace necesario que la industria farmacéutica busque nuevas estrategias, presentándose nuevamente el desarrollo de fármacos peptídicos como una alternativa viable.

Actualmente, el costo monetario ha dejado de ser una limitante en la producción de fármacos peptídicos. Desde la primera síntesis química de un péptido en 1953⁴⁷ se ha progresado vastamente en nuevos métodos y tecnologías para la síntesis de péptidos, tales como síntesis enzimática⁴⁸, sistemas de expresión acelulares⁴⁹, producción en plantas transgénicas⁵⁰ y las más populares: biosíntesis mediante ADN recombinante⁵¹ y síntesis química en estado sólido⁵².

En general, el tamaño del péptido determina la tecnología más apropiada para su producción: para péptidos pequeños y medianos, hasta 80 residuos, resulta eficiente una síntesis química en estado sólido. Mientras que para péptidos grandes, como la insulina, se prefiere el uso de ADN recombinante.

Para propósitos de la investigación detallada en el presente documento, se ha seleccionado la síntesis química en estado sólido como el método más apropiado. Ésto no solo por el tamaño del péptido que se desea sintetizar (12-13 residuos), sino que además por una importante limitación del método de ADN recombinante: sólo se pueden sintetizar péptidos con aminoácidos que un codón pueda codificar. Este no es el caso para el método de síntesis química, en el que hay completa libertad para incluir aminoácidos sintéticos, incluso isómeros *dextro*, y como será en el caso presente, es posible marcar selectivamente aminoácidos con isótopos de sus átomos componentes.

En la síntesis química de péptidos, para evitar reacciones en las cadenas laterales y otras reacciones indeseadas se emplean aminoácidos protegidos como punto de partida.

Actualmente, existen dos principales estrategias para proteger el grupo amino y las cadenas laterales: *t-Boc* y *Fmoc*. En la estrategia *t-Boc* se protege el grupo amino de cada aminoácido con el grupo *ter-butiloxycarbonil* y cada cadena lateral con grupos bencilos. En esta estrategia se emplea ácido trifluoroacético para remover el grupo protector del grupo amino, y se emplea ácido fluorhídrico para el clivaje y para remover los grupos protectores de las cadenas laterales. La principal desventaja de ésta estrategia es que al emplear un ácido altamente reactivo como es el ácido fluorhídrico se corre el riesgo que ocurran reacciones indeseadas en el péptido, como acilaciones o alquilaciones.

La segunda estrategia, y la que se empleó en la investigación que el presente documento detalla, corresponde al uso del grupo *fluorenilmetoxicarbonil* (*Fmoc*) para proteger cada grupo amino, y al uso de grupos *terbutil* para proteger las cadenas laterales. La principal ventaja de esta estrategia es que para remover los grupos protectores del amino y las cadenas laterales se requieren condiciones químicas opuestas:

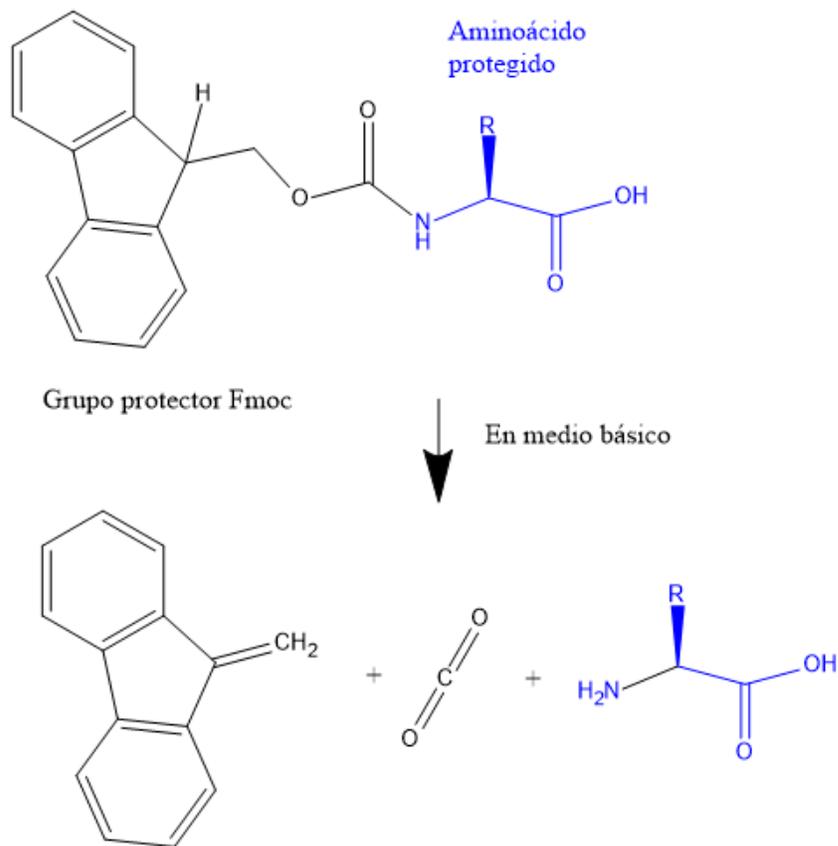


Figura 8: Reacción de desprotección de aminoácido protegido con Fmoc

se emplea una base para remover el grupo Fmoc (normalmente piperidina) y un ácido para remover los protectores de las cadenas laterales (normalmente TFA).

El proceso de síntesis de péptidos en fase sólida comienza con el acople del aminoácido C-terminal de la secuencia sobre una resina sólida. Ésta resina sólida posee grupos amino capaces de formar un enlace peptídico con el aminoácido que se desea acoplar. Vale recordar, que el aminoácido añadido en cada acople se encuentra con su grupo amino y cadena lateral con grupos protectores, por lo tanto sólo es posible la reacción entre el carbonilo del aminoácido añadido y el grupo amino de la resina. Dado que la formación de un enlace amida no ocurre espontáneamente a temperatura

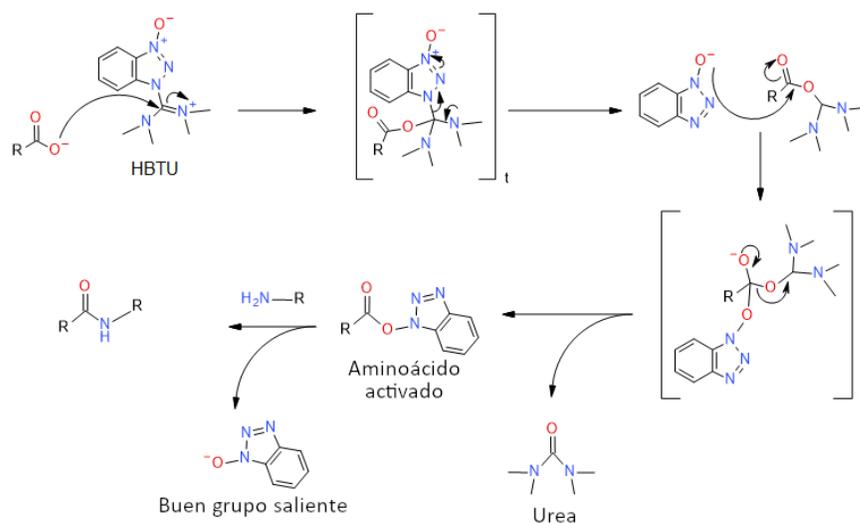


Figura 9: Mecanismo de activación de un aminoácido con HBTU.

ambiente, y elevar la temperatura normalmente es detrimental para la estabilidad de las cadenas laterales, se recurre a compuestos activadores que transforman el $-OH$ en un buen grupo saliente⁵³ (ver figura 9). Es por esto que cada uno de los acoples, ya sea a la resina o al péptido adherido a la resina, va asistido con un activador (e.g.: HBTU).

Tras haber corroborado que la reacción de formación del enlace amida haya finalizado mediante un ensayo con ninhidrina, se remueven los grupos protectores de los grupos amino empleando piperidina o ácido trifluoroacético (TFA) dependiendo del grupo protector, para luego comenzar con otro proceso de acoplamiento.

Luego de acoplar el último aminoácido al péptido que se desea sintetizar, se debe clivar el péptido de la resina empleando ácido trifluoroacético o ácido fluorhídrico dependiendo de los grupos protectores de las cadenas laterales.

Finalmente, el péptido obtenido es sometido a espectroscopía 2H -RMN y de masas, para corroborar que se haya obtenido el producto deseado, para luego purificar el producto obtenido mediante cromatografía en fase inversa.

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

La investigación que este proyecto propone, buscará probar (o refutar) la siguiente **hipótesis**:

- El CPP TP1, compuesto por los aminoácidos PLILLRLLRGQFC, es capaz de incorporarse, vía difusión pasiva, a un mimético de membrana diseñado para imitar la permeabilidad de la membrana celular, el que se sugiere como mecanismo principal de ingreso a la célula.

2.2. Objetivos generales

Para aquello, se establecerán los siguientes **objetivos generales**:

- Desarrollar un mimético de membrana, en base al detergente SDS, con la más alta concentración de fosfolípido natural y buena resolución en espectros ^2H -RMN.
- Explorar el mecanismo de ingreso, dinámica orientacional, interacciones y posicionamiento a nivel molecular del péptido TP1 al ingresar la bicapa de un mimético de membrana celular, empleando desdoblamiento cuadrupolares y tiempos de relajación experimentales, complementado con simulaciones empleando dinámica molecular.

2.3. Objetivos específicos

Los **objetivos específicos** que guiarán la investigación se listan a continuación:

- Buscar una formulación del mimético de membrana del tipo bicapa a base de SDS, que posea la máxima concentración de fosfolípido natural, manteniendo una buena resolución en espectros ^2H -RMN.
- Caracterizar el nuevo mimético mediante microscopía de luz polarizada y ^2H -RMN.
- Probar, mediante la inclusión de exógenos documentados, que la nueva formulación se comporta similar a la membrana celular.
- Estudiar las posibles alteraciones que pueda sufrir el mimético ante la adición del péptido TP1, empleando desdoblamientos cuadrupolares y tiempos de relajación longitudinal en ^2H -RMN.
- Estudiar la dinámica orientacional del péptido TP1 dentro del mimético mediante la inclusión selectiva de aminoácidos deuterados en el péptido, para su posterior estudio por ^2H -RMN.
- Simular los sistemas estudiados experimentalmente con cálculos de dinámica molecular que reproduzcan resultados espectroscópicos.
- Aplicar la técnica de simulación *Umbrella Sampling*/WHAM para la obtención de un perfil de energía libre, y detalles de las interacciones durante el proceso de inserción del péptido y el mecanismo de translocación.
- Analizar, discutir, interpretar y difundir los resultados obtenidos.

Referencias

- [1] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug dis-

- covery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 3–26.
- [2] Longmuir, K. J.; Haynes, S. M.; Baratta, J. L.; Kasabwalla, N.; Robertson, R. T. Liposomal delivery of doxorubicin to hepatocytes in vivo by targeting heparan sulfate. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *382*, 222–233.
- [3] Gerlach, S. L.; Rathinakumar, R.; Chakravarty, G.; Göransson, U.; Wimley, W. C.; Darwin, S. P.; Mondal, D. Anticancer and chemosensitizing abilities of cycloviolacin O2 from *Viola odorata* and psyle cyclotides from *Psychotria leptothyrsa*. *Biopolymers* **2010**, *94*, 617–625.
- [4] Bayley, H.; Jayasinghe, L. Functional engineered channels and pores (Review). *Molecular Membrane Biology* **2004**, *21*, 209–220.
- [5] Dong, M.; Phan, A. T.; Yao, J. C. New Strategies for Advanced Neuroendocrine Tumors in the Era of Targeted Therapy. *Clinical Cancer Research* **2012**, *18*.
- [6] Fazio, N.; Cinieri, S.; Lorizzo, K.; Squadroni, M.; Orlando, L.; Spada, F.; Maieullo, E.; Bodei, L.; Paganelli, G.; Delle Fave, G.; de Braud, F. Biological targeted therapies in patients with advanced enteropancreatic neuroendocrine carcinomas. *Cancer Treatment Reviews* **2010**, *36*, S87–S94.
- [7] Frankel, A. D.; Pabo, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **1988**, *55*, 1189–1193.
- [8] Green, M.; Loewenstein, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **1988**, *55*, 1179–1188.

- [9] Vivès, E.; Granier, C.; Prevot, P.; Lebleu, B. Structure–activity relationship study of the plasma membrane translocating potential of a short peptide from HIV-1 Tat protein. *Letters in Peptide Science* **1997**, *4*, 429–436.
- [10] Martín, I.; Teixidó, M.; Giralt, E. Design, Synthesis and Characterization of a New Anionic Cell-Penetrating Peptide: SAP(E). *ChemBioChem* **2011**, *12*, 896–903.
- [11] Richard, J. P.; Melikov, K.; Vives, E.; Ramos, C.; Verbeure, B.; Gait, M. J.; Chernomordik, L. V.; Lebleu, B. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278*, 585–90.
- [12] Brock, R. The Uptake of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides: Putting the Puzzle Together. *Bioconjugate Chemistry* **2014**, *25*, 863–868.
- [13] Richard, J. P.; Melikov, K.; Brooks, H.; Prevot, P.; Lebleu, B.; Chernomordik, L. V. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280*, 15300–6.
- [14] Tünnemann, G.; Martin, R. M.; Haupt, S.; Patsch, C.; Edenhofer, F.; Cardoso, M. C. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2006**, *20*, 1775–84.
- [15] Tünnemann, G.; Ter-Avetisyan, G.; Martin, R. M.; Stöckl, M.; Herrmann, A.; Cardoso, M. C. Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *Journal of Peptide Science* **2008**, *14*, 469–476.

- [16] Aliaga, A. E.; Ahumada, H.; Sepúlveda, K.; Gomez-Jeria, J. S.; Garrido, C.; Weiss-López, B. E.; Campos-Vallette, M. M. SERS, Molecular Dynamics and Molecular Orbital Studies of the MRKDV Peptide on Silver and Membrane Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 3982–3989.
- [17] Hristova, K.; Wimley, W. C. A Look at Arginine in Membranes. *The Journal of Membrane Biology* **2011**, *239*, 49–56.
- [18] Saly Al-Taei,; Neal A. Penning,; Jeremy C. Simpson,; Shiroh Futaki,; Toshihide Takeuchi,; Ikuhiko Nakase,; Arwyn T. Jones, Intracellular Traffic and Fate of Protein Transduction Domains HIV-1 TAT Peptide and Octaarginine. Implications for Their Utilization as Drug Delivery Vectors. **2005**,
- [19] Maiolo, J. R.; Ferrer, M.; Ottinger, E. A. Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2005**, *1712*, 161–172.
- [20] Derek S. Youngblood,; Susie A. Hatlevig,; Jed N. Hassinger,; ; Patrick L. Iversen,; Moulton*, H. M. Stability of Cell-Penetrating Peptide-Morpholino Oligomer Conjugates in Human Serum and in Cells. **2006**,
- [21] Ruan, G.; Agrawal, A.; Marcus, A. I.; Nie, S. Imaging and Tracking of Tat Peptide-Conjugated Quantum Dots in Living Cells: New Insights into Nanoparticle Uptake, Intracellular Transport, and Vesicle Shedding. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 14759–14766, PMID: 17983227.
- [22] El-Sayed, A.; Futaki, S.; Harashima, H. Delivery of Macromolecules Using Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides: Ways to Overcome Endosomal Entrapment. *The AAPS Journal* **2009**, *11*, 13–22.

- [23] Kumar, S.; Sahdev, P.; Perumal, O.; Tummala, H. Identification of a novel skin penetration enhancement peptide by phage display peptide library screening. *Molecular Pharmaceutics* **2012**, *9*, 1320–1330.
- [24] Marks, J. R.; Placone, J.; Hristova, K.; Wimley, W. C. Spontaneous membrane-translocating peptides by orthogonal high-throughput screening. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 8995–9004.
- [25] Montecinos, R.; Ahumada, H.; Araya-Maturana, R.; Olea, A. F.; Weiss-López, B. E. Counterion and composition effects on discotic nematic lyotropic liquid crystals: I. Size and order. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *316*, 126–131.
- [26] Lawson, K. D.; Flautt, T. J. Magnetically Oriented Lyotropic Liquid Crystalline Phases. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89*, 5489–5491.
- [27] Amaral, L. Q.; Pimentel, C. A.; Tavares, M. R.; Vanin, J. A. Study of a magnetically oriented lyotropic mesophase. *The Journal of Chemical Physics* **1979**, *71*, 2940.
- [28] Sanders, C. R.; Prestegard, J. H. Magnetically orientable phospholipid bilayers containing small amounts of a bile salt analogue, CHAPSO. *Biophysical Journal* **1990**, *58*, 447–460.
- [29] Sanders, C. R.; Schwonek, J. P. Characterization of Magnetically Orientable Bilayers in Mixtures of Dihexanoylphosphatidylcholine and Dimyristoylphosphatidylcholine by Solid-State NMR. *Biochemistry* **1992**, *31*, 8898–8905.
- [30] Park, S. H.; Opella, S. J. Triton X-100 as the 'short-chain lipid' improves the magnetic alignment and stability of membrane proteins in phosphatidylcholine

- bilayers for oriented-sample solid-state NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 12552–12553.
- [31] Shapiro, R. A.; Brindley, A. J.; Martin, R. W. Thermal stabilization of DMPC/DHPC bicelles by addition of cholesterol sulfate. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 11406–11407.
- [32] Bahamonde-Padilla, V. E.; Espinoza, J.; Weiss-López, B. E.; López Cascales, J. J.; Montecinos, R.; Araya-Maturana, R. Effect of lithium on the properties of a liquid crystal formed by sodium dodecylsulphate and decanol in aqueous solution. *Journal of Chemical Physics* **2013**, *139*, 014703.
- [33] Gilbert, D. L.; Ehrenstein, G. *Membrane Surface Charge*; 1984; pp 407–421.
- [34] Levine, S. G. A Short History of the Chemical Shift. *Journal of Chemical Education* **2001**, *78*, 133.
- [35] Dickinson, W. C. Dependence of the F19 nuclear resonance position on chemical compound. *American Physical Society* **1950**, *77*, 736–737.
- [36] Liermann, J. C.; Schlörer, N. E. Data handling in NMR facilities and assignment of NMR spectra in synthetic chemistry labs: Why electronic structure validation should become part of the routine. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2018**, *56*, 513–519.
- [37] Fermi, E.; Pasta, J.; Ulam, S. Studies of non-linear problems (LA-1940). *Los Alamos National Lab* **1955**,
- [38] McCammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M. Dynamics of folded proteins. *Nature* **1977**, *267*, 585–590.

- [39] Karplus, M.; McCammon, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. 2002; <http://www.nature.com/naturestructuralbiology>.
- [40] Clore, G. M.; Nilges, M.; Sukumaran, D. K.; Brünger, A. T.; Karplus, M.; Gronenborn, A. M. The three-dimensional structure of α 1-purothionin in solution: combined use of nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics. *The EMBO Journal* **1986**, *5*, 2729–2735.
- [41] Hockney, R.W., POTENTIAL CALCULATION AND SOME APPLICATIONS. *Methods Comput. Phys.* *9*: 135-211(1970). **1970**,
- [42] Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; Mackerell, A. D. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *31*, NA–NA.
- [43] Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; Van Gunsteren, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1656–1676.
- [44] Tang, X.; Koenig, P. H.; Larson, R. G. Molecular dynamics simulations of sodium dodecyl sulfate micelles in water-the effect of the force field. *The journal of physical chemistry. B* **2014**, *118*, 3864–80.
- [45] Matsuzaki, M.; Matsushita, H.; Tomizawa, K.; Matsui, H. Oxytocin: A therapeutic target for mental disorders. 2012; <https://jps.biomedcentral.com/articles/10.1007/s12576-012-0232-9>.

- [46] Kola, I.; Landis, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, *3*, 711–715.
- [47] du Vigneaud, V.; Ressler, C.; Swan, J. M.; Roberts, C. W.; Katsoyannis, P. G. The Synthesis of Oxytocin. *Journal of the American Chemical Society* **1954**, *76*, 3115–3121.
- [48] Feliu, J. A.; de Mas, C.; López-Santín, J. Studies on papain action in the synthesis of Gly-Phe in two-liquid-phase media. *Enzyme and Microbial Technology* **1995**, *17*, 882–887.
- [49] Katzen, F.; Chang, G.; Kudlicki, W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. 2005.
- [50] Cunningham, C.; Porter, A. J. *Recombinant proteins from plants: production and isolation of clinically useful compounds*; Springer Science & Business Media, 1998; Vol. 3.
- [51] Gill, I.; López-Fandiño, R.; Jorba, X.; Vulfson, E. N. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. 1996; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8820131/>.
- [52] Merrifield, B. Solid phase synthesis. *Science* **1986**, *232*, 341–347.
- [53] Valeur, E.; Bradley, M. Amide bond formation: Beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 606–631.

3. Metodología

3.1. Formulación del nuevo mimético de membrana

3.1.1. Primera maximización de fosfolípido en el mimético

Los reactivos dodecil sulfato de sodio (SDS), dodecil sulfato de sodio deuterado (SDS-d₂₅), sulfato de sodio (Na₂SO₄) y el fosfolípido extraído del poroto de soja fueron adquiridos de *Sigma Aldrich*. El decanol (DeOH), agua deuterada (D₂O) y agua de grado cromatográfico fueron adquiridos de *Merck*. A excepción del sulfato de sodio, los reactivos fueron utilizados sin modificaciones, el sulfato de sodio fue secado en horno 24 horas antes de su utilización.

El decanol deuterado (DeOH- α -d₂) fue sintetizado reduciendo decanoato de etilo (C₁₂H₂₄O₂) con deuteruro de litio y aluminio (LiAlD₄) y purificado mediante destilación fraccionada en vacío.

Según la información suministrada por *Sigma-Aldrich*, el contenido de ácidos grasos en el fosfolípido hidrolizado extraído del poroto de soja es:

Ácido graso	Contenido
Ác. Palmítico	17 %
Ác. Esteárico	4 %
Ác. Oléico	9 %
Ác. Linoléico	60 %
Ác. Linolénico	7 %
Otros	3 %

Tabla 1: Contenido de ácidos grasos en el fosfolípido extraído del poroto de soja e hidrolizado, suministrado por Sigma-Aldrich. Porcentajes en masa.

El fosfolípido empleado contiene en su mayoría fosfoglicéridos, siendo un 63 % fosfatidilcolina y un 32 % fosfatidiletanolamina, el 5 % remanente corresponde a residuos de carbohidratos y otros lípidos, según lo informado por Sigma-Aldrich.

Se comenzó con la formulación de Bahamondes *et al.*¹, cuya composición posee dodecil sulfato de sodio (SDS), 1-decanol (DeOH), sulfato de sodio (Na₂SO₄) y agua (H₂O), con las proporciones expuestas en la tabla 2.

Materia prima	Contenido
SDS	31.60 %
Na ₂ SO ₄	2.85 %
DeOH	5.40 %
Agua	60.31 %

Tabla 2: Composición de un mimético de membrana aniónico basado en dodecil sulfato de sodio, preparación de Bahamondes *et al.*. Porcentajes en masa.

Cada muestra de cristal líquido se preparó mezclando todos los componentes necesarios para preparar ~ 1.00 g de muestra en un tubo de ensayo de 5 mL. Luego de combinar todos los componentes en el tubo, éste se dejó en un agitador rotatorio lento (~ 20 rpm) durante al menos 48 horas a 40 °C.

Para controlar que los componentes que no son el fosfolípido no cambien significativamente entre cada preparación, cada muestra sin fosfolípido se preparó masando cada ingrediente en balanza analítica, para luego calcular una divergencia entre la muestra preparada y la composición original (Tabla 2).

$$\text{Divergencia} = \sum_i^n |\%_i - \%_i^*| \quad (11)$$

Donde $\%_i$ corresponde al porcentaje en peso del componente i , y $\%_i^*$ corresponde al porcentaje en peso del componente i de la composición original. Utilizando este parámetro, se rechazaron todas las muestras con divergencias superiores al 1 %.

La maximización de la concentración de fosfolípido se realizó añadiendo progresivamente masas de éste a la composición total, comenzando desde un 0% en masa de fosfolípido, e incrementándola hasta hacer inviable la formación de un cristal líquido nemático. Tras la preparación de cada muestra, su condición de cristal líquido fue evaluada *in situ* usando microscopía de luz polarizada, para luego confirmar las observaciones de la microscopía con espectros ^2H -RMN.

El mimético de membrana obtenido de éste procedimiento fue posteriormente utilizado para calibrar parámetros en los cálculos de dinámica molecular.

3.1.2. Segunda maximización de fosfolípido en el mimético

Tras maximizar el contenido de fosfolípido sumando cantidades de éste a la composición original, se comenzó una segunda etapa de maximización, en la que se buscaba incrementar la proporción de fosfolípido disminuyendo la cantidad de SDS en la composición.

Materia prima	Contenido
SDS	24.97 %
Na_2SO_4	1.46 %
DeOH	3.91 %
Fosfolípido	22.00 %
Agua	47.65 %

Tabla 3: Formulación de mimético de membrana según resultados de una primera maximización en el contenido de fosfolípido.

Éste procedimiento se efectuó reduciendo sucesivamente el contenido de SDS y en cada sucesión se maximizó nuevamente el contenido de fosfolípido hasta la inviabilidad de un cristal líquido nemático.

3.1.3. Inclusión del tampón en el mimético

Tras optimizar la concentración de fosfolípido en la formulación, el siguiente paso fue incluir una concentración de tampón de fosfato a pH 7.4. El ácido fosfórico y el fosfato de sodio dibásico utilizados para la preparación del tampón fueron adquiridos de *Merck* y *Sigma Aldrich* respectivamente, y fueron utilizados sin modificaciones. Se fabricó una batería de miméticos de membrana con diferentes concentraciones de tampón, preparado con ácido fosfórico y fosfato de sodio dibásico, en un rango de concentraciones desde 1×10^{-3} M hasta 1.0 M. De todos los miméticos fabricados en este paso, se eligió el de mayor concentración de tampón que cumpliera con las siguientes condiciones:

- La fase produce patrones de cristal líquido nemático en microscopías de luz polarizada.
- El espectro ^2H -RMN de la fase muestra un desdoblamiento cuadrupolar en su señal de agua.

3.1.4. Verificación del funcionamiento como mimético

Con el fin de verificar que el mimético formulado se comporta de manera similar a la membrana celular, como control positivo se probó la inserción del anestésico local: benzocaína, el que se sabe es capaz de entrar pasivamente al citosol². Además se usó L-Dopa como control negativo, ya que se sabe que éste atraviesa la membrana mediante mecanismos activos³, no disponibles para un mimético de membrana.

Si bien, el método definitivo para revelar si el control ingresa a la trans-membrana es mediante ^2H -RMN del control deuterado, para los controles positivos se realizaron pruebas preliminares con sondas deuteradas en el lípido de la bicapa. Estas pruebas

preliminares se efectuaron añadiendo la benzocaína en muestras de mimético preparado con tampón de fosfato neutro en concentración 0.1 M, a cada muestra se añadió 38 μmol de anestésico y se dejó en agitación rotatoria por 72 horas a 20 rpm.

Tras finalizar la agitación, se verificó que la fase se haya mantenido como cristal líquido mediante microscopía de luz polarizada, y se tomaron espectros ^2H -RMN de cada muestra para comparar con resultados de espectros de muestras blancas (sin anestésicos).

3.2. Síntesis del péptido TP1

La elaboración de cada péptido se realizó mediante *síntesis química en fase sólida*, que consiste en acoplar aminoácidos (protegidos ortogonalmente en su grupo amino y cadena lateral) a una resina sólida, formando un enlace amida entre el grupo carboxilo del aminoácido con un grupo amida ligado al soporte. Posteriormente se desproteje el grupo carboxilo del aminoácido recientemente acoplado y se acopla el siguiente aminoácido en la secuencia, éste proceso se repite hasta completar el péptido, para finalizar con un proceso de clivaje en el que se separa el péptido de la resina y se desprotejen sus cadenas laterales.

Para la síntesis del péptido TP1 y sus variaciones se utilizó una resina *rink* protegida con cloruro de fluorenil-metoxycarbonilo (Fmoc) con capacidad de carga 0.4 mmol g^{-1} , y aminoácidos protegidos con Fmoc en su grupo α -amino. Éstos adquiridos de *Iris Biotech*. Los aminoácidos deuterados protegidos con Fmoc fueron adquiridos de *Sigma-Aldrich*

En cada acoplamiento se utilizó N,N-Diisopropiletilamina (DIEA) como base para deprotonar el carboxilo y Hexafluorofosfato de benzotriazol-tetrametil-uronio (HBTU) para activar la reactividad del grupo carboxilato. Se repitió entre dos y cuatro

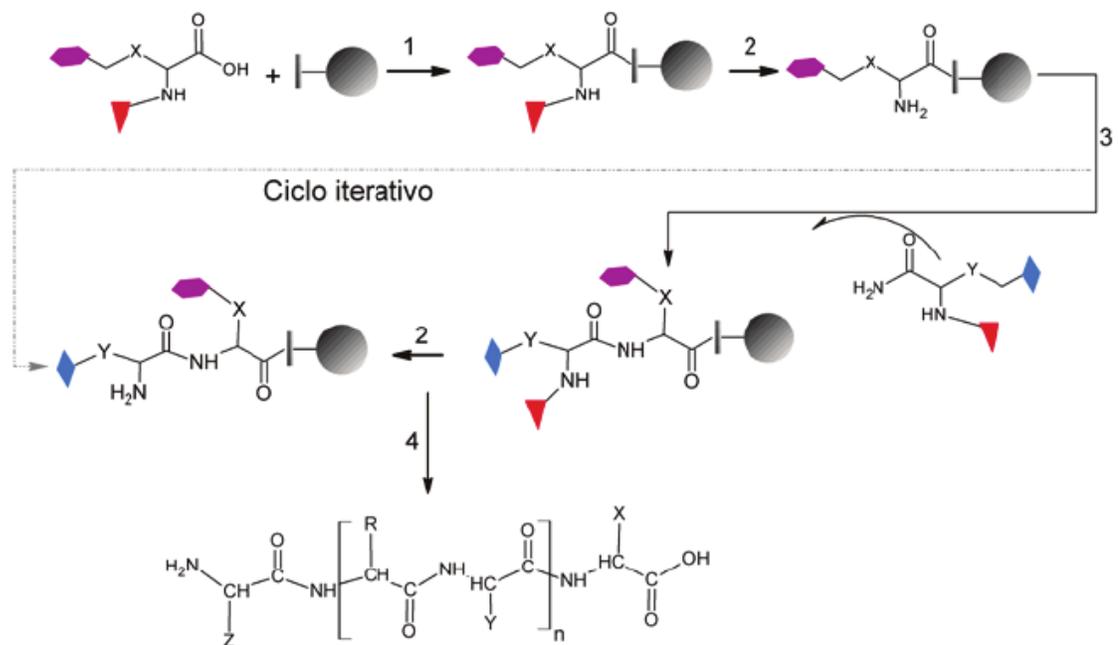


Figura 10: Esquema de síntesis de péptidos en fase sólida. ○: resina, △: grupo protector α -amino, ◇○: grupos protectores de cadena lateral. **1:** Acoplamiento del primer aminoácido, **2:** Desprotección, **3:** Acoplamiento del siguiente aminoácido, **4:** Clivaje y desprotección de cadenas laterales.

veces el acoplamiento de cada aminoácido, y se verificó la totalidad del acoplamiento mediante un ensayo de ninhidrina. Este último reacciona con grupos aminos del aminoácido para formar una base de Schiff de color violeta intenso, por lo tanto, en el contexto de la síntesis de péptidos, éste tornará la resina de color violeta sólo si quedan grupos aminos sin acoplar.

Al completar la totalidad de los acoplamientos, se clivó el péptido y se desprotegeron sus cadenas laterales añadiendo ácido trifluoroacético, para luego precipitar el péptido con éter frío (a $\sim -80^\circ\text{C}$) y purificarlo mediante cromatografía en fase inversa.

Se verificó el éxito de la síntesis mediante espectroscopía de masas de ionización

de electrospray (ESI-MS), y dicroísmo circular para revelar características de la estructura secundaria del péptido.

3.3. Estudio preliminar de posicionamiento del péptido en el mimético nuevo

Una muestra de péptido TP1, compuesto por los amino-ácidos PLILLRLLRGQFC, fue adquirido de Genscript con pureza >95 %

Una vez adquirido el péptido, se realizó la prueba de añadir 6 mg del péptido a 1.0 mL del tampón neutro de fosfato 0.10 M, obteniendo una acidificación de la muestra hasta pH 4. Esto es evidencia de la presencia de ácido trifluoroacético (TFA) en el péptido. Para contrarrestar los efectos de ácido, se decidió añadir fosfato de sodio di-básico en concentraciones equi-molares al péptido a la muestra. Tras añadir dos equivalentes de fosfato de sodio, el pH de la muestra ascendió a pH 6. Dado que existía el precedente de la formación de cristal líquido usando componentes líquidos a pH 6, se procedió a fabricar un mimético de membrana con la nueva composición, más 3.2 mg de péptido TP1 y dos equivalentes en cantidad de fosfato de sodio di-básico.

Si bien, se logró obtener un cristal líquido añadiendo 3.2 mg de péptido, ésta cantidad es insuficiente si se desea obtener señales en ^2H -RMN del péptido deuterado. Por esta razón, el siguiente paso debe ser una purificación del péptido TP1 para minimizar su contenido de TFA, y poder maximizar el contenido de péptido en la membrana.

Tras la purificación exitosa del péptido, se logró concentrar una masa de 17 mg de péptido por gramo de mimético, esto sin necesidad de añadir una solución tampón a la formulación. Ésta concentración es suficiente para obtener señales en un espectro ^2H -RMN del péptido deuterado.

3.4. Cálculos de dinámica molecular

3.4.1. Selección del campo de fuerza

Al momento de iniciar el proceso investigativo, existen tres campos de fuerza especializados para la simulación de lípidos: CHARMM36, Berger y Gromos 53A6.⁴⁻⁶ Para decidir cual de las tres opciones usar para el resto de la investigación, se simuló una bicapa lipídica con las mismas concentraciones obtenidas de la primera maximización de fosfolípido (Sección 3.1.1, pag. 31), para posteriormente ser comparados con resultados experimentales.

Todos los cálculos de dinámica molecular fueron realizados utilizando el paquete de programas *GROMACS* 2016. La configuración inicial para la membrana simulada fue construida utilizando el software *Packmol*⁷, con el cual se generó una configuración de bicapa, con ambas monocapas de igual composición, centrado en un espacio de 8.15x8.15x9.00 nm³ (figura 11). La composición de la bicapa es expuesta en la tabla 4

Compuesto	Cantidad de moléculas
Dodecil sulfato de sodio	232
1-Decanol	66
Sulfato de sodio	28
Palmitoil-linoleoil-fosfatidilcolina	30
Dilinoleoil-fosfatidilcolina	20
Dilinoleoil-fosfatidiletanolamina	18
Dioleoil-fosfatidiletanolamina	8

Tabla 4: Composición de un mimético de membrana simulado, a base de dodecil sulfato de sodio con alto contenido de fosfolípido.

En los espacios vacíos de la configuración expuesta en la figura 11, se añadieron 28 iones sulfato en concordancia con la concentración experimental, 286 iones sodio para neutralizar el sistema, y 8926 moléculas de agua, siendo estas las suficientes

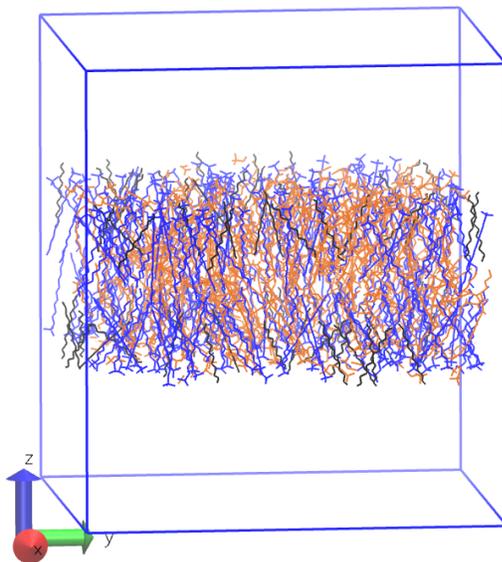


Figura 11: Configuración inicial de una bicapa para la simulación de un mimético de membrana a base de dodecil sulfato de sodio (SDS) con un alto contenido de fosfolípido. SDS coloreado en azul, 1-decanol en negro y fosfolípido en naranja

para alcanzar una densidad de 1.000 g ml^{-1} en el espacio remanente. Se utilizó el modelo TIP3P⁸ de agua para la simulación con el campo de fuerzas CHARMM36, y el modelo SPC/E⁹ para las simulaciones con los campos de fuerzas Berger y Gromos54A6.

Tras completar la configuración inicial, incluyendo iones y agua, ésta se sometió a un algoritmo de gradientes descendientes para minimizar las fuerzas de interacción hasta que no exista interacción más grande que $800.0 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$.

Para la simulación empleando el campo de fuerzas CHARMM36 se utilizó el algoritmo de integración Leap-Frog con un Δt de integración de 2 fs y se aplicaron condiciones de bordes periódicos en los tres ejes. La herramienta *SwissParam*¹⁰ fue utilizada para asignar cargas parciales. Las interacciones no enlazantes de Van der Waals entre átomos no más lejos que 1.0 nm fueron calculadas completamente, para

aquellos átomos separados entre 1.0 nm y 1.2 nm se empleó un esquema que fuerza suavemente la función de Lennard-Jones a cero en este rango (véase figura 12). Las interacciones electrostáticas fueron calculadas con la ecuación de Coulomb en átomos no más lejos que 1.2 nm; para distancias superiores se utilizó el método *Particle Mesh Ewald*¹¹ (PME) derivado de la sumatoria de Ewald¹².

Previo a la simulación de producción, se realizó una simulación corta de 1.0 ns pa-

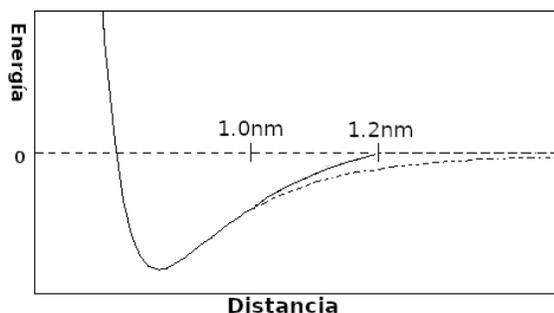


Figura 12: Gráfico del potencial de Van de Waals modificado para no calcular interacciones más lejanas que 1.2nm, según lo especificado por el campo de fuerzas CHARMM36. La línea punteada indica la función sin modificaciones.

ra generar velocidades y equilibrar temperatura y energía. Se ajustó la temperatura empleando un termostato modificado de Berendsen¹³, utilizando dos cuplas independientes para la bicapa y el agua, ambas con una temperatura de referencia de 310 K y constante de tiempo de 2.0 ps. Se equilibró la presión del sistema empleando la cupla de *Berendsen*¹⁴ con una presión de referencia de 1.0 bar y constante de tiempo de 2.0 ps.

La simulación de producción se efectuó hasta completar 40 ns, se empleó la misma cupla de temperatura, y una cupla de presión semi-isotrópica con presiones independientes en los ejes XY del eje Z, las presiones de referencia fueron de 0.8 bar para el eje XY, y de 1.0 bar para el eje Z. La constante de tiempo fue de 2.0 ps para ambas cuplas de presión.

Para la simulación empleando el campo de fuerzas de Berger se utilizó nuevamente el algoritmo Leap-Frog con un Δt de integración de 1 fs durante la primera simulación para equilibrar energías, y de 2 fs durante la simulación de producción. Se aplicaron condiciones de bordes periódicos en los tres ejes. Se probaron dos conjuntos de cargas parciales con este campo de fuerzas, uno fue calculado mediante el esquema Merz-Kollmann¹⁵ usando un nivel de teoría B3LYP/6-31G(d), y el segundo fue construido a partir de fragmentos similares en las distribuciones de cargas especificadas en el campo de fuerzas Gromos 53A6.

Las interacciones de Van der Waals y electrostáticas fueron calculadas completamente para átomos no más lejanos que 1.4 nm, las interacciones de Van der Waals para átomos más lejanos fueron truncadas a cero (figura 13), y las interacciones electrostáticas para átomos lejanos se utilizó el método PME. Antes de iniciar ca-

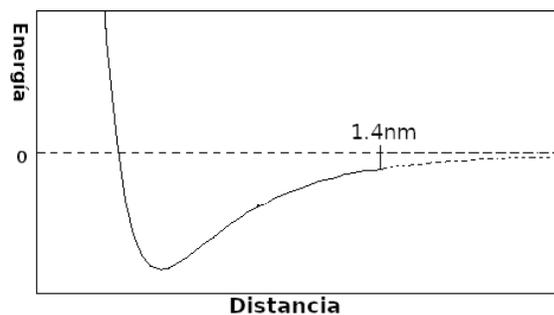


Figura 13: Gráfico del potencial de Van der Waals modificado para no calcular interacciones más lejanas que 1.4nm, según lo especificado por los campos de fuerzas Berger y Gromos 53A6. La línea punteada indica la función sin modificaciones.

da simulación de producción se realizó una simulación corta de 1 ns para generar velocidades y equilibrar temperatura, presión y energía; para luego generar simulaciones de producción de 200 ns cada una. La temperatura fue ajustada utilizando un termostato modificado de Berendsen, utilizando dos cuplas independientes para la bicapa y el agua, ambas con una temperatura de referencia de 310 K y una constante de tiempo de 0.5 ps. La presión se ajustó con un barostato de Berendsen para la

simulación de equilibración, y el barostato de Parrinello-Rahman para la simulación de producción. En ambos casos se utilizaron cuplas semi-isotrópicas con presiones independientes en los ejes XY del eje Z, las presiones de referencia fueron de 1.0 bar para ambas cuplas, la constante de tiempo fue de 1.0 ps.

Para la simulación realizada con el campo de fuerzas Gromos 53A6 se ocuparon parámetros de integración idénticos a aquellos utilizados con el campo de fuerza de Berger. Se realizaron simulaciones cortas de 1 nm previas a las simulaciones de producción para generar velocidades y equilibrar temperatura, presión y energía. Cada simulación de producción se calculó hasta completar 200 ns de simulación. El barostato y sus parámetros utilizados fueron idénticos a los utilizados durante la simulación con el campo de fuerzas de Berger. La temperatura se equilibró utilizando un termostato modificado de Berendsen con temperaturas de referencia entre 310 K y 330 K, con cuplas independientes para el agua y la bicapa y constantes de tiempo de 1.0 ps para ambas cuplas.

3.4.2. Perfiles de energía libre para procesos de inserción de sustratos en la membrana

El cálculo de cada perfil de energía libre para cada proceso de inserción en la membrana fue hecho utilizando el método Umbrella Sampling/WHAM.

Cada ventana de simulación se generó a partir de dividir la trayectoria de una simulación en la que se separa gradualmente el sustrato en estudio desde el centro de la membrana. Cada ventana de simulación se escogió de manera que la posición del fármaco esté espaciado en 1.5 Å desde la ventana anterior, añadiendo más ventanas de simulación en los casos donde hubo muestreo insuficiente.

Antes de iniciar cada ventana de simulación, se generaron velocidades y se estabilizaron sus temperaturas en cada una de ellas con simulaciones cortas en el conjunto NVT. Cada simulación de estabilización consistió en cálculos de dinámica con tiempos de integración de 1 fs hasta completar 100 ps. Las temperaturas se ajustaron utilizando un termostato modificado de Berendsen, con tres cuplas independientes para la bicapa, el agua y el fármaco; las temperaturas de referencia fueron de 310 K para el agua y el fármaco, y de 320 K para la bicapa.

Para no deformar la bicapa durante la simulación de equilibrio y cada ventana de simulación, se añadió una restricción de movimiento a los componentes de la bicapa en forma de un potencial cuadrático con constantes de fuerza de $237 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ en los tres ejes.

Cada ventana de simulación se calculó empleando tiempos de integración de 2 fs hasta completar 20 ns. La distancia entre los centros de masa de la bicapa y el fármaco fueron mantenidas en cada ventana mediante un potencial de sesgo cuadrático con una constante de fuerza de $800 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$.

3.5. Espectroscopía ^2H -RMN de miméticos de membrana y péptidos selectivamente deuterados

Con el objetivo de sondear la movilidad y orientación de la bicapa y el péptido TP1, es que se tomaron espectros ^2H -RMN de miméticos de membrana con marcas deuteradas en sus anfilos y de péptidos selectivamente deuterados.

Todos los espectros ^2H -RMN se tomaron en un espectrómetro *Bruker Avance 400* (Universidad de Santiago de Chile) operando a 61.422 MHz. Los espectros se obtuvieron con pulsos en 90° de $22.4 \mu\text{s}$, tiempos de adquisición de 760 ms y un ancho espectral de 43.1 kHz en archivos de 32 kB con resolución digital de 1.32 Hz

por punto.

Los espectros de miméticos de membrana fueron adquiridos a 37 °C y se esperó 10 minutos con la muestra en el espectrómetro antes de comenzar la adquisición para permitir que éstas alcancen un equilibrio térmico.

Los espectros fueron procesados usando el software *Bruker TopSpin 4.0* y analizados con *MatPlotLib*.

Referencias

- [1] Bahamonde-Padilla, V. E.; Espinoza, J.; Weiss-López, B. E.; Cascales, J. J. L.; Montecinos, R.; Araya-Maturana, R. Effect of lithium on the properties of a liquid crystal formed by sodium dodecylsulphate and decanol in aqueous solution. *The Journal of Chemical Physics* **2013**, *139*, 014703.
- [2] Maghraby, G. M. E.; Arafa, M. F.; Osman, M. A. Microemulsion for simultaneous transdermal delivery of benzocaine and indomethacin: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2014**, *40*, 1637–1644, PMID: 24093429.
- [3] Fabbrini, G.; Juncos, J.; Mouradian, M. M.; Serrati, C.; Chase, T. N. Levodopa pharmacokinetic mechanisms and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* **1987**, *21*, 370–376.
- [4] Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; Van Gunsteren, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1656–1676.
- [5] Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.;

- Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; Mackerell, A. D. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *31*, NA–NA.
- [6] Berger, O.; Edholm, O.; Jähnig, F. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophysical Journal* **1997**, *72*, 2002 – 2013.
- [7] Martínez, L.; Andrade, R.; Birgin, E. G.; Martínez, J. M. PACKMOL: a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *Journal of computational chemistry* **2009**, *30*, 2157–2164.
- [8] Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, *79*, 926–935.
- [9] Berendsen, H.; Postma, J.; Van Gunsteren, W.; Hermans, a. J. Intermolecular forces. *Pullman, B., Ed.; Reidel Publishing Company: Dordrecht* **1981**, 331–342.
- [10] Zoete, V.; Cuendet, M. A.; Grosdidier, A.; Michielin, O. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *Journal of computational chemistry* **2011**, *32*, 2359–2368.
- [11] Di Pierro, M.; Elber, R.; Leimkuhler, B. A Stochastic Algorithm for the Isobaric–Isothermal Ensemble with Ewald Summations for All Long Range Forces. *Journal of chemical theory and computation* **2015**, *11*, 5624–5637.
- [12] Ewald, P. P. Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Annalen der physik* **1921**, *369*, 253–287.

- [13] Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *Journal of Chemical Physics* **2007**,
- [14] Berendsen, H. J.; Postma, J. P.; Van Gunsteren, W. F.; Dinola, A.; Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* **1984**,
- [15] Besler, B. H.; Merz, K. M.; Kollman, P. A. Atomic charges derived from semi-empirical methods. *Journal of Computational Chemistry* **1990**,

4. Resultados y discusión

4.1. Formulación del nuevo mimético de membrana.

Mediante el procedimiento descrito anteriormente (sección 3.1.1), se fabricaron 19 cristales líquidos con concentraciones crecientes de fosfolípido hasta 30 % de éste, al superar esta concentración se obtienen fases no-cristalinas. A todas las muestras se les tomaron espectros ^2H -RMN para censar el desdoblamiento cuadrupolar en las señales del agua parcialmente deuterada (DHO) y 1-decanol- $\alpha - d_2$. La figura 14 resume los resultados espectroscópicos de cada muestra fabricada.

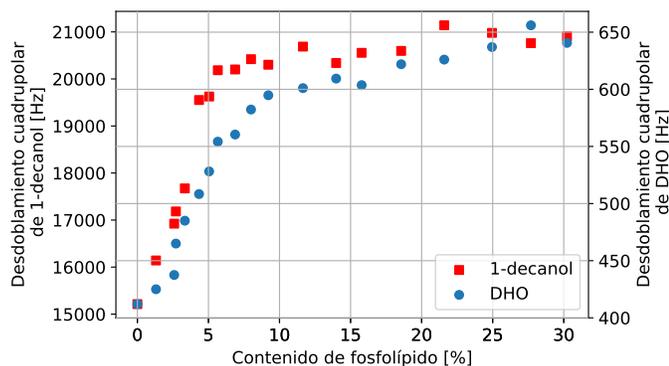
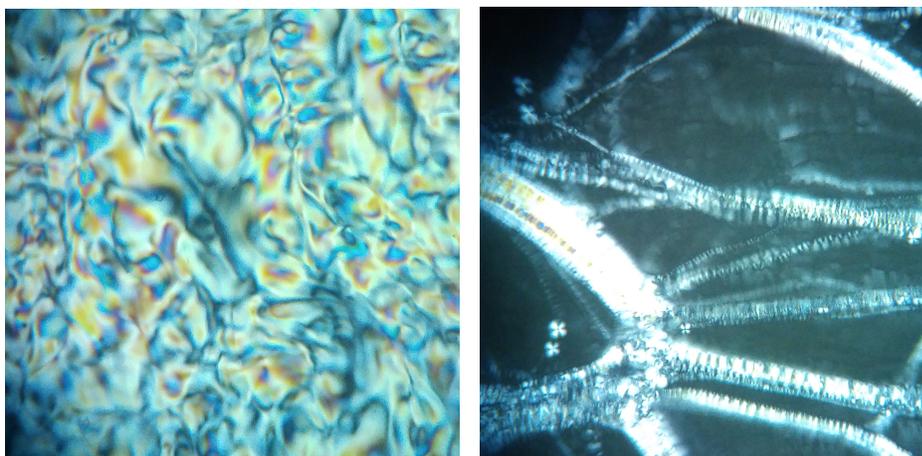


Figura 14: Desdoblamientos cuadrupolares en señales de agua deuterada y 1-decanol- $\alpha - d_2$ en función de la concentración de fosfolípido en miméticos de membrana a base de SDS.

De la observación de la figura 14 se aprecia un comportamiento diferente en la variación del desdoblamiento cuadrupolar de agua y 1-decanol al superar una concentración del 6 % de fosfolípido. Este cambio se puede explicar si uno supone una transición de fase al superar dicha concentración.

Un cambio de comportamiento también es apreciable al comparar imágenes de microscopía de luz polarizada (figura 15)

Los patrones obtenidos en las imágenes de microscopía corresponden a un patrón



(a) 4% de fosfolípido.

(b) 17% de fosfolípido.

Figura 15: Imágenes de microscopía de luz polarizada de miméticos de membrana a base de SDS con diferentes contenidos de fosfolípido. Ambas con magnificación 100x.

tipo *Schlieren* (figura 15a) y otra de tipo *veta aceitosa* (figura 15b). Se ha detectado una transición similar en bicapas con detergentes catiónicos¹, en el que la transición se atribuye a un cambio desde una bicela mono-axial con forma de disco a una bi-axial elongada. Lo más probable es que la transición aquí evidenciada sea similar a la descrita en bicapas con detergentes catiónicos, considerando que la estructura de bicapa no se pierde, ya que de otro modo habría un cambio drástico en los desdoblamientos cuadrupolares medidos.

Una de las imágenes tomadas a un mimético con un 5% de fosfolípido (figura 16) dio cuenta de la presencia de un régimen mixto de ambas fases. Este resultado es evidencia de que la diferencia entre ambas fases es lo suficiente como para que la transición entre ambas sea de primer orden.

Del total de muestras tomadas en esta primera etapa de maximización se escogió aquella con la máxima cantidad de fosfolípido en la que se mantuviese la calidad de la señal. La composición que logró satisfacer ambas condiciones fue aquella con un

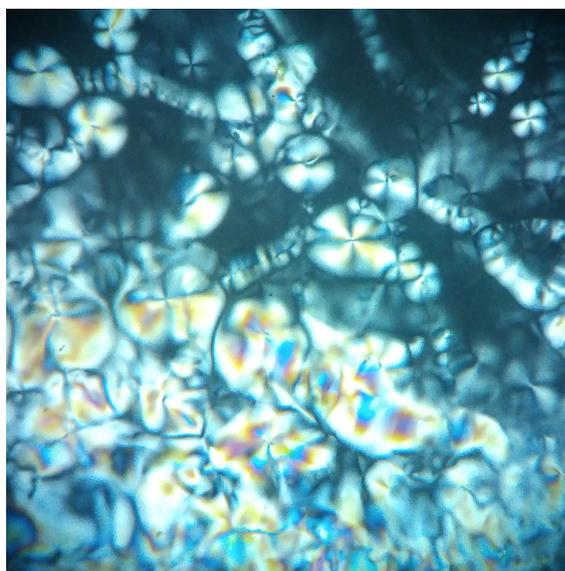


Figura 16: Imágen de microscopía de luz polarizada de un mimético de membrana a base de SDS con 5 % de fosfolípido. Se observa un régimen mixto entre dos fases.

22 % de fosfolípido, dado que al incrementar la concentración a 23 % se disminuye la resolución de las señales desdobladas del agua y adoptan características similares a las de un espectro de un sólido. La composición exacta de esta fase se detalla en la tabla 5

Tabla 5: Composición de mimético de membrana con alta concentración de fosfolípido.

Compuesto	Contenido [% _p]
Dodecil sulfato de sodio	18.65 %
Sulfato de sodio	1.55 %
1-decanol	3.92 %
Mezcla de fosfolípidos	26.76 %
Agua	49.12 %

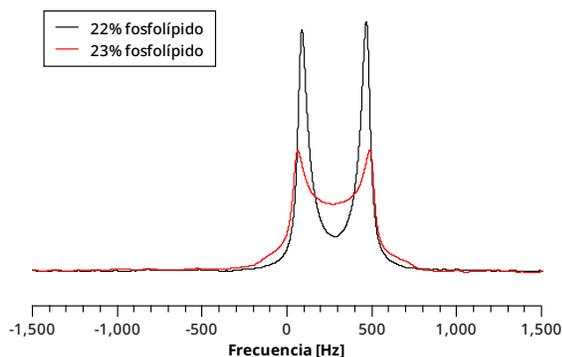


Figura 17: Comparación entre espectros ^2H -RMN para miméticos con 22 % y 23 % de contenido de fosfolípido.

4.2. Calibración de un modelo de simulación

La primera etapa de la calibración del modelo de dinámicas moleculares consistió en seleccionar el campo de fuerza. Se probaron los campos de fuerzas CHARMM36, Berger y Gromos 53A6. Los detalles de cada simulación son expuestos en la sección 3.4.1. Tras finalizar los cálculos con los tres campos de fuerzas, se calculó el parámetro de orden de los enlaces carbono-deuterio del SDS- d_{25} y subsecuentemente el desdoblamiento cuadrupolar predicho por la simulación. Este último resultado se comparó con resultados espectroscópicos experimentales (figura 18), y se escogió el campo de fuerza con los resultados más concordantes para realizar ajustes adicionales.

Como se observa en los resultados resumidos en la figura 19, la simulación realizada con el campo de fuerza CHARMM36 resulta en parámetros de orden y desdoblamientos cuadrupolares predichos muy altos en comparación a los resultados experimentales, indicando que este campo de fuerza sobrestima en demasía las interacciones atractivas.

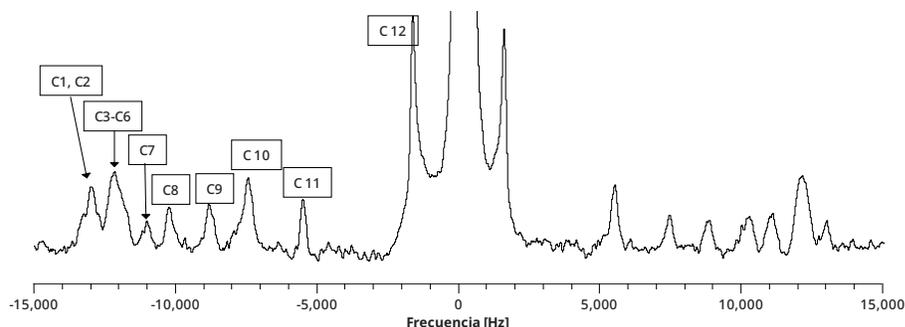


Figura 18: Espectro ^2H -RMN de mimético de membrana a base de SDS con 22% de fosfolípido natural. Las señales desdobladas de sondas de SDS- d_{25} . La señal central corresponde a la señal desdoblada (no visible) del agua deuterada en la muestra.

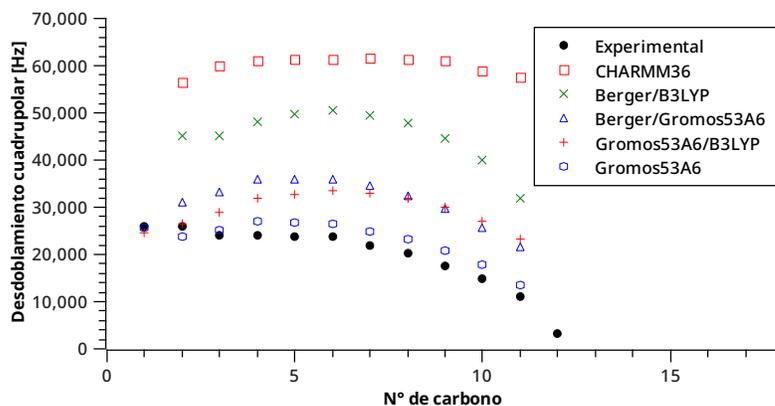


Figura 19: Desdoblamientos cuadrupolares de SDS- d_{25} del espectro ^2H -RMN. Comparación entre resultado experimental (círculos negros) y predicho por simulaciones de dinámicas moleculares con diferentes campos de fuerza. Se muestran los resultados de CHARMM36 en cuadrados rojos, Berger con cargas según cálculo B3LYP en cruces diagonales verdes, Berger con cargas de Gromos53A6 en triángulos azules, Gromos53A6 con cargas según cálculo B3LYP en cruces rojas y Gromos53A6 con cargas según definidas en el campo de fuerza en círculos azules.

Respecto a los resultados obtenidos con el campo de fuerzas de Berger, si bien se obtienen mejores resultados a los obtenidos con CHARMM36, estos siguen estando alejados en torno a ~ 20 kHz de los resultados experimentales. Existe una mejoría al cambiar la distribución de cargas a la establecida por el campo de fuerzas Gromos 53A6, que define dipolos mucho más débiles, pero los desdoblamientos predichos siguen estando en torno a ~ 10 kHz alejados de los resultados experimentales.

En relación a los resultados obtenidos con Gromos 53A6 y cargas según cálculo B3LYP/6-31g(d), hay una mejoría en la reproducibilidad de los desdoblamientos cercanos a la interfase, no obstante el cálculo *ab-initio* realizado resulta en dipolos demasiado altos en las insaturaciones del fosfolípido, por lo que se decidió asignar cargas parciales de acuerdo a fragmentos similares definidos en el campo de fuerza Gromos 53A6, de éste modo se obtiene una simulación que difiere en torno a ~ 3 kHz de los resultados experimentales, por lo que se decide por este último campo de fuerza para realizar ajustes adicionales.

Dado que el campo de fuerza seleccionado sólo diverge de los resultados experimentales en los desdoblamientos más alejados de la interfase, la solución para mejorar el ajuste debe aumentar la movilidad de las cadenas lipídicas en mayor medida de lo que afecte a la movilidad de la interfase. La solución que se escogió para lograr este objetivo fue dividir el termostato aplicado sobre el sistema en dos cuplas, una cupla para el agua e iones con temperatura de referencia fisiológica y una segunda cupla para el contenido de la bicapa con una temperatura levemente superior. El razonamiento detrás de esta decisión se basó en la expectativa de que las interacciones y dinámicas en la interfase dependen en mayor medida de la actividad del solvente, que posee una mayor cantidad de dipolos y con mayor intensidad, mas bien que del

lípido en la bicapa. Por lo tanto, si se eleva la temperatura de referencia sólo en la bicapa, ésta tendrá un efecto más significativo hacia el interior de la bicapa que en los carbonos cercanos a la interfase.

Se probó elevando la temperatura de la bicapa en 10° respecto a la temperatura fisiológica, los resultados son expuestos en la figura 20. Tras observar los resultados

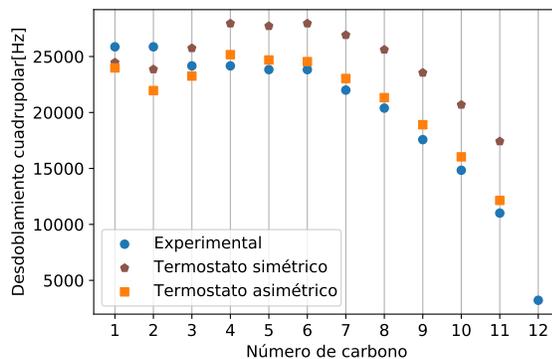


Figura 20: Desdoblamientos cuadrupolares de SDS-d₂₅ en ²H-RMN. Comparación de resultados experimentales y predichos por cálculos de dinámica molecular con bicapas estabilizadas con diferentes termostatos.

expuestos en la figura 20 no solo se confirma la suposición de que un aumento en la temperatura de referencia de la bicapa afectaría en mayor medida la movilidad de los carbonos más alejados de la interfase, si no que también se obtiene un modelo de simulación que reproduce con gran exactitud los resultados experimentales, por lo que se decide utilizar éste para realizar las siguientes pruebas en simulación.

4.3. Validación del mimético

Para validar la actividad del mimético como tal, se probó, experimentalmente y en simulación, la actividad penetrante del anestésico benzocaína, del que existe evidencia de su capacidad penetrante; además de la incapacidad de penetrar del aminoácido L-Dopa. De este último existen evidencias de que su actividad penetrante implica un receptor específico, por lo tanto no debería ser capaz de atravesar la

membrana de forma espontánea. Si se confirma que estos dos comportamientos son similares en el mimético y en los resultados reportados en la literatura, se confirmaría que el nuevo mimético de membrana actúa efectivamente como tal.

4.3.1. Control con benzocaína

Utilizando el modelo de membrana calibrado en la sección 4.2, se empleó el método Umbrella Sampling/WHAM tal como es descrito en la sección 3.4.2 para producir un perfil de energía libre para el proceso de translocación del anestésico en el mimético de membrana.

El perfil de potencial químico para la translocación de benzocaína obtenido (figura

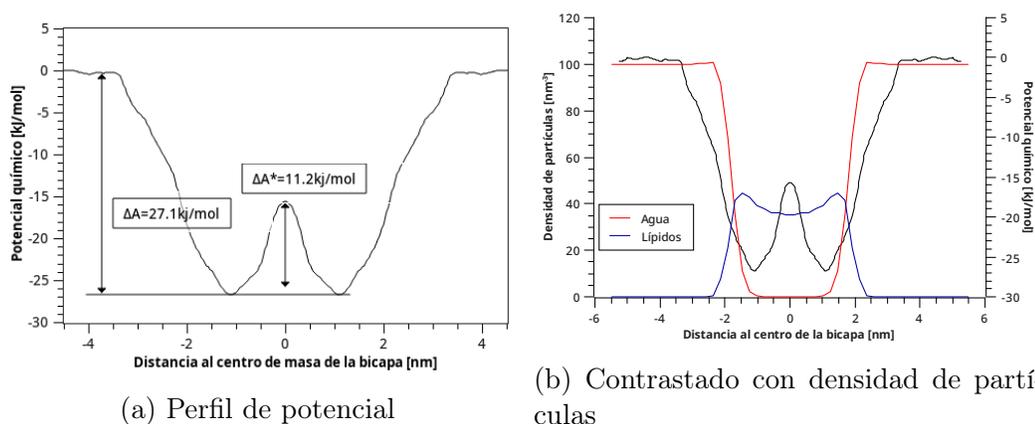


Figura 21: Perfil de potencial químico para el proceso de translocación de benzocaína a través de un mimético de membrana a base de SDS.

21a) revela que tal proceso necesita completar tres pasos para lograr la translocación. Primero la benzocaína espontáneamente, y sin interactuar con la doble capa eléctrica, queda inmersa en una de las capas de la bicapa (ver figura 21b), ubicándose en el sector más cercano a la interfase. Luego el anestésico debe superar una pequeña barrera de 11.2 kJ mol^{-1} para cruzar a la segunda capa de la membrana,

para finalmente escapar de la bicapa a un costo energético de 27.1 kJ mol^{-1} . Este comportamiento coincide con los resultados encontrados por otros autores²

El resultado de esta simulación fue validado con resultados espectroscópicos. La figura 22 compara los desdoblamientos cuadrupolares de las señales de SDS-d₂₅ en dos preparaciones de mimético de membrana, una con concentración de 8 mg de benzocaína por cada 1 g de mimético y una muestra sin anestésico.

Tras observar la figura 22 se aprecia que la presencia de benzocaína afecta en mayor

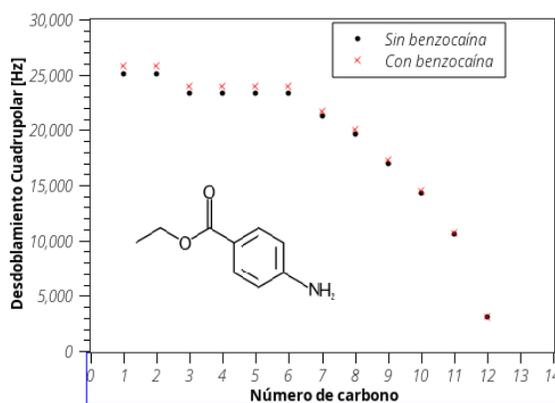


Figura 22: Desdoblamientos cuadrupolares de SDS-d₂₅ en un mimético de membrana a base de SDS. Comparación entre mimético con benzocaína y sin el anestésico.

medida a la dinámica de los seis carbonos más cercanos a la interfase, indicando que la posición más favorable para el anestésico sería que éste se posicione dentro de la bicapa y cercano a la interfase. Este resultado concuerda con el obtenido mediante cálculos de dinámica molecular (figura 21b).

4.3.2. Control con L-Dopa

Del mismo modo que con los anestésicos, se calculó un perfil de energía libre para el proceso de translocación de L-Dopa a través del mimético de membrana, éste es

expuesto en la figura 23a. Del perfil expuesto en la figura 23a, se aprecia que posee

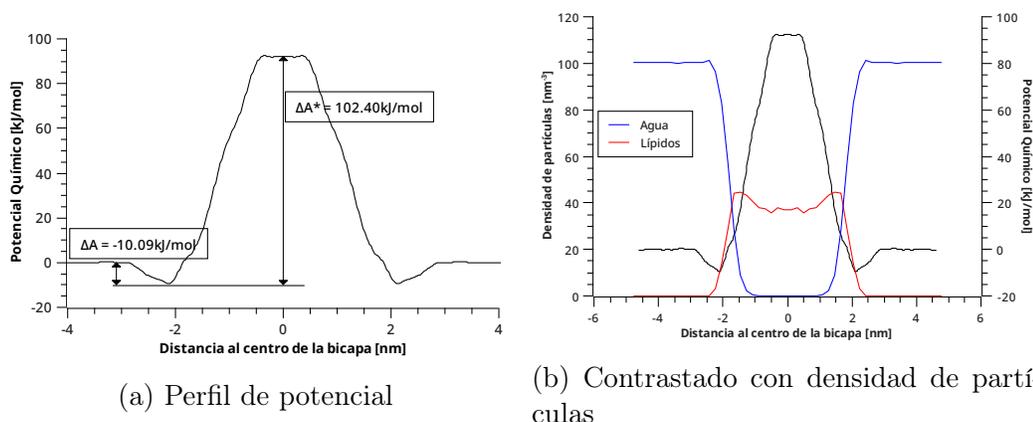


Figura 23: Perfil de potencial químico para el proceso de translocación de L-dopa a través de un mimético de membrana a través de un mimético de membrana a base de SDS.

un mínimo fuera de la bicapa y cercano a la interfase y una fuerte barrera de potencial, de $102.40 \text{ kJ mol}^{-1}$, que impide que la molécula pueda ingresar a la bicapa. Esto significaría que la L-dopa se adsorbe débilmente a la interfase, pero es incapaz de ingresar a la bicapa y mucho menos atravesarla.

Con el objetivo de validar estos resultados, se preparó una muestra de mimético con 7 mg de L-Dopa- d_3 (deuterada en el anillo aromático) por cada 1 g de mimético, y se tomó un espectro ^2H -RMN para medir el desdoblamiento cuadrupolar de sus señales. El espectro es expuesto en la figura 24 En el espectro de la figura 24, la señal central corresponde a la señal desdoblada del agua, mientras que las cuatro señales pequeñas entorno a la señal del agua corresponden a las señales desdobladas de L-dopa- d_3 . La presencia de estos desdoblamientos pequeños, del orden de 4.2 kHz y 8.2 KHz, se debe a que la L-dopa se adsorbe a la interfase de la bicapa, sin penetrarla, y de este modo deja de tener una distribución orientacional isotrópica.

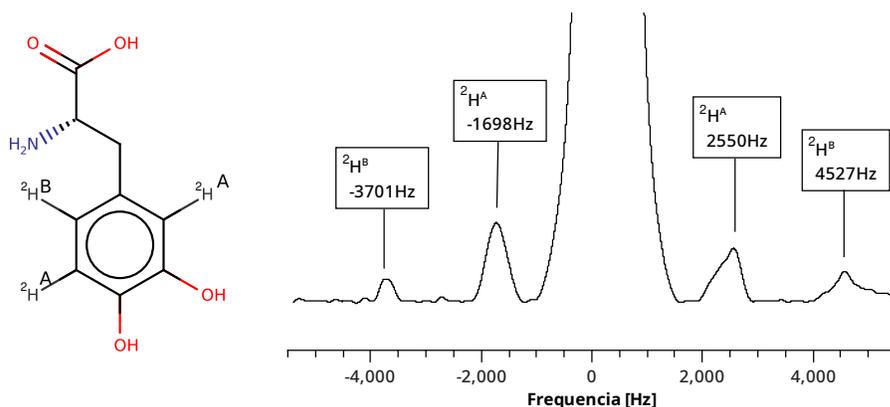


Figura 24: Espectro ^2H -RMN de una muestra de mimético de membrana con 7mg de L-Dopa- d_3 por cada gramo de muestra. Desdoblamientos de 4248 para H^A y 8228Hz para H^B

Estos resultados fueron publicados en el *Journal of molecular liquids* en un artículo titulado *Characterization of an anionic membrane mimetic with natural phospholipid content and magnetic orienting capabilities*³.

4.4. Síntesis del péptido TP1

200 mg del péptido TP1 fueron sintetizados mediante los métodos expuestos en la sección 3.2. El péptido resultante fue sometido a pruebas de dicroísmo circular y espectroscopía de masas de ionización por electro-spray (ESI-MS), estos resultados son expuestos en la figura 25.

La curvatura presentada por el dicroísmo circular del péptido en agua (figura 25a) indica que éste no posee estructura secundaria. No obstante, la curvatura del mismo, cuando el péptido está disuelto en una solución al 30 % de trifluoro-etanol (TFE) en agua, concuerda con una estructura secundaria α -hélice incompleta.

Del resultado de espectroscopía de masas (figura 25b), se confirma una síntesis exitosa ya que se aprecian las señales para el péptido doblemente protonado ($[\text{M} + 2\text{H}]^{2+} = 772.0 \text{ m/z}$) y para el péptido triplemente protonado ($[\text{M} + 3\text{H}]^{3+} = 515$

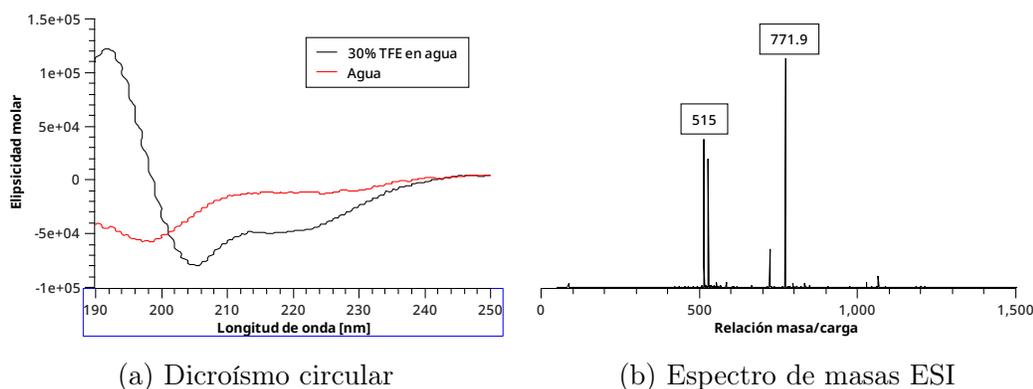


Figura 25: Dicroísmo circular y espectro de masas para péptido TP1.

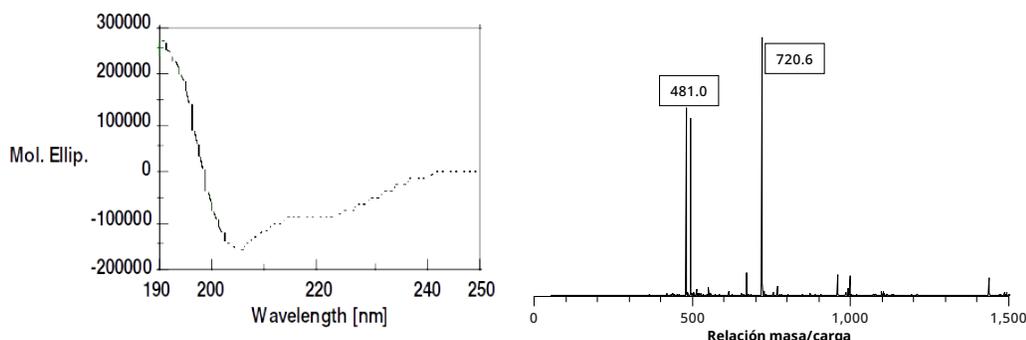
m/z)

Dado que no se funcionalizará la cisteína del péptido, la que es utilizada para añadir cargos, existe el riesgo que el péptido dimerice, por lo tanto se decidió sintetizar una copia del péptido sin cisteína, y si el resultado de su dicroísmo circular resulta similar al de su análogo con cisteína significará que no ocurrieron variaciones en la estructura secundaria del péptido, por lo tanto se podrá continuar el estudio con el péptido sin cisteína.

Tras finalizar la síntesis de 200 mg del péptido sin cisteína, se le realizaron pruebas de dicroísmo circular y espectroscopía de masas ESI, los resultados de estas pruebas son expuestos en la figura 26.

Al examinar los resultados de la espectroscopía de masas (figura 26b), se confirma nuevamente una síntesis exitosa ya que se aprecian las señales para el producto doblemente protonado ($[M + 2H]^{2+} = 720.4$ m/z) y para el producto triplemente protonado ($[M + 3H]^{3+} = 480.6$ m/z).

La curvatura presentada por dicroísmo circular (figura 26a) es idéntica a aquella resultante del péptido con cisteína, ambas corresponden al de un α -hélice incompleto. Por lo tanto, se establece que la remoción de cisteína del péptido no modifica la



(a) Dicroísmo circular en 30 % TFE

(b) Espectro de masas ESI

Figura 26: Dicroísmo circular y espectro de masas para péptido TP1 sin cisteína.

estructura secundaria de éste, por consiguiente será el péptido sin cisteína el que se utilizará para los siguientes experimentos.

4.5. Inserción del péptido TP1 en la membrana

Para confirmar que el péptido TP1 ingresa al mimético de membrana, se tomaron espectros ^2H -RMN a dos muestras de mimético de membrana marcados con SDS- d_{25} , una muestra blanca y una muestra con 15 mg de péptido TP1 por cada 1 g de mimético. La superposición de ambos espectros es expuesta en la figura 27. En la figura 27 la señal central desdoblada corresponde a aquella del agua, mientras que el resto de las señales corresponde a las señales desdobladas del SDS- d_{25} . Al comparar ambas señales, se aprecia que las mayores diferencias están en las señales más desdobladas, que pertenecen a los carbonos más cercanos a la interfase. Esto significa que la presencia de TP1 perturba la dinámica orientacional de los componentes de la bicapa más cercanos a la interfase, indicando que el péptido podría estar inserto en la bicapa y cercano a la interfase.

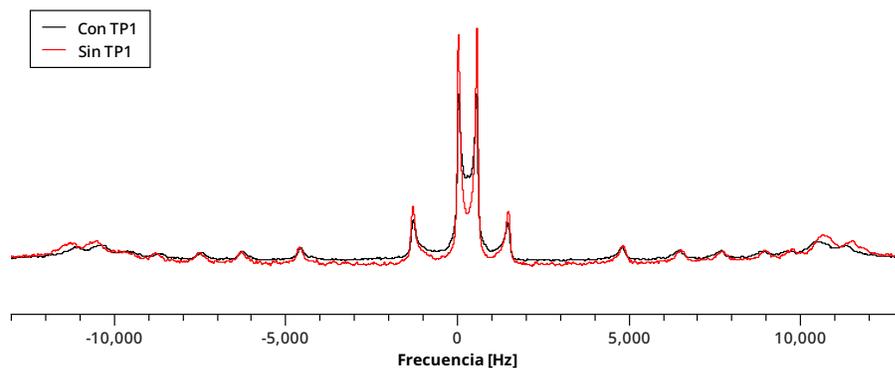


Figura 27: Espectros ^2H -RMN de miméticos de membrana a base de SDS con sondas de SDS- d_{25} . Comparación entre muestras con y sin péptido TP1.

Con el objetivo de obtener resultados preliminares acerca de la orientación y mecanismo de cruce del péptido dentro del mimético de membrana, se simuló una bicapa del mimético de membrana con el péptido TP1 inserto por un total de 800 ns.

Adicionalmente, empleando el método Umbrella Sampling/WHAM, se generó un perfil de energía para el proceso de translocación del péptido a través de la membrana (figura 28).

Desde la figura 28, se aprecia que el proceso de translocación tiene un pozo potencial

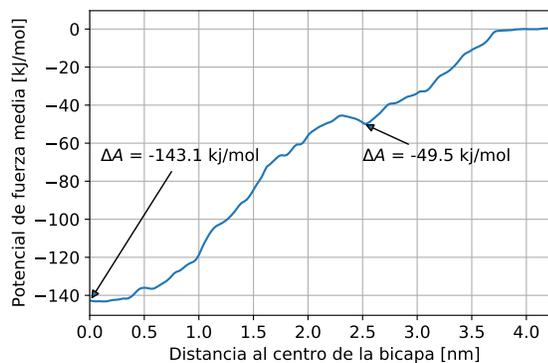


Figura 28: Perfil de potencial químico para el proceso de translocación del péptido TP1 a través de un mimético de membrana a base de SDS.

de $\Delta A = -49.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ al acercarse a la interfase de la membrana, para luego ingresar a ella fácilmente hasta el centro de la bicapa, totalizando $\Delta A = -143.1 \text{ kJ/mol}$

para el proceso total. Si bien, este perfil de potencial revela que el proceso de inserción del péptido TP1 en la transmembrana es espontáneo, el pozo potencial de -143.1 kJ/mol es demasiado profundo para un eventual escape del péptido desde la transmembrana hacia el interior de la célula a temperatura fisiológica.

Un mecanismo viable de translocación debe otorgar estabilidad al péptido dentro de la bicapa, pero el pozo de potencial asociado a esta estabilidad no debe ser demasiado profundo, ya que si se requiere mucha energía para extraer el péptido de la transmembrana significaría que el péptido queda atrapado en la transmembrana, lo que no se observa experimentalmente.

Es por esta razón que se simularon los siguientes escenarios con el objetivo de encontrar un mecanismo con un menor pozo potencial:

- Translocación del péptido TP1 a través de la membrana con dos péptidos ya presentes en la transmembrana. Estos resultados revelarían el efecto de la concentración del péptido en el mecanismo.
- Translocación del péptido TP1 a través de la membrana con translocación de partículas de agua solvatando al péptido.
- Translocación del péptido a través de una membrana sin fosfolípido. Estos resultados revelarían el efecto de las interacciones entre el péptido y los fosfolípidos sobre el mecanismo.

4.5.1. Mecanismo de translocación: Efecto de la concentración

Con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración del péptido TP1 en sus capacidades penetrantes, empleando el método antes descrito para calcular perfiles de potencial (pag. 42), se calculó éste para el proceso de translocación del péptido TP1 a través de un mimético de membrana con dos péptidos previamente insertos

en la transmembrana. Los resultados de este cálculo se exponen en la figura 29.

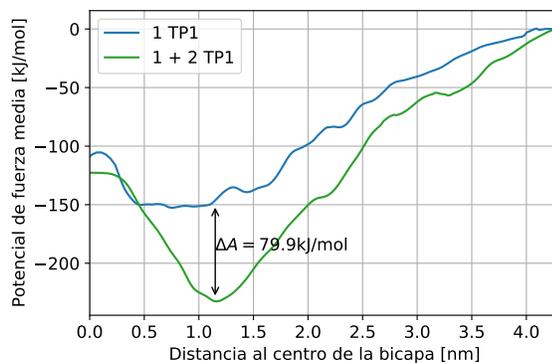


Figura 29: Perfil de potencial para proceso de translocación de péptido TP1 a través de un mimético de membrana celular. En azul el fenómeno sin péptidos insertos previamente. Y en verde el mismo fenómeno con dos péptidos insertos en la transmembrana.

Ambos perfiles de potencial revelan un comportamiento similar en ambas concentraciones: En ambos casos el péptido cruza la interfase sin resistencia y en ambos casos el péptido se integra espontáneamente con una de las hojas de la bicapa. No obstante, cuando existen dos péptidos ya insertos en la bicapa, el péptido entrante interactúa fuertemente con los péptidos que ya se encuentran insertos, resultando en una diferencia de energía libre de más de -200 kJ/mol respecto al péptido en agua. En términos prácticos, esto significa que una saturación en la concentración del péptido penetrante resulta detrimental para la actividad penetrante del mismo, ya que si bien el péptido puede entrar a la transmembrana, la fuerte interacción entre péptidos resultará en la incapacidad del péptido de escapar del agregado.

El efecto de la concentración también fue estudiado experimentalmente, en el que se preparó una muestra de un gramo de mimético de membrana, y se le añadió péptido TP1 hasta obtener una ruptura de la fase nemática de bicapa. Esta ruptura

se observó al alcanzar una concentración de 8.0 mg por gramo de mimético. Este gel esmético, a diferencia de la fase nemática, tiene un comportamiento más similar al de un sólido: es de consistencia firme y no fluye. Esto indica que para obtener esta fase, se requiere de una fuerte interacción intermolecular entre sus componentes

4.5.2. Mecanismo de translocación: Efecto del agua

Para juzgar el efecto del agua en el mecanismo se compararon los resultados de simulación de dos casos: Una primera simulación del péptido translocando el mimético de membrana, y una segunda simulación del mismo fenómeno pero con partículas de agua solvatando el péptido durante la translocación. Luego se calculó un perfil de potencial para ambos procesos empleando el método *Umbrella Sampling/WHAM* (pag. 42). Estos resultados se encuentran expuestos en la figura 30.

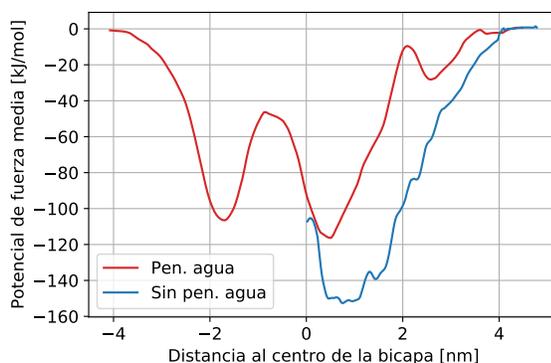


Figura 30: Perfil de potencial para proceso de translocación de péptido TP1 a través de un mimético de membrana celular. En azul el fenómeno sin translocación de agua. Y en rojo el mismo fenómeno con moléculas de agua solvatando el péptido durante el mecanismo.

Estos resultados indican que no solo el mecanismo es bastante diferente cuando existe una translocación con agua, sino que además los pozos potenciales son menos profundos, indicando que una translocación mediante este mecanismo es más viable

que su alternativa sin agua.

Dado que este mecanismo se consideró viable, se extendió el cálculo de perfiles de potencial para calcular el proceso de ingreso y egreso de la membrana como procesos diferentes. Es por esta razón que éste perfil de potencial es asimétrico.

4.5.3. Mecanismo de translocación: Efecto del fosfolípido

Como tercera alternativa al mecanismo, se consideró la posible translocación del péptido a través de una membrana sin fosfolípido. Para estudiar la viabilidad de éste, se calculó el perfil de potencial para el proceso de translocación del péptido TP1 a través de una bicapa ausente de fosfolípidos. Dado que se concluyó anteriormente que la translocación del péptido solvatado con agua es más viable que con ausencia de éste, ésta simulación también incluye solvatación de agua durante el mecanismo. Los resultados son expuestos en la figura 31.

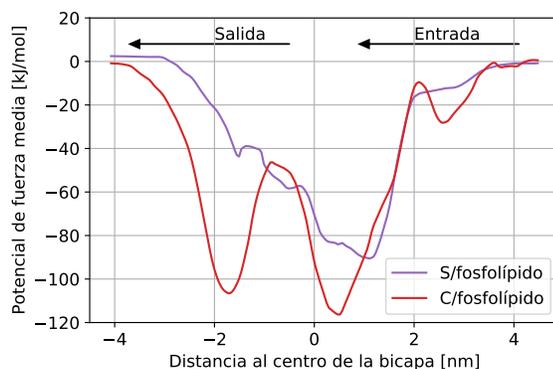


Figura 31: Perfil de potencial para proceso de translocación de péptido TP1 a través de un mimético de membrana celular. En rojo el fenómeno ocurriendo en un mimético de membrana con alto contenido de fosfolípido. Y en púrpura la translocación a través de un mimético sin fosfolípido.

Si bien, en ambos casos el mecanismo de ingreso a la bicapa es similar, cuando existe fosfolípido en la bicapa el pozo de potencial es ~ 25 kJ/mol más profundo, indicando una interacción atractiva más fuerte entre el péptido y los componentes de la bicapa cuando existe fosfolípido en ella.

En una membrana real, una translocación en un ambiente reducido de fosfolípido no es innatural ya que en una membrana celular existirán micro-dominios consistentes en acumulaciones de colesterol, glicolípidos y esfingolípidos, llamadas *balsas lipídicas*. Estas balsas lipídicas han sido ampliamente estudiadas, y se han identificado múltiples virus que utilizan estos dominios para internalizarse en la célula^{4,5}. Por lo que no es descabellado pensar que un péptido penetrante, como el péptido TP1, pueda translocar empleando estos dominios. Es por esta razón, que ambos mecanismos referenciados en la figura 31 serán considerados como *mecanismos probables* y fueron analizados en detalle a continuación.

4.5.4. Mecanismo de translocación: Mecanismo paso a paso

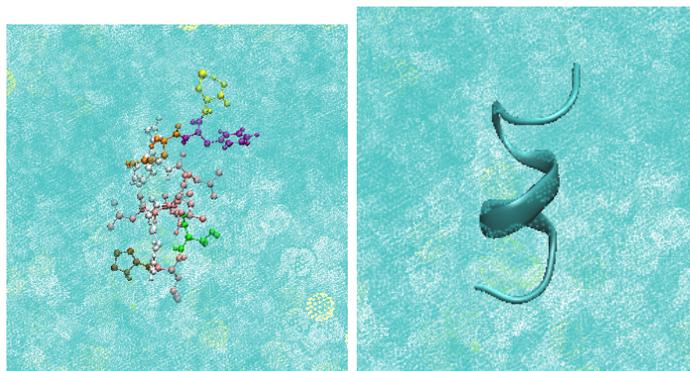


Figura 32: Péptido TP1 en solución. A la izquierda en un diagrama de líneas y esferas y a la derecha en un diagrama de cintas.

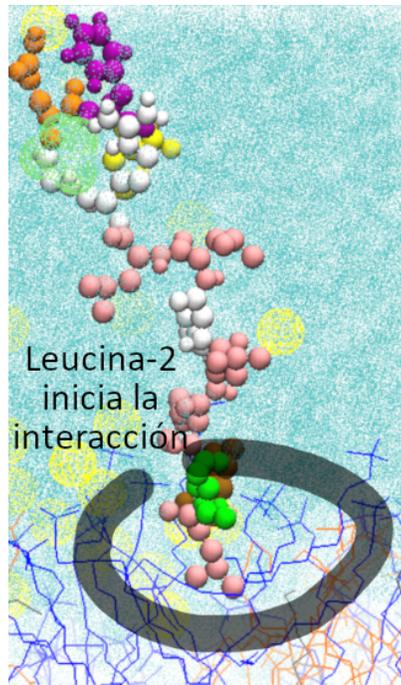
Estando en solución, y antes de acercarse a la bicapa, el péptido TP1 adopta una

estructura secundaria de alfa-hélice. Esto no solamente se encontró en la simulación (figura 32), sino que también fue confirmado mediante ensayos con dicroísmo circular (figura 25a en pag. 58). No obstante, durante el primer contacto del péptido con la bicapa, éste pierde su estructura secundaria para adoptar una estructura elongada (figura 33a).

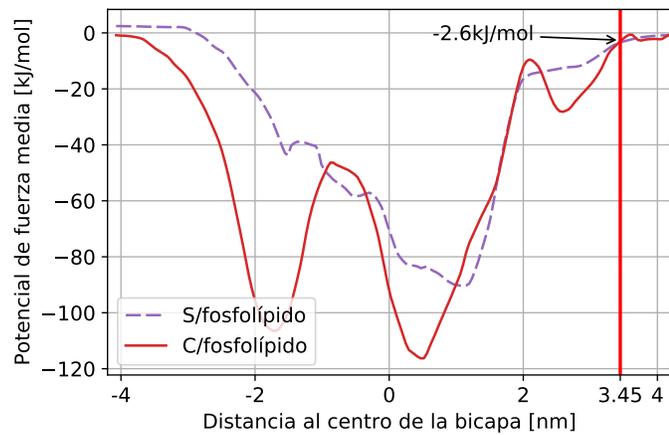
Durante este primer contacto el amino-terminal del péptido interactúa con las cargas negativas de la capa de Stern, mientras que la leucina-2 del péptido interactúa fuertemente con los carbonos más cercanos a la interfase, tal como se aprecia en su función de distribución radial correspondiente (figura 33c). Es esta interacción atractiva entre la leucina-2 y los carbonos hidrofóbicos del interior de la bicapa la que impulsa el primer ingreso del péptido hacia la bicapa. Pues en esta etapa, el resto de los fragmentos del péptido no interactúan con la membrana, tal como revelan sus funciones de distribución radial.

Tras este primer contacto, parte del péptido penetra hacia dentro de la bicapa para alojarse en un pequeño pozo de potencial de -22.3 kJ/mol (figura 34b). La estabilidad de esta etapa se puede atribuir a la interacción favorable entre los fragmentos de leucina 2 y 4 con los carbonos hidrofóbicos de la bicapa (figura 34c), además de la interacción electrostática atractiva entre la arginina-6 positivamente cargada y los grupos fosfato negativamente cargados (figura 34a).

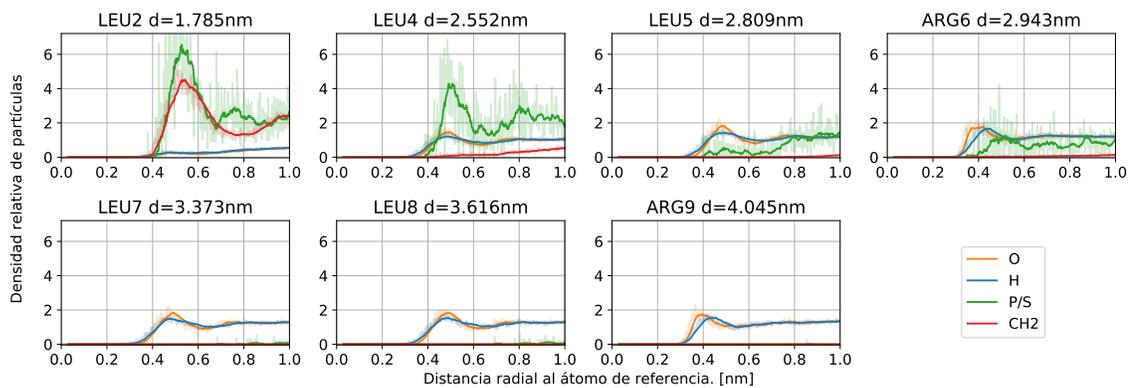
Para continuar la inmersión del péptido hacia dentro de la bicapa, éste tiene que superar una pequeña barrera de 18.1 kJ/mol (figura 35b). Examinar la simulación durante este *estado de transición* revela las interacciones responsables de esta barrera: Ambas argininas del péptido (ARG6 y ARG9) se encuentran en la capa de Stern de la interfase (figura 35a), sector donde se concentra una capa de iones sodio que



(a)



(b)



(c)

Figura 33: (a) Péptido TP1 con su centro de masa a 3.446 nm del centro de un mimético de membrana celular. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1

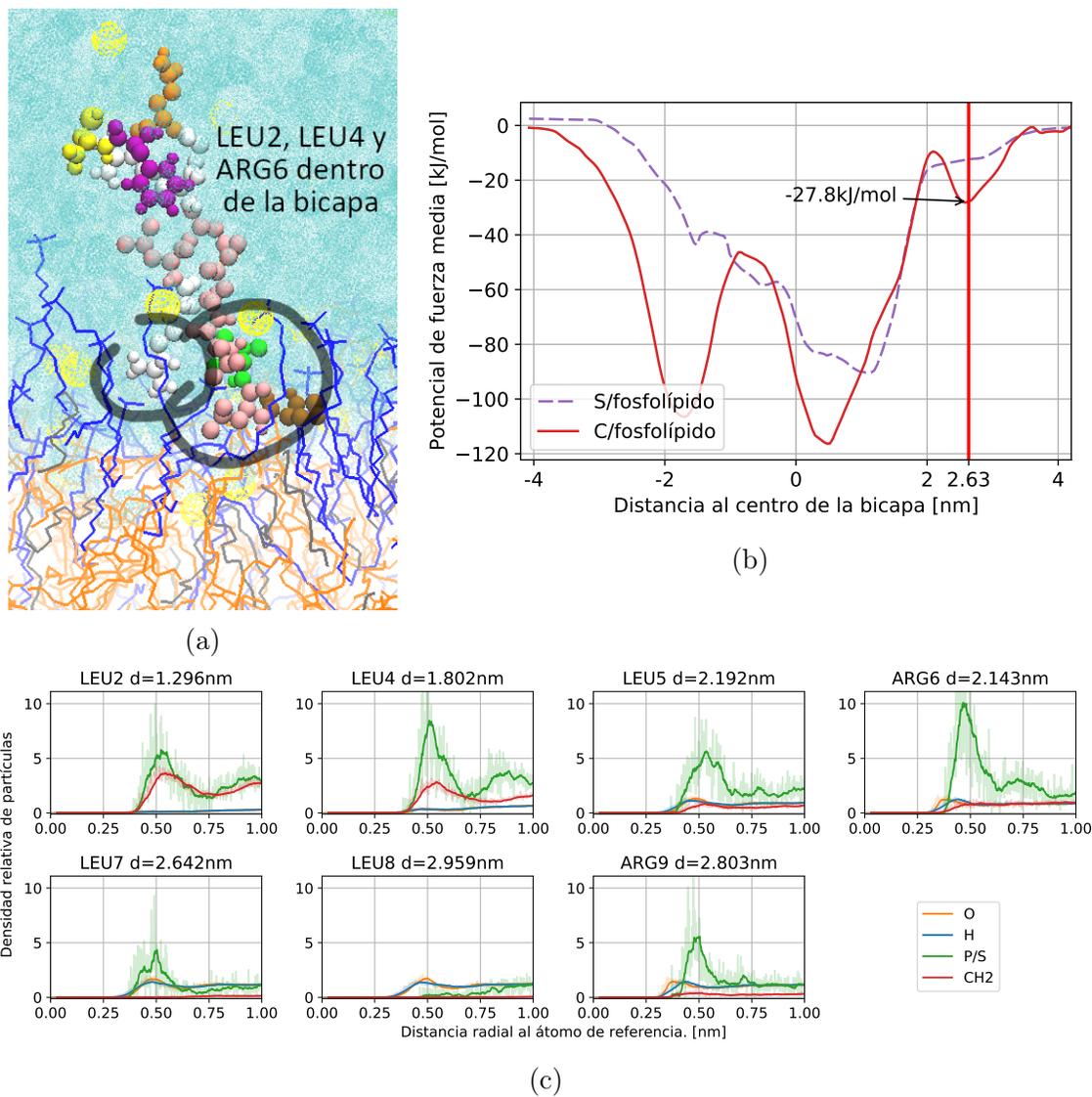


Figura 34: (a) Péptido con su centro de masa TP1 a 2.634 nm del centro de un mimético de membrana celular. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1

actúan como contra-iones de los componentes negativamente cargados de la bicapa. Por lo tanto, la arginina (positivamente cargada a pH fisiológico) se enfrentará a una interacción repulsiva con los iones sodio de este sector, y por esta razón surge la pequeña barrera energética.

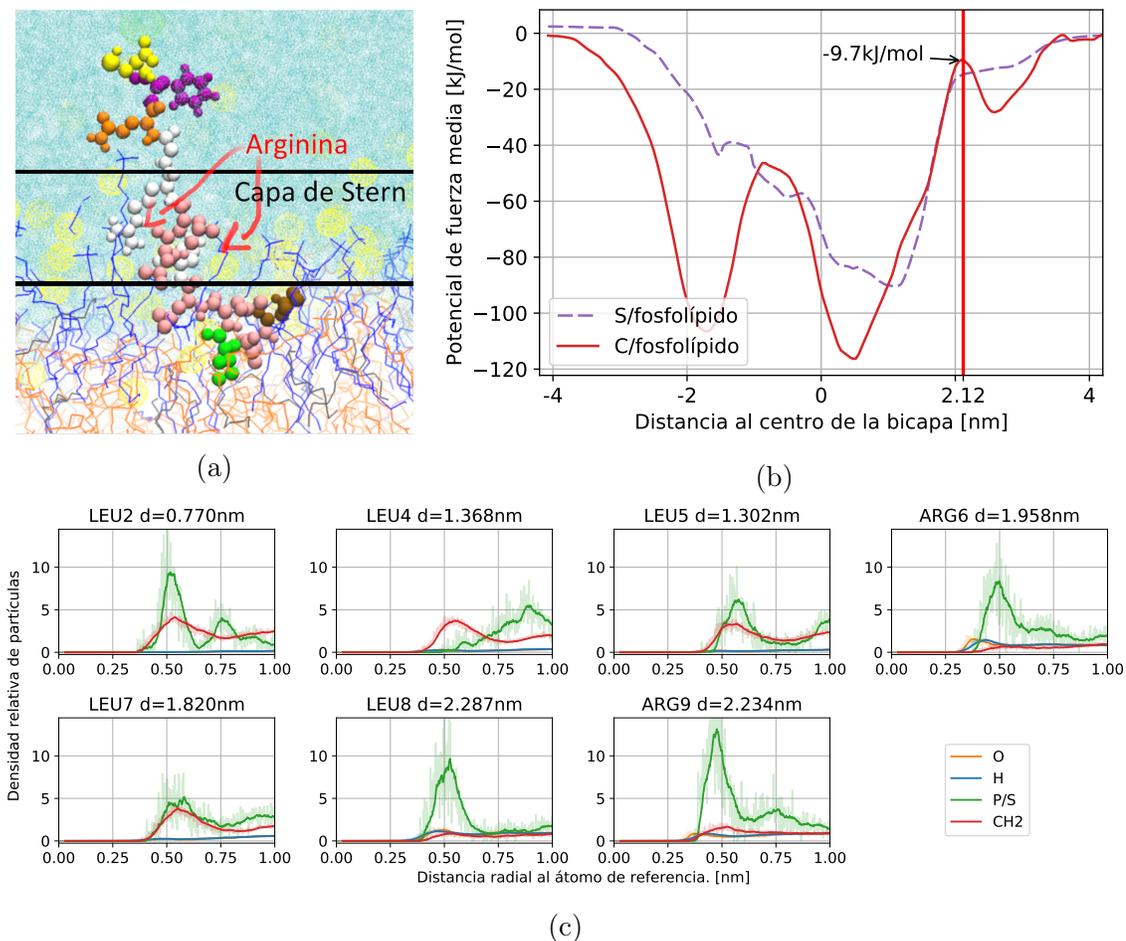


Figura 35: (a) Péptido TP1 con su centro de masa a 2.119 nm del centro de un mimético de membrana celular. En esferas amarillas se representan los radios de Van der Waals de sodio. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. Y en líneas (bajo la capa de Stern) se representan los componentes de la bicapa. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.

Tras superar la barrera energética, el péptido tiene dos posibles destinos depen-

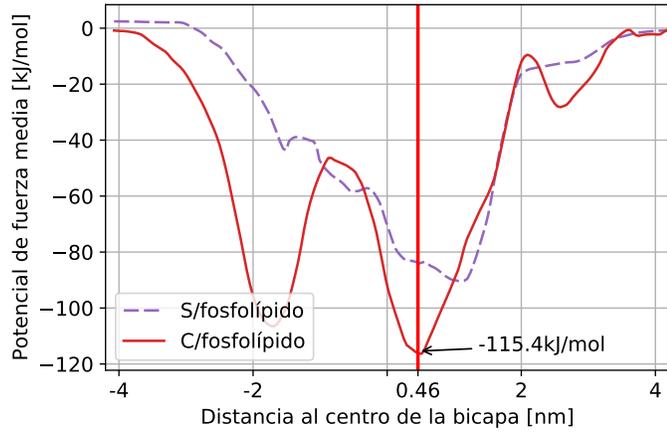
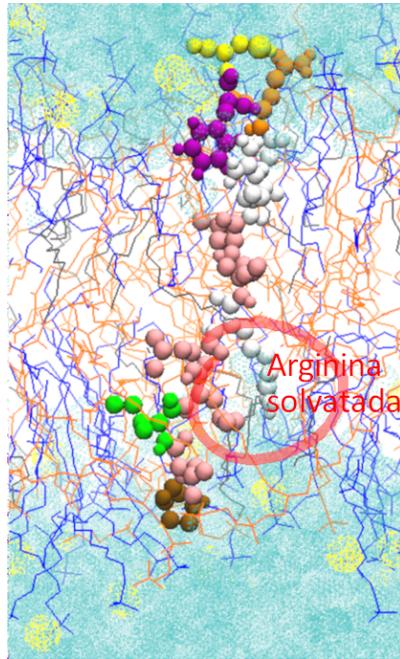
diendo si este ingresó a una bicapa rica en fosfolípido o a una sin este componente (e.g: una balsa lipídica). A continuación se describen ambos mecanismos: la ruta con fosfolípido en la sección 4.5.5 (pag. 70) y la ruta sin fosfolípido en la sección 4.5.6 (pag. 76).

4.5.5. Mecanismo de translocación: Mecanismo con fosfolípido

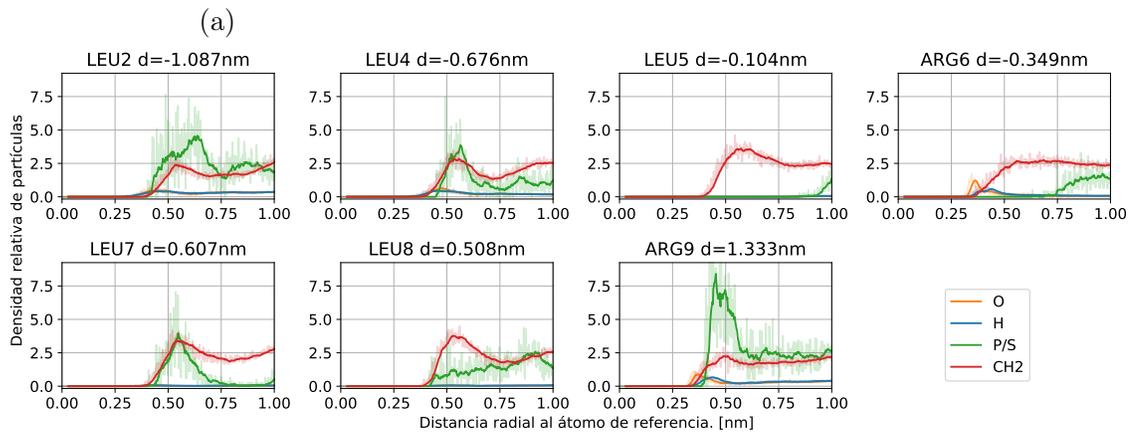
Habiendo las argininas atravesado la capa de Stern de la interfase, el péptido espontáneamente se integra con la membrana, alcanzando el mínimo global de potencial del mecanismo con una energía libre de $\Delta A = -115.4 \text{ kJ/mol}$ respecto al péptido en solución (figura 36b).

En este paso el péptido adopta una conformación elongada, abarcando de extremo a extremo de la bicapa (figura 36a). Esta orientación otorga gran estabilidad al péptido, ya que ambos extremos cargados están estabilizados con contra-iones en cada interfase: el carboxilo terminal estabilizado por iones sodio en la interfase de la hoja externa, y el amino terminal por los grupos fosfato en la interfase de la hoja interna. Las cadenas laterales del péptido también aportan a la estabilidad del mismo, todas las leucinas se encuentran interactuando fuertemente con los carbonos alifáticos de la bicapa (figura 36c), mientras que al mismo tiempo ambas argininas se encuentran solvatadas por partículas de agua, incluso la arginina-6, que a pesar de estar a solo 3.5 \AA del centro de la bicapa, se rodea de unas pocas partículas de agua que invaden la bicapa para interactuar con la arginina-6.

El péptido luego se enfrenta a una considerable barrera de potencial de $\Delta A^\ddagger = 69.0 \text{ kJ/mol}$ asociada a la translocación del péptido entre una hoja de la bicapa a la otra (figura 37b). Si bien, la translocación de las leucinas es aparentemente espontánea, el análisis de este *estado de transición* revela dos interacciones energéticamente desfavorables



(b)



(c)

Figura 36: (a) Péptido TP1 con su centro de masa a 0.459 nm del centro de un mimético de membrana celular. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. Y en líneas se representan los componentes de la bicapa. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.

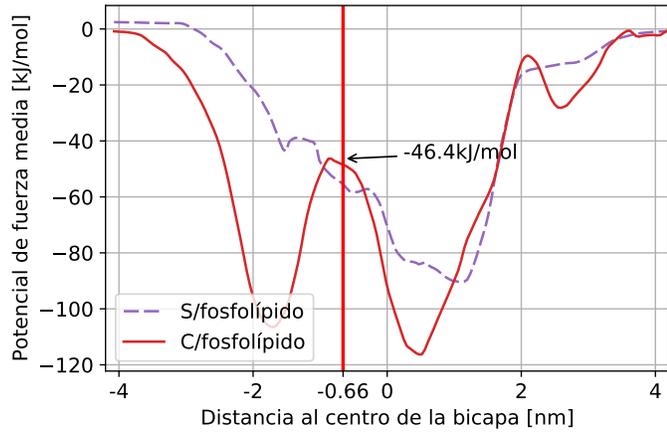
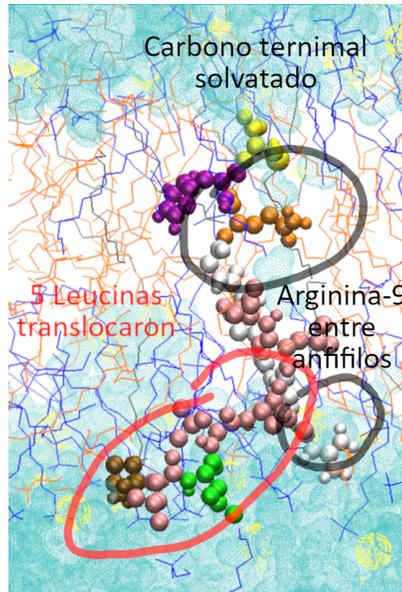
que explicarían esta barrera de potencial (figura 37a):

1. La arginina-9, que anteriormente se encontraba alojada en la interfase de la bicapa exterior, ahora se encuentra en medio de los carbonos alifáticos de la bicapa interior, sin partículas de agua ni contra-iones que solvaten su carga positiva.
2. El carbono terminal, a pesar de estar solvatado por partículas de agua y sodio, también se rodea de carbonos alifáticos hidrofóbicos de la bicapa.

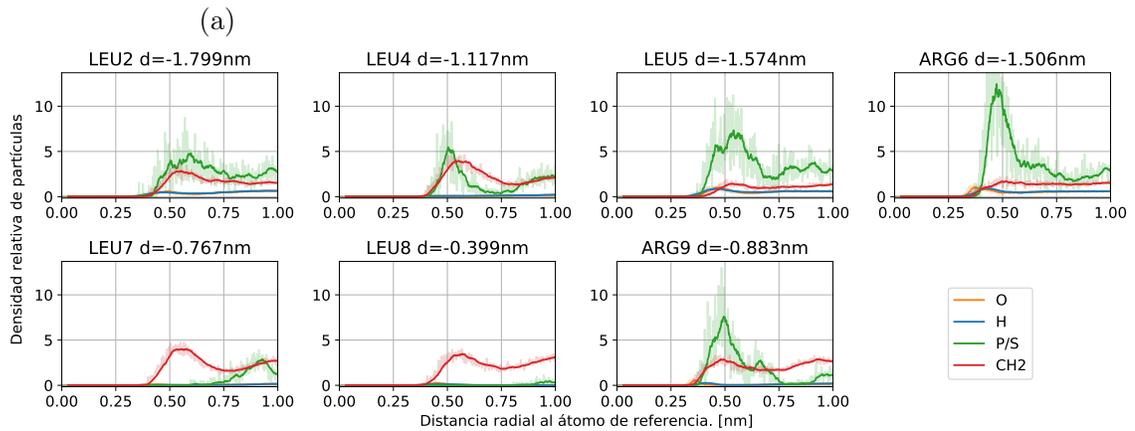
Ambas interacciones son repulsivas, y juntas son responsables de la barrera energética en este punto del mecanismo.

Una vez translocado el péptido hacia la hoja opuesta de la bicapa, éste se orienta de manera que alcanza un mínimo local en el perfil de potencial de $\Delta A = -105.8 \text{ kJ/mol}$ respecto al péptido en solución 38b. Esto se debe a que en esta conformación, todos los fragmentos cargados del péptido se encuentran solvatados en la interfase de alguna manera (figura 38a): El amino terminal y las argininas con los grupos fosfato, y el carboxilo terminal (negativamente cargado) con el grupo amino cuaternario de la fosfatidilcolina (positivamente cargado).

Finalmente, y para escapar de la bicapa luego de la translocación, el péptido debe adquirir una energía equivalente a la del pozo de potencial recién descrito ($\Delta A = -105.8 \text{ kJ/mol}$) para ingresar al contenido acuoso (e.g: citosol). Las últimas interacciones del péptido con la bicapa antes de esta eyección (figura 39a) fuerzan un reordenamiento de la estructura secundaria del péptido, restaurándolo espontáneamente a su estructura de alfa-hélice inicial (figura 40).



(b)



(c)

Figura 37: (a) Péptido TP1 con su centro de masa a -0.663nm del centro de un mimético de membrana celular. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. Y en líneas se representan los componentes de la bicapa. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.

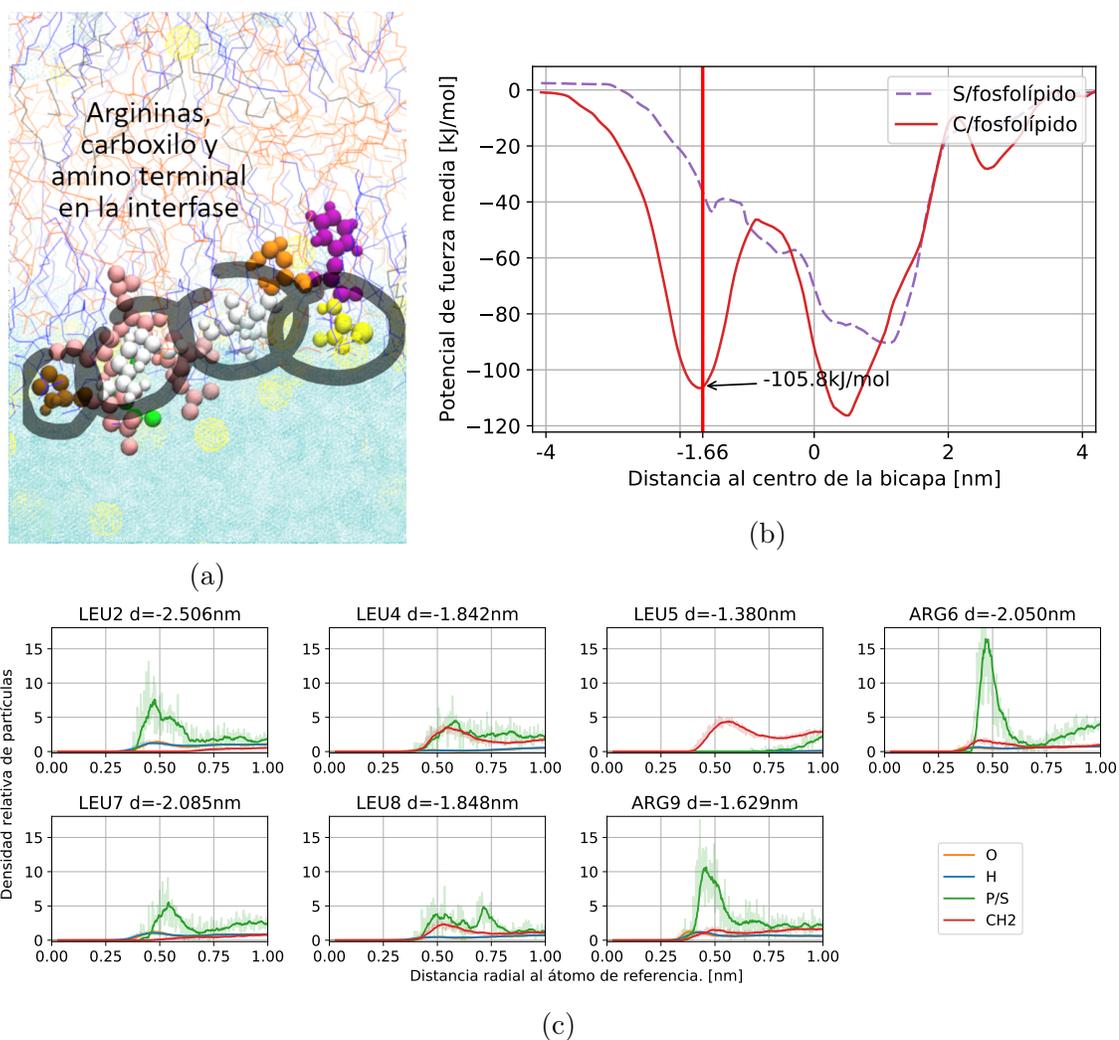


Figura 38: (a) Péptido TP1 con su centro de masa a -1.662 nm del centro de un mimético de membrana celular. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. Y en líneas se representan los componentes de la bicapa. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.

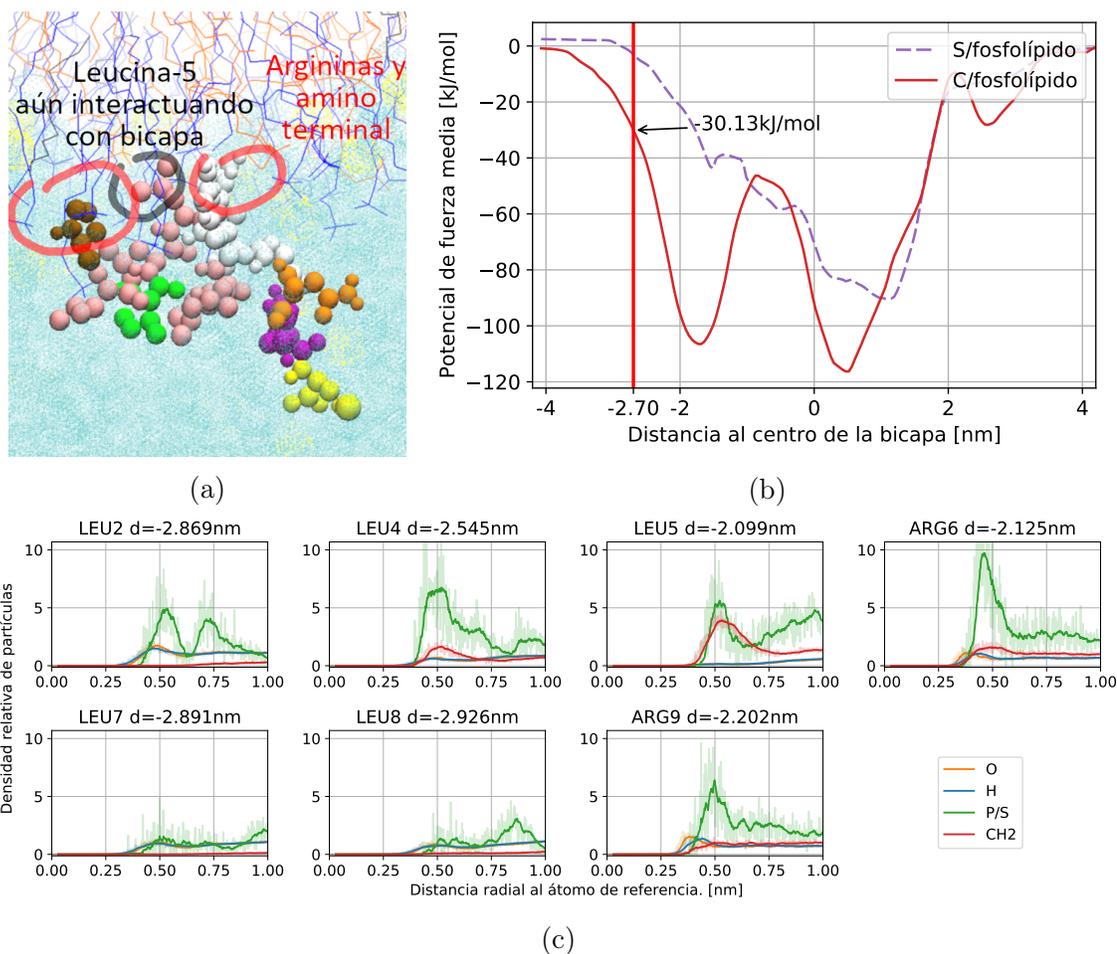


Figura 39: (a) Péptido TP1 con su centro de masa a -2.696 nm del centro de un mimético de membrana celular. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. Y en líneas se representan los componentes de la bicapa. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.

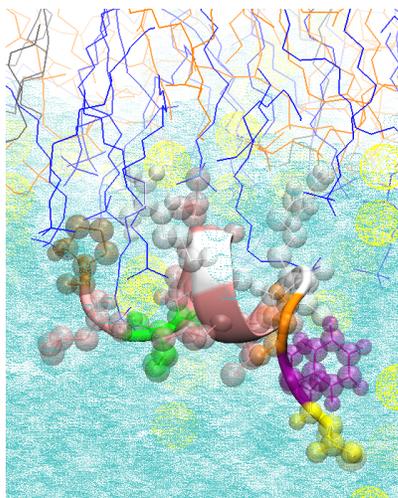


Figura 40: Péptido TP1 con su centro de masa a -2.696nm escapando de un mimético de membrana. En diagrama de cintas se representa el péptido TP1 y en líneas los componentes del mimético.

4.5.6. Mecanismo de translocación: Mecanismo sin fosfolípido

Cuando el péptido ingresa a una membrana sin fosfolípidos, la estructura en el mínimo global de potencial es completamente diferente respecto al mismo en una membrana con fosfolípidos. No solo el pozo es menos profundo ($\Delta A = -90.2\text{kJ/mol}$ vs. $\Delta A = -115.4\text{kJ/mol}$ en el caso con fosfolípido), sino que la conformación y posición del péptido también son diferentes. Al no haber grupos fosfato que interactúen con los fragmentos de arginina, el estiramiento del péptido de extremo a extremo de la bicapa ya no es energéticamente favorable.

En este pozo de potencial, todas las leucinas se encuentran rodeadas de carbonos de las cadenas hidrofóbicas de la bicapa, esto es energéticamente favorable considerando que la cadena lateral de leucina consiste en sólo carbonos, también hidrofóbicos (figura 41a). Al mismo tiempo, ambas argininas se encuentran estabilizadas por su ambiente: la arginina-6 por las cargas negativas del sulfato del SDS, y la arginina-9 por las cargas parciales del oxígeno del agua, que se orientan para solvatar el aminoácido (figura 41c)

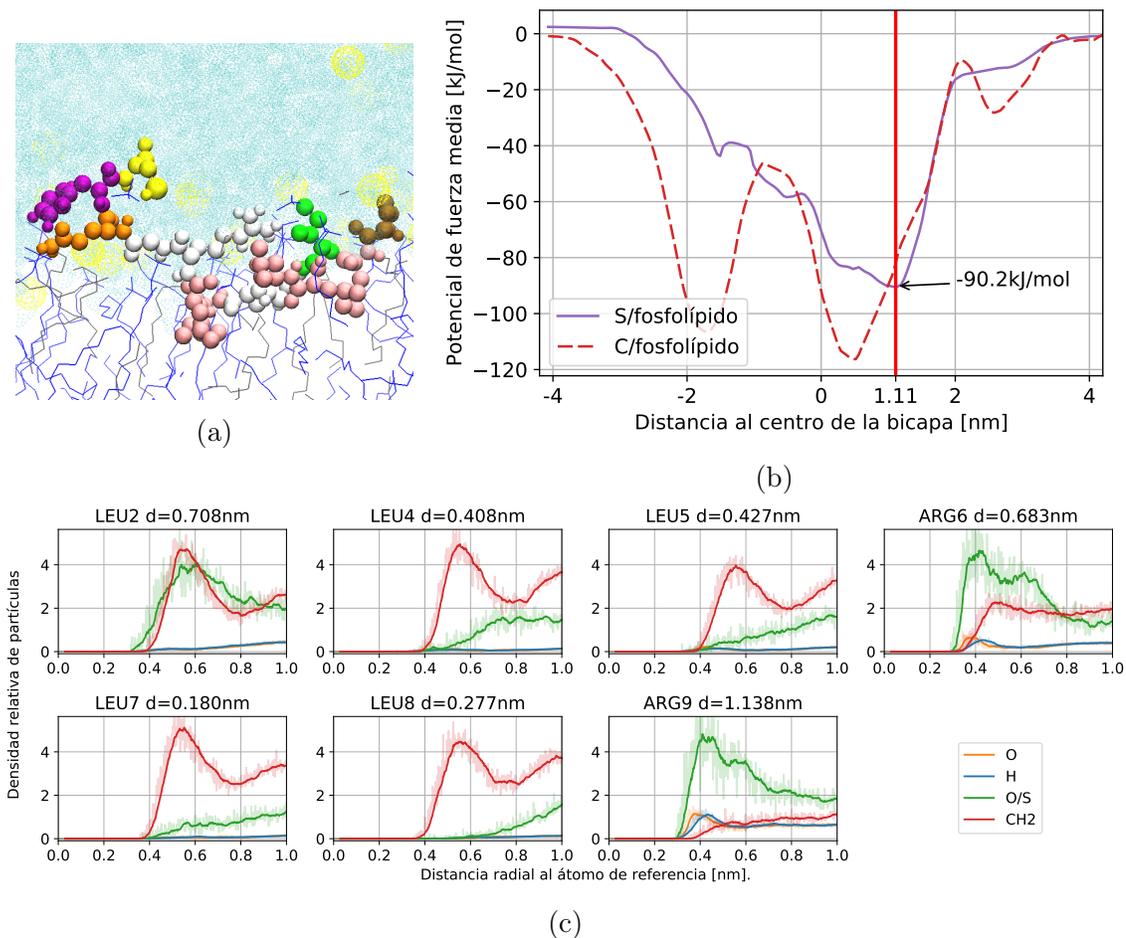


Figura 41: (a) Péptido TP1 con su centro de masa a 1.111 nm del centro de un mimético de membrana celular sin fosfolípido. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. Y en líneas se representan los componentes de la bicapa. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.

Para la tranlocación desde la hoja externa de la bicapa hacia la interna, es la arginina-9 la que inicia el proceso al solvatare con partículas de agua aun estando cercano al centro de la bicapa (a 4.2 Å, figura 42c), esto gracias a la formación de un *tunel de agua* desde la hoja interna de la bicapa que solvata los fragmentos cargados del péptido (figura 42a). Posterior a esto, las leucinas se transportan sin

dificultad hacia la hoja opuesta, y la arginina-6 se desprende de la interfase para quedar envuelta de los anfifilos que componen la bicapa. Todo este proceso tiene un costo energético de 33.0 kJ/mol respecto al mínimo global de potencial.

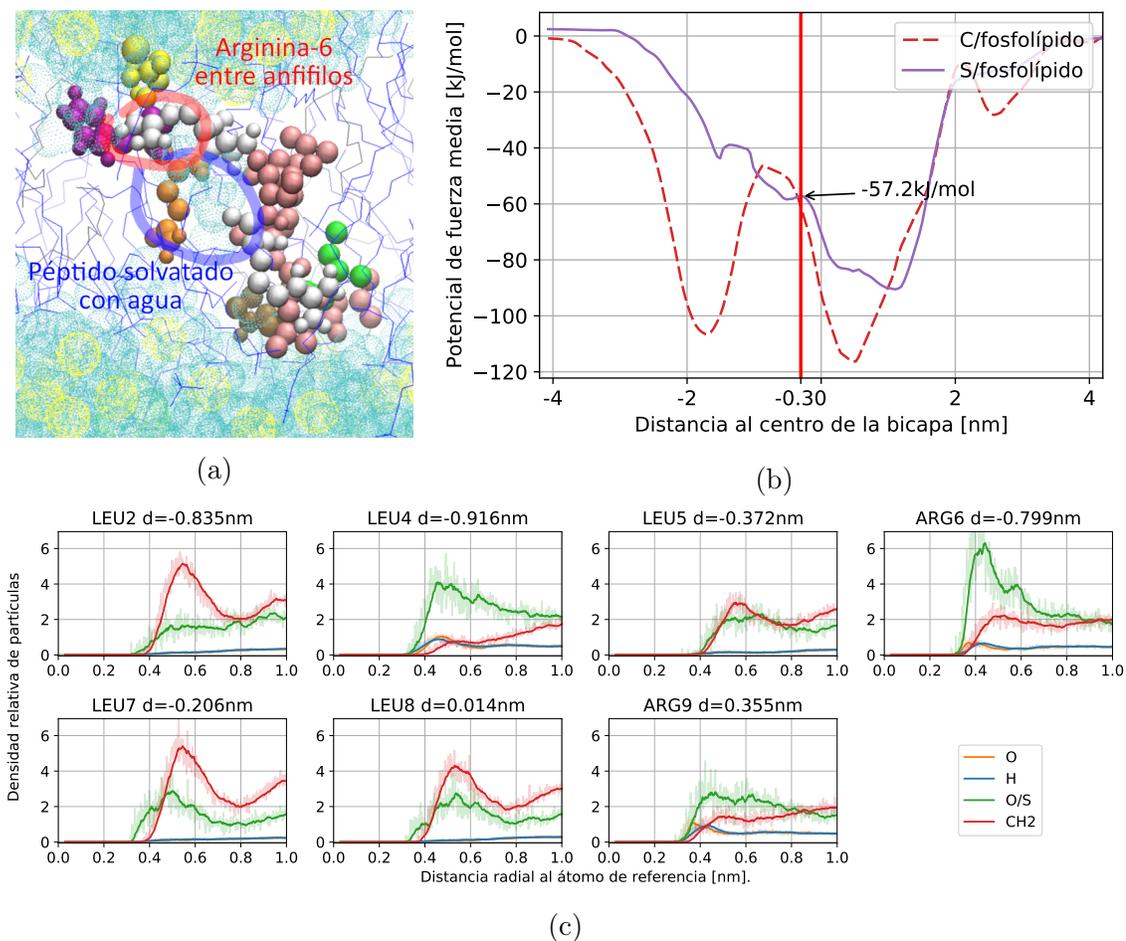


Figura 42: (a) Péptido TP1 con su centro de masa a -0.304 nm del centro de un mimético de membrana celular sin fosfolípido. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. En líneas se representan los componentes de la bicapa. Y en esferas semitransparentes celestes se representan las partículas de agua. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.

Al finalizar la translocación a la hoja opuesta de la bicapa, la deformación en la bicapa que produjo el *tunnel de agua* aun persiste. Por esta razón, es que las argini-

nas interactúan fuertemente con las cabezas de los anfifilos, aun estando a tan solo -1.16 nm del centro de la bicapa (figura 43c). Es también, por esta misma razón, que a pesar de las interacciones favorables del péptido con su entorno, es que este punto es un equilibrio inestable y no un mínimo local de potencial (figura 43b), ya que la arginina-9 puede regresar hacia dentro de la bicapa mediante este *tunel de agua* para revertir la translocación

No obstante, si la bicapa recupera su estructura donde antes existía este *tunel de agua*, el péptido puede ser eyectado hacia el contenido acuoso. Y nuevamente las últimas interacciones del péptido con la interfase de la bicapa (ARG6 en figura 44c) provocan que éste restaure espontáneamente su estructura de alfa-hélice (figura 44a)

4.6. Estudio experimental de la conformación en equilibrio

De acuerdo a los resultados obtenidos en simulación, la interacción entre el péptido TP1 y la bicapa es más fuertemente atractiva cuando esta última posee fosfolípidos en su contenido. Se preparó un mimético de membrana según la composición expuesta en la tabla 5 (Pag. 49) sin añadir el fosfolípido y con 11.8 mg de péptido TP1. A esta muestra se le añadió fosfolípidos progresivamente y se tomaron imágenes de microscopía de luz polarizada en cada etapa.

Antes de añadir fosfolípido, las imágenes de microscopía del mimético con TP1 presentan un patrón tipo *Schlieren* (figura 45a), esto es indicativo de que el mimético se encuentra en una fase nemática liotrópica (e.g.: una fase de bicelas).

Al superar el umbral de 4 % en masa de fosfolípido, la formación de un cristal líquido nemático deja de ser espontáneo tras mezclar sus componentes y en su lugar se forma una fase gel esméctico con características de sólido. Esto sólo ocurre cuando existe péptido TP1 en la composición de la fase, por lo que este resultado confirma la pre-

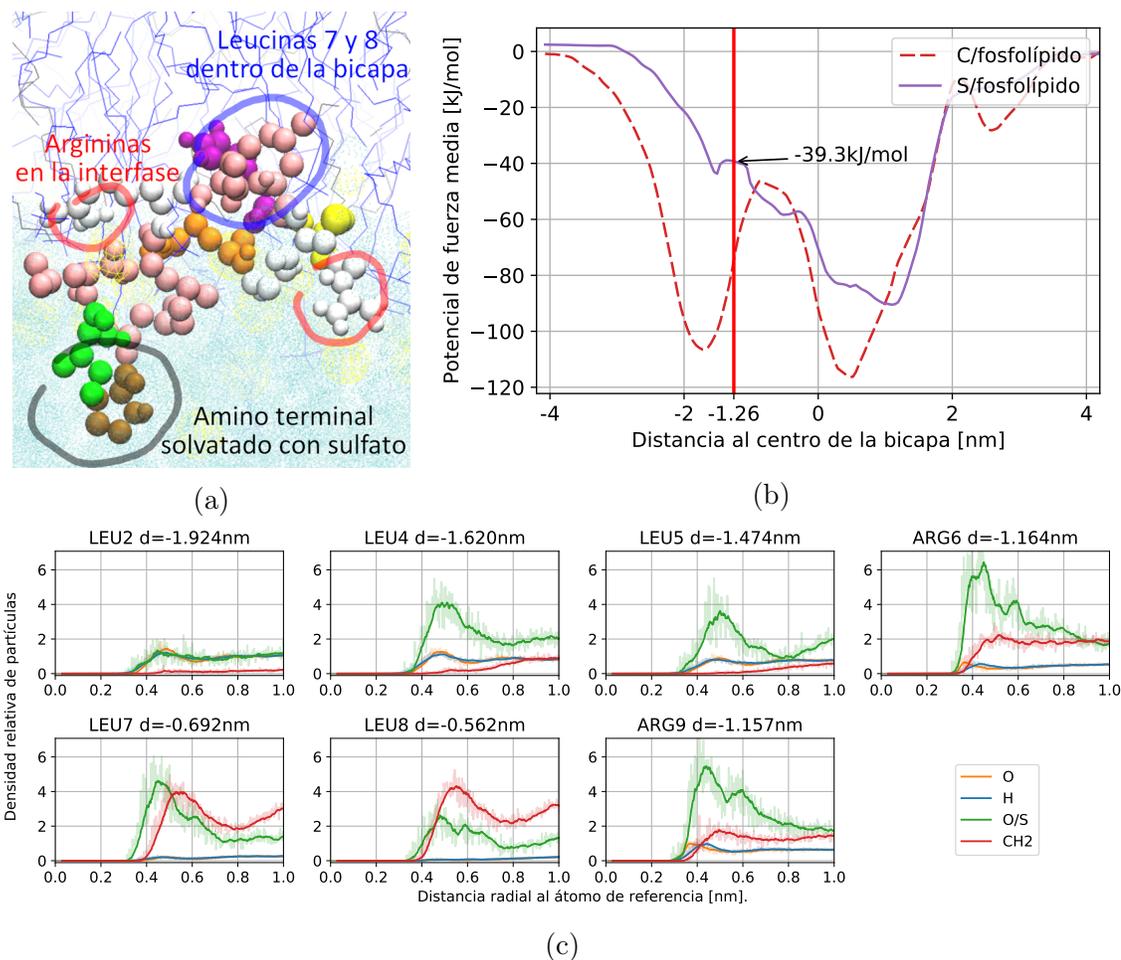


Figura 43: (a) Péptido TP1 con su centro de masa a -1.268 nm del centro de un mimético de membrana celular sin fosfolípido. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. En líneas se representan los componentes de la bicapa. Y en esferas semitransparentes amarillas y anaranjadas se representan las partículas de sodio y sulfato respectivamente. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.

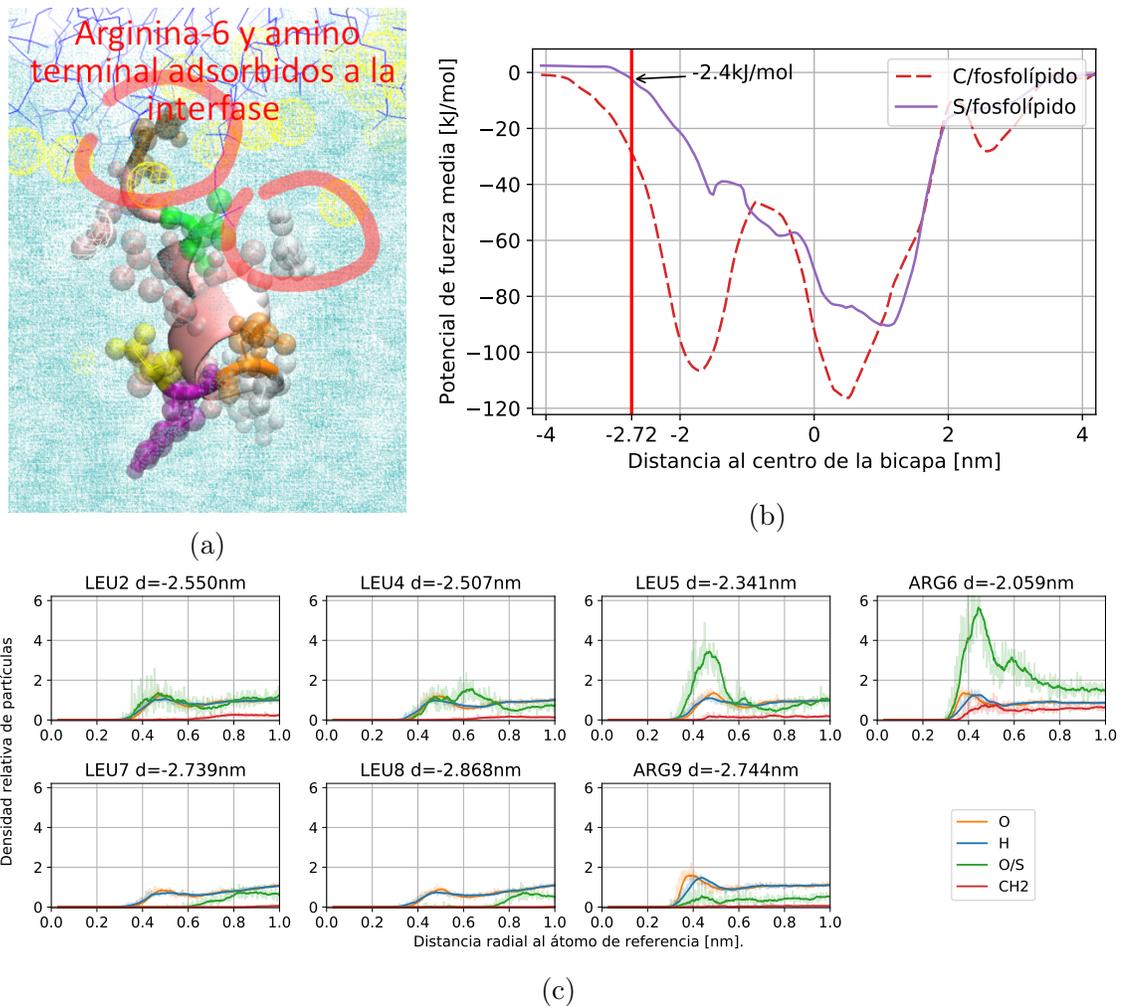


Figura 44: (a) Péptido TP1 a -2.722 nm del centro de un mimético de membrana celular sin fosfolípido. En diagrama de esferas y líneas se representa el péptido TP1. En líneas se representan los componentes de la bicapa. Y en esferas semitransparentes amarillas y anaranjadas se representan las partículas de sodio y sulfato respectivamente. (b) Perfil de potencial del péptido TP1 translocando un mimético de membrana con y sin fosfolípido. (c) Funciones de distribución radial (RDF) de fragmentos de leucina y arginina en péptido TP1.

misa presentada por los resultados de simulación: la interacción entre el péptido TP1 y la bicapa es significativamente más fuerte cuando esta última posee fosfolípidos en su composición, ya que esta condición es necesaria para formar la firme estructura que es la fase gel de tipo esméctica (figura 45b).

Para estudiar la estructura en equilibrio del péptido TP1 en una membrana ausente

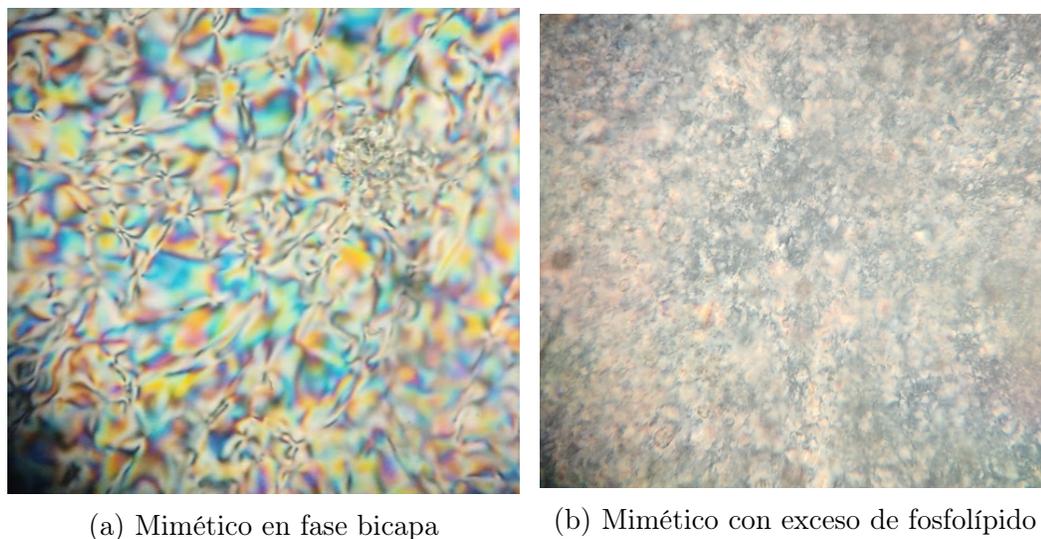


Figura 45: Microscopía de luz polarizada de miméticos de membrana con péptido TP1 y (a) baja concentración de fosfolípido y (b) exceso de fosfolípido.

de fosfolípido, se recurrió al uso de péptidos TP1 deuterados para insertar en una muestra de mimético y sondear su dinámica orientacional mediante ^2H -RMN. Antes de sintetizar 5 copias del péptido TP1 con marcas deuteradas en distintas posiciones, se evaluó la viabilidad de la técnica incluyendo un péptido deuterado en todas sus leucinas en una muestra de membrana sin fosfolípido. Los resultados de este ensayo están expuestos en la figura 46.

El resultado de este ensayo fue exitoso, no solo se aprecian señales atribuibles al péptido TP1 en la región entre -3kHz y 3kHz , sino que también se aprecia con claridad una señal altamente desdoblada ($\Delta\nu = 16,5\text{kHz}$) que se asigna al 1-decanol- $\alpha\text{-d}_2$ añadido a la composición de la membrana.

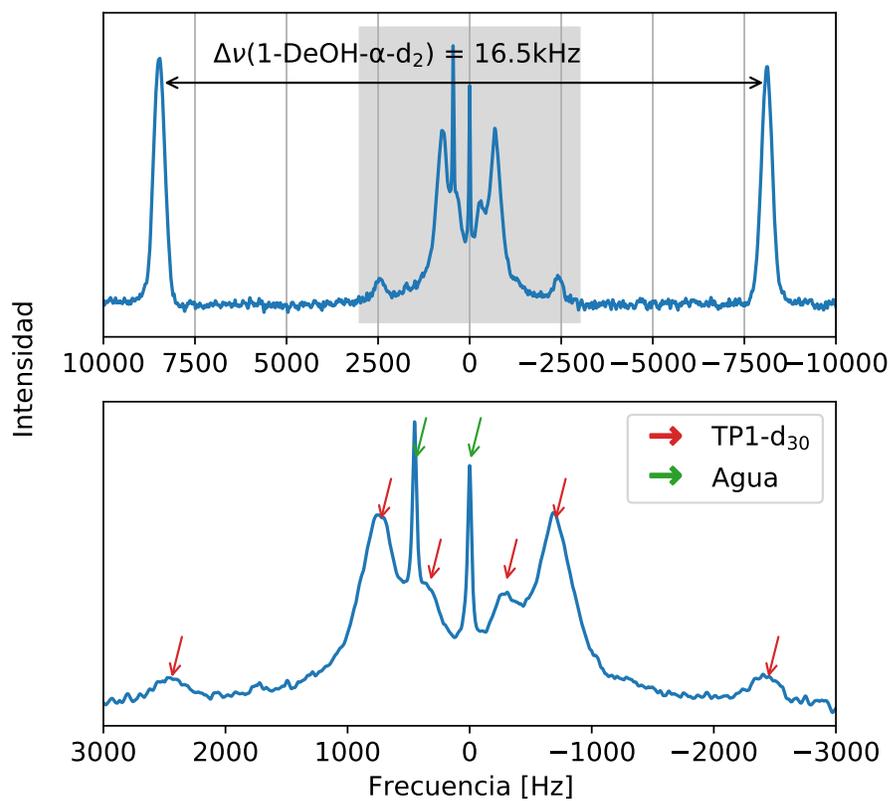


Figura 46: Espectro ^2H -RMN de péptido TP1-d₃₀ con marcas deuteradas en sus cinco leucinas. El gráfico superior corresponde al espectro completo, la zona gris corresponde a la zona expandida en el gráfico inferior. Esta ampliación hecha al gráfico completo fue para mostrar sólo las señales atribuibles al péptido TP1. En ésta, con flechas rojas se destacan las señales asignadas al péptido deuterado, mientras que con flechas verdes se destacan aquellas asignadas al HDO producto de la abundancia natural de deuterio.

Esta marca deuterada al 1-decanol fue añadida para verificar la prevalencia de la fase como bicapa. De haberse perdido la fase de bicapa, las señales del 1-decanol- α -d₂ se habrían apreciado menos intensas y similares a un diagrama de polvo (como el espectro en rojo de la figura 17, pag. 50). Este no fue el caso, y las señales desdobladas se aprecian ambas intensas y bien definidas, confirmando que la presencia de TP1 no destruye la estructura de bicapa.

Adicionalmente, se encontraron tres pares de señales atribuibles a los residuos de leucina del péptido que posee cinco leucinas. Esto significa que habrán dos pares de leucinas con el mismo desdoblamiento, y por lo tanto, la misma dinámica orientacional.

Dado que se confirma que es posible obtener espectros ²H-RMN del péptido, se sintetizaron cuatro copias del péptido TP1, cada una deuterada en los metilos terminales de una de sus leucinas, obteniendo TP1-LEU4-d₃, TP1-LEU5-d₃, TP1-LEU7-d₃ y TP1-LEU8-d₃. Estos péptidos marcados fueron agregados cada uno a una muestra de mimético de membrana para tomar espectros ²H-RMN. Los resultados de estos espectros se exponen en la figura 47.

De los resultados espectroscópicos se observa que las leucinas contiguas tienen comportamientos similares: ambas leucinas 4 y 5 tienen dos pares de señales con desdoblamientos similares, mientras que las leucinas 7 y 8 ambas poseen un sólo desdoblamiento de 1.4 kHz y 1.5 kHz respectivamente. Este resultado coincide con lo obtenido en la simulación del péptido TP1 inmerso en una membrana sin fosfolípido, en el pozo de potencial (figura 41, pag. 77). En esta simulación las leucinas contiguas se ubican en profundidades similares de la bicapa: ambas leucinas 4 y 5 a 0.408 nm y 0.427 nm del centro de la bicapa respectivamente; mientras que las leucinas 7 y 8

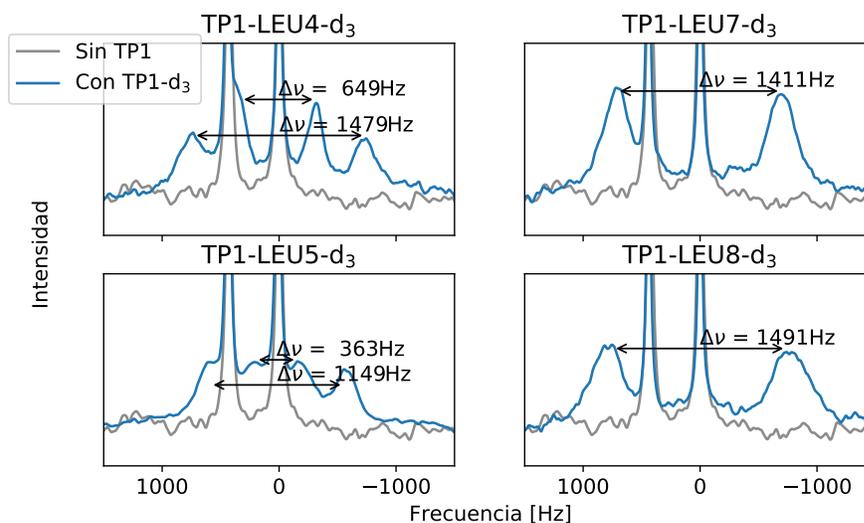


Figura 47: Espectros ^2H -RMN de péptidos TP1 deuterados en una de sus leucinas, dentro de un mimético de membrana sin fosfolípido.

se encuentran a 0.180 nm y 0.227 nm desde el centro de la bicapa respectivamente.

Respecto a la leucina-2, para obtener información acerca del desdoblamiento cuadrupolar de su marca deuterada, se sumaron los espectros de los péptidos marcados en sus leucinas 4, 5, 7 y 8 (figura 47) y se comparó este resultado con el espectro del péptido TP1 deuterado en todas sus cinco leucinas (figura 46). De este modo, la señales en este último espectro que no se aprecien en el primero, deberán pertenecer a la marca deuterada en la leucina-2 del péptido TP1. Esta comparación es expuesta en la figura 48.

De esta comparación se aprecia que, en el péptido completamente deuterado, existe un par de señales que no aparece con los péptidos deuterados en sus leucinas 4, 5, 7 u 8. Por lo tanto deben pertenecer a la única otra leucina deuterada en el péptido: la leucina-2.

El par de señales desdobladas asignadas a la leucina-2 posee un desdoblamiento

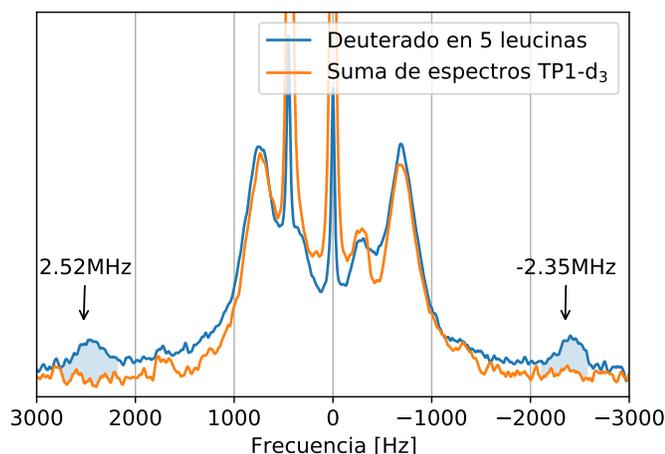


Figura 48: Comparación de espectro ^2H -RMN de péptido TP1 deuterado en sus cinco leucinas (en azul), y suma de espectros con las mismas características del péptido deuterado en sus posiciones 4, 5, 7 y 8 (en anaranjado). La diferencia entre ambos corresponde a la señal desdoblada de la leucina-2 del péptido en la membrana.

($\Delta\nu = 4.87 \text{ kHz}$) bastante más alto y diferente al resto de las leucinas. Este comportamiento diferente también se repite en la simulación del péptido TP1 en la bicapa sin fosfolípido, donde la leucina-2 es la única más cercana a la interfase y a las cabezas polares de los anfifilos (a 0.708 nm del centro de la bicapa)

Para poder relacionar estos resultados espectroscópicos con la posición y orientación de cada leucina en la bicapa, se simuló el péptido mediante dinámica molecular en múltiples orientaciones y profundidades de la bicapa al azar, totalizando 51 simulaciones de 40 ns cada una con una conformación diferente. Se calculó el parámetro de orden (y el subsecuente desdoblamiento cuadrupolar) de cada una de las leucinas simuladas y se compararon estos datos con los obtenidos experimentalmente para clasificar qué simulación se acercó más a lo encontrado en la espectroscopía. Estos resultados se exponen a continuación.

4.6.1. Leucina-2: Posición y orientación promedio.

De todas las variaciones simuladas, se encontró que la posición de la leucina-2 que más se asemeja a lo encontrado experimentalmente es a 1.01(14) nm del centro de la bicapa, esto es, entre los carbonos hidrofóbicos de la bicapa. En simulación, se encontró un parámetro de orden para los enlaces carbono-deuterio de -0.0371 , que implica un desdoblamiento cuadrupolar de -4729 Hz, cercano al desdoblamiento experimental de 4870 Hz

Para evaluar la orientación promedio de la leucina en esta conformación se calculó un histograma del ángulo formado entre el enlace del carbono β y γ de la leucina y el eje normal de la bicapa (ver figura 49). De este modo, un ángulo de 0° o 180° significa que la cadena de carbonos de la leucina se encuentra paralela a las cadenas de la bicapa, mientras que un ángulo de 90° significa que la cadena lateral de la leucina se encuentra perpendicular a las cadenas alifáticas de la bicapa.

El histograma de este ángulo (figura 50) revela que la leucina-2 en equilibrio posee una relativa libertad de movimiento en esta posición, prefiriendo levemente orientarse a 60° del vector normal de la bicapa, pero siendo capaz de adoptar cualquier orientación entre 0° y 140° .

4.6.2. Leucina-4: Posición y orientación promedio

En el espectro ^2H -RMN de TP1-LEU4- d_3 se observaron dos señales desdobladas asignables a la marca deuterada en la cadena lateral de leucina-4. Esto significa que, a 310 K, esta cadena lateral posee dos posiciones favorables. No obstante estas posiciones favorables son lo suficientemente estables como para que la cadena lateral permanezca en sólo una de ambas durante un pulso en RMN (22.4 μs en este caso), es por esta razón que ambas posiciones aparecen como dos desdoblamientos.

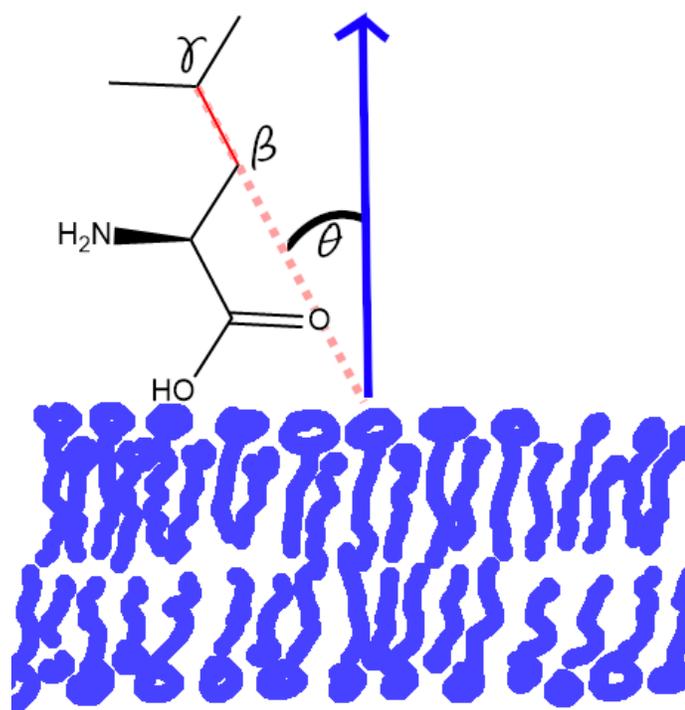
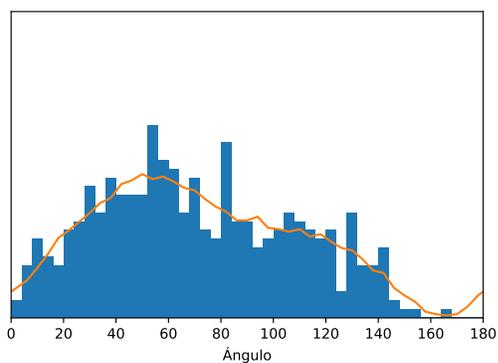


Figura 49: Ángulo (θ) entre el enlace del carbono β y γ de una leucina y el eje orientador de la bicapa.

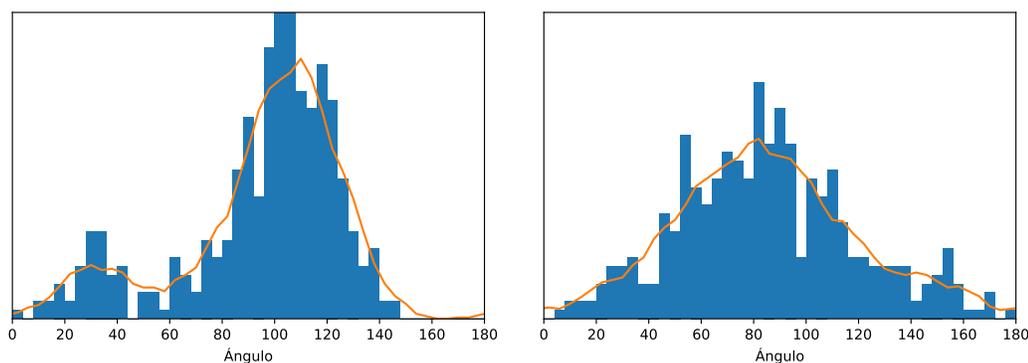


Leu-2 a 1.01(14) nm
 $\Delta\nu(\text{simulado}) = -4729 \text{ Hz}$

Figura 50: Histograma de ángulos entre el enlace del carbono β y γ de la leucina-2 en el péptido TP1 simulado que reproduce resultados experimentales en espectroscopía ^2H -RMN.

Las dos señales desdobladas de esta leucina poseen desdoblamientos de 649 Hz y 1479 Hz. Los resultados de simulación indican que estos desdoblamientos corresponden a una distancia de 1.61(9) nm (En la capa de Stern de la interfase) y 2.40(25) nm desde el centro de la bicapa (en la capa difusa de la interfase) respectivamente.

Esta cadena lateral no solo alterna entre posiciones respecto a la bicapa, sino que al

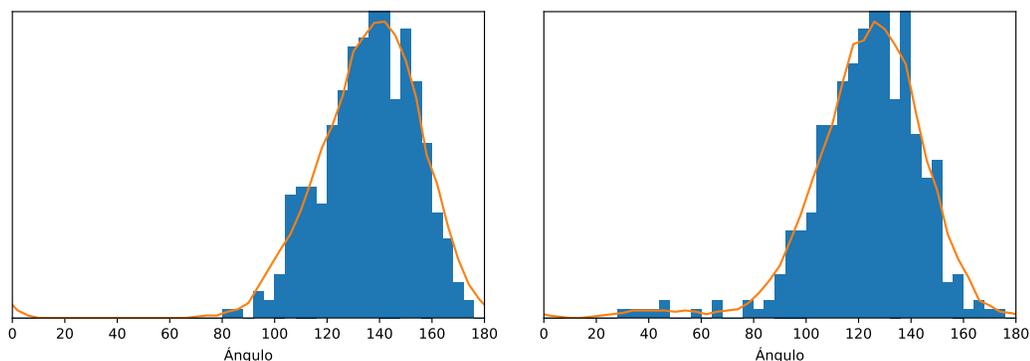


(a) Leu-4 a 1.61(9) nm
 $\Delta\nu(\text{simulado}) = -752$ Hz

(b) Leu-4 a 2.40(25) nm
 $\Delta\nu(\text{simulado}) = 1430$ Hz

Figura 51: Histogramas de ángulos entre el enlace del carbono β y γ de la leucina-4, en sus dos orientaciones, en el péptido TP1 simulado que reproduce resultados experimentales en espectroscopía ^2H -RMN.

moverse, ésta adopta diferentes dinámicas orientacionales. Al estar ésta en la capa de Stern, la leucina se orienta a 110° de la bicapa permitiéndose una movilidad de $\pm 30^\circ$. No obstante, cuando el aminácido se aleja de la bicapa para posicionarse en la capa difusa, no solo la leucina cambia su posición prevalente a 80° , sino que su dinámica orientacional gana más libertad. Esto último, se debe a que, en la capa difusa, la interacción de la leucina con la bicapa es más débil, por lo que existen menos restricciones para la rotación de la cadena lateral en esta posición.



(a) Leu-5 a 1.28(9) nm
 $\Delta\nu(\text{simulado}) = -122 \text{ Hz}$

(b) Leu-5 a 0.51(11) nm
 $\Delta\nu(\text{simulado}) = 1170 \text{ Hz}$

Figura 52: Histogramas de ángulos entre el enlace del carbono β y γ de la leucina-5, en sus dos orientaciones, en el péptido TP1 simulado que reproduce resultados experimentales en espectroscopía ^2H -RMN.

4.6.3. Leucina-5: Posición y orientación promedio

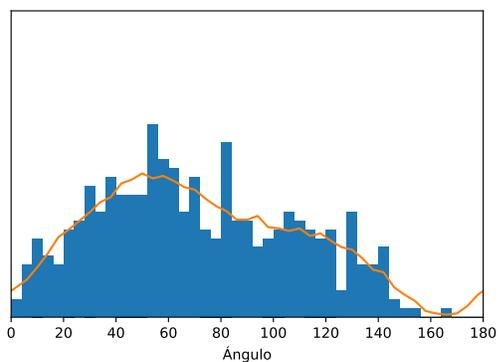
En el espectro ^2H -RMN de TP1-LEU5- d_3 , al igual que cuando se marcaba la leucina-4, se aprecian dos desdoblamientos asignables a las marcas deuteradas de leucina-5, dos pares de señales desdobladas a 363 Hz y 1149 Hz. Esto, al igual que con leucina-4, se debe a que esta cadena lateral posee dos posiciones estables. Los resultados de simulación revelan que estas dos posiciones son:

- A 1.28(9) nm del centro de la bicapa. Esta posición corresponde al par de señales 363 Hz desdoblada, habiendo simulado un desdoblamiento de 122 Hz. A esta distancia del centro de la bicapa, la leucina-5 se encuentra dentro de la bicapa y entre los primeros carbonos de las cadenas hidrofóbicas que la componen. De acuerdo a lo observado en el histograma de ángulos de la cadena lateral (figura 52a), la cadena se orienta fuertemente a 140° de la normal de la bicapa con una limitada movilidad de $\pm 40^\circ$.
- A 0.51(11) nm del centro de la bicapa. Esta posición corresponde al par de señales 1149 Hz desdoblada, habiendo simulado un desdoblamiento de 1170 Hz.

A esta distancia, la leucina-5 se encuentra entre los carbonos centrales de las cadenas alifáticas que componen la bicapa. Según lo que indica el histograma de ángulos de la cadena lateral (figura 52b), su orientación no varía significativamente respecto a su otra posición posible, manteniéndose fuertemente orientada a 130° con una movilidad de $\pm 40^\circ$.

En ambos casos, la movilidad de la leucina-5 es relativamente reducida. Esto se debe a que en ambas posiciones existe una interacción atractiva de similar magnitud entre la leucina-5 y los componentes de la bicapa.

4.6.4. Leucina-7: Posición y orientación promedio



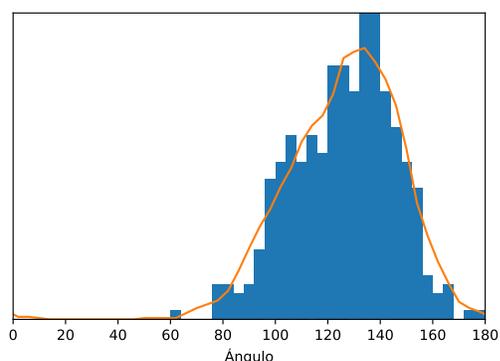
Leu-7 a 2.01(21) nm
 $\Delta\nu(\text{simulado}) = 1475 \text{ Hz}$

Figura 53: Histograma de ángulos entre el enlace del carbono β y γ de la leucina-7 en el péptido TP1 simulado que reproduce resultados experimentales en espectroscopía ^2H -RMN.

Del total de simulaciones, la que reproduce con mayor cercanía el desdoblamiento cuadrupolar observado de 1411 Hz lo hace simulando un desdoblamiento de 1475 Hz. Esta simulación ubica a la leucina-7 a 2.01(21) nm desde el centro de la bicapa. En esta posición, la leucina-7 se encuentra en la capa de Stern de la interfase, interactuando con las cabezas de los anfifilos de la bicapa y los primeros carbonos de sus

cadena alifáticas. Respecto a la orientación de la cadena lateral, el histograma de ángulos de ésta (figura 53) revela que si bien la cadena lateral tiene una preferencia a orientarse a 60° respecto al normal de la bicapa, ésta también tiene libertad para orientarse entre 0° y 140° . Esta libertad se debe a que, en la capa de Stern, la leucina tiene pocas interacciones atractivas con la bicapa que puedan restringir su rotación.

4.6.5. Leucina-8: Posición y orientación promedio



Leu-8 a $0.72(11)$ nm
 $\Delta\nu(\text{simulado}) = -1275$ Hz

Figura 54: Histograma de ángulos entre el enlace del carbono β y γ de la leucina-8 en el péptido TP1 simulado que reproduce resultados experimentales en espectroscopía ^2H -RMN.

La simulación que mejor reprodujo el desdoblamiento cuadrupolar experimental de 1491 Hz, lo hizo simulando un desdoblamiento de -1275 Hz. La simulación ubica a la cadena lateral de leucina-8 a $0.72(11)$ nm del centro de la bicapa. Esta distancia significa que la cadena lateral se encuentra entre los carbonos centrales de las cadenas alifáticas que componen la bicapa. Al poder interactuar atractivamente con la bicapa, la cadena lateral se orienta preferentemente a 130° respecto a la normal de la bicapa con una movilidad reducida de $\pm 40^\circ$ (ver figura 54)

4.6.6. Estructura del péptido TP1 en equilibrio

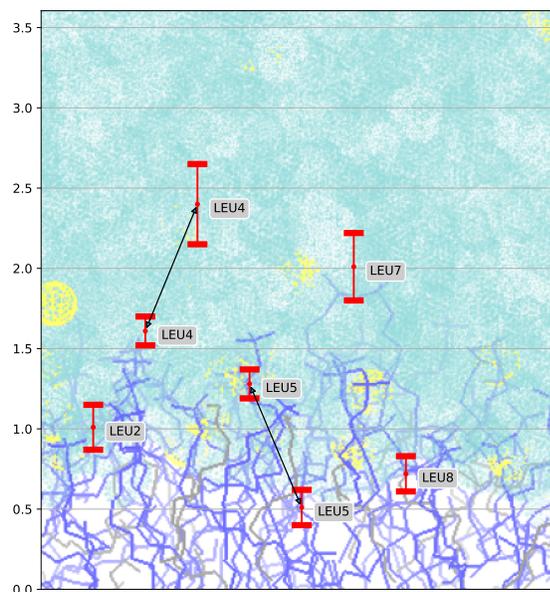


Figura 55: Posición probable de las cadenas laterales de leucina en péptido TP1 inmerso en mimético de membrana.

Tabla 6: Desdoblamientos cuadrupolares experimentales y obtenidos en simulación.

Residuo	$\Delta\nu$ exp. [Hz]	$\Delta\nu$ simul. [Hz]
Leucina-2	4870	-4729
Leucina-4 (1)	649	-752
Leucina-4 (2)	1479	1430
Leucina-5 (1)	363	122
Leucina-5 (2)	1149	1170
Leucina-7	1411	1475
Leucina-8	1491	-1275

Al compilar todas las posiciones ajustadas anteriormente (figura 55), se puede apreciar que en equilibrio, el péptido se encontrará en una de las hojas de la bicapa y parcialmente inserto en él. Esto es similar a lo que se encuentra en el mínimo de energía al recrear el perfil de potencial al translocar el péptido a través de la bicapa (figura 41, pag. 77). Este resultado, también coincide con lo observado en el ensayo preliminar con RMN (sección 4.5, pag. 59), por lo que se considerarán estos

resultados como validados.

Referencias

- [1] Ruiz-Fernández, A. R.; López-Cascales, J. J.; Giner-Casares, J. J.; Araya-Maturana, R.; Díaz-Baños, F. G.; Muñoz-Gacitúa, D.; Weiss-López, B. E. Effect of shape and bending modulus on the properties of nematic lyotropic liquid crystals. *RSC Advances* **2016**, *6*, 7455–7464.
- [2] Porasso, R. D.; Bennett, W. F.; Oliveira-Costa, S. D.; Cascales, J. J. Study of the benzocaine transfer from aqueous solution to the interior of a biological membrane. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**,
- [3] Muñoz-Gacitúa, D.; Monroy-Cárdenas, M.; Araya-Maturana, R.; Weiss-López, B. Characterization of an anionic membrane mimetic with natural phospholipid content and magnetic orienting capabilities. *Journal of Molecular Liquids* **2021**, *323*, 114616.
- [4] Rajendran, L.; Simons, K. Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of Cell Science* **2005**, *118*, 1099–1102.
- [5] Pietiäinen, V. M.; Marjomäki, V.; Heino, J.; Hyypiä, T. Viral entry, lipid rafts and caveosomes. 2005; <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iann20>.

5. Conclusiones

Respecto al diseño de un nuevo mimético, se logró concentrar fosfolípido en su composición hasta lograr un 26.7%. Esto es una ventaja en un mimético de membrana, ya que la presencia de fosfolípido le permite reproducir la interacción específica que existe entre arginina y el fosfato del fosfolípido que múltiples investigadores^{1,2} han dado cuenta, fenómeno que también se apreció durante la investigación que detalla el presente documento.

Esto, añadido al incremento de estabilidad a la bicapa que los fosfolípidos otorgan, hacen que el mimético de membrana desarrollado sea una buena representación de la membrana celular.

Adicionalmente, el bajo costo de fabricar el mimético diseñado en comparación con las bicelas clásicas de DHPC/DMPC, hace factible el estudio de permeabilidad de drogas de forma masiva empleando este mimético.

Se logró construir y calibrar exitosamente un modelo de simulación que predice con gran exactitud los desdoblamientos cuadrupolares en espectros de SDS-d₂₅ en una bicapa modelo de membrana. Y que por lo tanto reproduce adecuadamente la movilidad y dinámica de las cadenas lipídicas del mimético. Utilizando este modelo calibrado, se calcularon perfiles de potencial para la translocación de Benzocaína y Levodopa, obteniendo resultados que coinciden con lo observado experimentalmente.

Se logró sintetizar exitosamente el péptido TP1 y su variación sin cisteína. Se probó mediante ²H-RMN, en un ensayo preliminar, que éste al menos altera la dinámica de la bicapa en los enlaces carbono-hidrógeno mas cercanos a la interfase.

Se simuló el proceso de translocación de TP1 bajo múltiples condiciones diferentes, permitiendo concluir lo siguiente:

- La interacción del péptido TP1 es considerablemente fuerte con los componentes de la bicapa, específicamente con el fosfolípido. Esto provoca que altas concentraciones de TP1 produzcan una ruptura de la bicapa. Este efecto es conocido en péptidos penetrantes, y es por esta razón que se estudian sus aplicaciones como posibles anti-bióticos³.
- La interacción del péptido TP1 no solo es fuerte con el fosfolípido la bicapa, sino que también lo es con otras moléculas de TP1. Esto provoca que concentraciones muy altas de TP1, pero no lo suficiente para romper la bicapa, son desfavorables para la translocación del péptido, ya que habrá un pozo de gran estabilidad asociado al péptido interactuando con otras copias del mismo, quedando el péptido atrapado en la membrana.
- Se observó que los pozos potenciales en el proceso de translocación del péptido TP1 a través de la bicapa, son menos profundos cuando partículas de agua solvatan a los grupos cargados del péptido. Esto indica que probablemente el proceso de translocación esté mediado con partículas agua, actuando estas partículas como catalizador del proceso.
- Se encontró que la interacción del péptido TP1 es más fuerte con la bicapa cuando ésta posee fosfolípido en su composición. Y dado que una interacción demasiado fuerte dificultaría la translocación, es posible que la translocación en una membrana celular ocurra en las llamadas *balsas lipídicas*, que son subdominios de la membrana celular con alto contenido de colesterol y glicolípidos; y un reducido contenido de fosfolípidos.

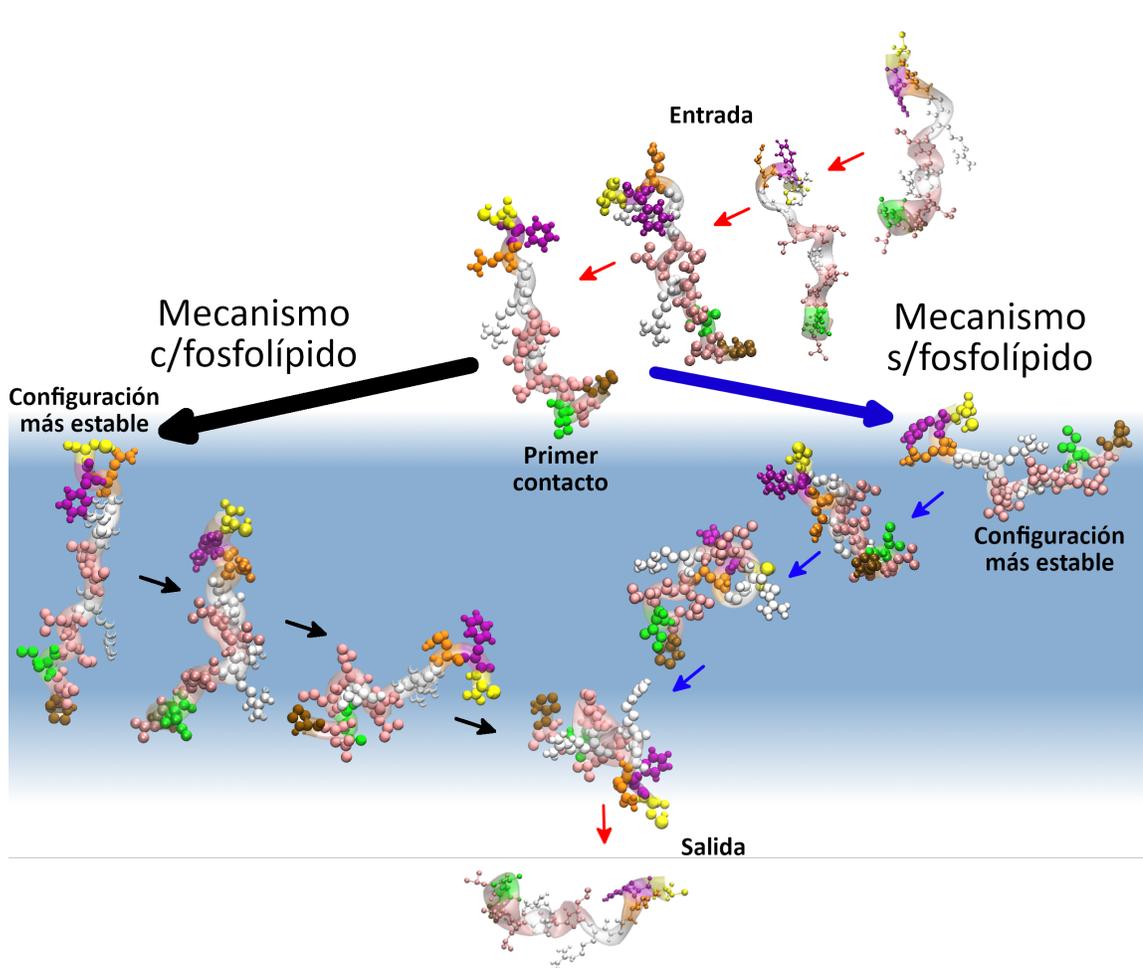


Figura 56: Mecanismo propuesto para la translocación pasiva del péptido TP1 a través de la membrana. Variaciones con y sin fosfolípido en la membrana. Membrana representada por el fondo celeste.

Se estudió el mecanismo de translocación en detalle explorando dos variaciones al mecanismo: translocación mediante difusión pasiva con fosfolípido y sin este componente (figura 56). Se encontró que durante la translocación en membranas con fosfolípido, el péptido TP1 pasa por pozos de gran estabilidad asociados a la arginina interactuando con las cabezas cargadas de fosfato. Estas fuertes interacciones son responsables de la alta barrera energética asociada al *flip-flop*^e del péptido entre hojas de la bicapa.

Por otra parte, si el péptido transloca mediante una bicapa carente de fosfolípidos, sus pozos de potenciales serán menos profundos, ya que no existirá la fuerte interacción entre arginina y fosfolípidos. Además, el proceso de *flip-flop* entre hojas de la bicapa no se enfrentará a grandes barreras energéticas, sino que deberá superar pequeños escalones en lo que aparenta ser una *escalera* de potencial, haciendo el proceso de translocación cinéticamente más factible.

Esto último hace más plausible la hipótesis de que la translocación de este péptido penetrador suceda con más facilidad en *balsas lipídicas*.

Para concluir, se sintetizaron múltiples copias del péptido TP1 deuterado en diferentes residuos de leucina para obtener espectros ²H-RMN de cada residuo de leucina inserto en la bicapa. Y empleando el modelo de simulación calibrado en la primera parte de esta investigación, se logró proponer la posición y orientación más probable de cada residuo de leucina correspondiente a cada desdoblamiento cuadrupolar observado en cada espectro ²H-RMN tomado de cada péptido marcado.

Estos resultados nos permiten concluir que el péptido TP1, en equilibrio, se encontrará parcialmente inserto en la transmembrana, con sus leucinas 2, 5 y 8 inmersas entre los anfífilos; y sus leucinas 4 y 7 en la doble capa de la fase acuosa de la in-

^eProceso en el que el péptido transloca entre las hojas de la bicapa

terfase. Este resultado coincide con lo encontrado en los resultados preliminares de ^2H -RMN y con lo encontrado al estudiar el mecanismo de inserción en bicapas sin fosfolípido.

Adicionalmente, la proposición de que el péptido se encontrará mayormente en la transmembrana se alinea con lo encontrado por otros investigadores en ensayos de permeabilidad. Ya que al marcar el péptido con TP1 con fluoróforos, se aprecia una mayor fluorescencia en la membrana de la célula, más que en el contenido celular (figura 2b, pag. 5).

Finalmente, se confirma la hipótesis propuesta al inicio (pag. ??), ya que ambos mecanismos propuestos para el cruce del péptido a través del mimético de membrana celular, no involucran la participación de algún receptor específico, ni formación de poros, ni gasto de energía por parte de la membrana. Sino que el péptido transloca pasiva y espontáneamente a través de la membrana, pudiendo describir este proceso como una difusión pasiva.

Adicionalmente, todos los objetivos propuestos para la presente investigación, han sido completados satisfactoriamente.

Referencias

- [1] Aliaga, A. E.; Ahumada, H.; Sepúlveda, K.; Gomez-Jeria, J. S.; Garrido, C.; Weiss-López, B. E.; Campos-Valette, M. M. SERS, Molecular Dynamics and Molecular Orbital Studies of the MRKDV Peptide on Silver and Membrane Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 3982–3989.
- [2] Hristova, K.; Wimley, W. C. A Look at Arginine in Membranes. *The Journal of Membrane Biology* **2011**, *239*, 49–56.
- [3] Henriques, S. T.; Melo, M. N.; Castanho, M. A. Cell-

penetrating peptides and antimicrobial peptides: How different are they? 2006; /biochemj/article/399/1/1/41553/Cell-penetrating-peptides-and-antimicrobial.