



Facultad de Ingeniería
Ingeniería Civil en Bioinformática

Diseño computacional de nanopartículas
poliméricas para liberación controlada de
fármacos que impiden la proliferación tumoral.

Eduardo Ignacio Cubillos Llantén

Profesor Tutor: Dr. Horacio Poblete

Co-tutor: Dr. Cristian Vilos

Profesor Informante: Dr. Jans Alzate-Morales

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022

Índice

Índice.....	2
Lista de figuras.....	4
Resumen.....	5
Abstract.....	6
1. Introducción.	7
1.1 Cáncer.....	7
1.2 Tratamientos contra el cáncer.....	9
1.3 Nanomedicina.	12
2. Hipótesis	20
3. Objetivos.....	20
3.1 Objetivo General.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4. Materiales y métodos.....	21
4.1. Modelar y equilibrar nanopolímeros de PLA y PLGA utilizando campos de fuerza reactivos.	22
4.1.1 Preparación de la estructura tridimensional de complejos polímeros- fármacos y verificación de estados de protonación.	23
4.1.2 Creación de configuraciones iniciales de sistemas empacados.	23
4.1.3 Ejecución de dinámica molecular con campo de fuerza reactivo para los polímeros PLA y PLGA.....	24
4.1.4 Análisis de la estructura de los núcleos de polímeros.	26
4.2. Evaluar los complejos nanopartículas-fármaco de polímeros PLA Y PLGA con el grupo de tres fármacos (Rodamina B, Irinotecán y 5-fluorouracilo) a través de ReaxFF.	26
4.2.2 Creación complejos iniciales de polímero-fármaco.....	26
4.2.3 Ejecución de simulaciones de dinámica molecular de los complejos polímero-fármaco con ReaxFF.	27
4.3. Estimar la afinidad energética de los complejos nanopartícula-fármaco utilizando la metodología SMD y caracterizar estructuralmente los sitios de mayor afinidad de los fármacos.	27
4.3.1 Preparación de sistemas para SMD.....	28
4.3.2 Ejecución de cálculos SMD.....	29
4.3.3 Caracterización estructural de los sitios de mayor afinidad identificados en las simulaciones de SMD.....	30

4.4. Explorar la degradación de nanopartículas y liberación de una molécula de interés ante un solvente en dinámica molecular clásica.	31
4.4.1 Creación de configuraciones de estructuras iniciales para los sistemas a simular.	31
4.4.2 Formación de nanopartículas con Rodamina B en vacío.	32
4.4.3 Ejecución de dinámicas de nanopartículas en solvente.	32
4.4.4 Análisis de dinámicas de nanopartículas en solvente.	32
5. Resultados.	33
5.1. Modelar y equilibrar nanopolímeros de PLA y PLGA utilizando campos de fuerza reactivos.	33
5.1.1 Preparación de la estructura tridimensional de complejos polímeros- fármacos y verificación de estados de protonación.	33
5.1.2 Ejecución de dinámica molecular con campo de fuerza reactivo para los polímeros PLA y PLGA.	35
5.2. Evaluar los complejos nanopartículas-fármaco de polímeros PLA Y PLGA con el grupo de tres fármacos (Rodamina B, Irinotecán y 5-fluorouracilo) a través de ReaxFF.	37
5.2.1 Relajación de los complejos polímero fármaco con ReaxFF.	37
5.3. Estimar la afinidad energética de los complejos nanopartícula-fármaco utilizando la metodología SMD y caracterizar estructuralmente los sitios de mayor afinidad de los fármacos. ...	41
5.3.1 Ejecución de cálculos SMD.	41
5.3.2 Caracterizar estructuralmente los sitios de mayor afinidad identificados en las simulaciones de SMD.	41
5.4. Explorar la degradación de nanopartículas y liberación de una molécula de interés ante un solvente en dinámica molecular clásica.	46
5.4.1 Creación de configuraciones de estructuras iniciales para los sistemas a simular.	46
5.4.3 Ejecución de dinámicas de nanopartículas en solvente.	46
5.4.4 Análisis de dinámicas de nanopartículas en solvente.	47
6. Conclusiones.	50
7. Referencias.	52

Lista de figuras

Figura 1. Crecimiento de células cancerígenas.	9
Figura 2. Moléculas utilizadas como fármacos anticancerígenos y para marcar cáncer colorrectal.	12
Figura 3. Tipos de nanopartículas utilizadas con fines biomédicos.	14
Figura 4. Representación estructural de nanopartículas PLA, PLGA.	16
Figura 5. Esquema que describe el protocolo de dinámica molecular a implementar.	21
Figura 6. Representación de la coordenada de reacción a utilizar en SMD.	30
Figura 7. Representación estructural de estados de protonación en polímeros, moléculas antitumorales y de marcaje molecular.	34
Figura 8. Formación de nanopartículas en dinámicas moleculares reactivas.	35
Figura 9. Radio de giro en polímeros PLA y PLGA.	37
Figura 10. Radio de giro durante formación de nanopartícula rodamina B-polímeros a distintas concentraciones.	38
Figura 11. Radio de giro durante formación de nanopartícula 5-fluorouracilo-polímeros a distintas concentraciones.	39
Figura 12. Radio de giro durante formación de nanopartícula irinotecán-polímeros a distintas concentraciones.	40
Figura 13. Gráfico de fuerza contra tiempo de SMD de rodamina B.	42
Figura 14. Gráfico de fuerza contra tiempo de SMD de 5-fluorouracilo.	43
Figura 15. Gráfico de fuerza contra tiempo de SMD de irinotecán.	44
Figura 16. Formación de nanopartículas co-polimérica (PLA/PLGA-PEG) en conjunto con rodamina B y su respuesta en solvente a lo largo de una dinámica molecular clásica.	46
Figura 17. Gráficos de función de distribución radial o $g(r)$ normalizada.	48

Resumen

El cáncer es una enfermedad mortal que ha estado presente a lo largo de la historia de la humanidad, así el cáncer, aun sin una solución concreta, ha impulsado el desarrollo de distintos tratamientos para combatirla. La quimioterapia es uno de los mayores y más eficaces focos para abordar e intentar curar este padecimiento, terapia que muchas veces producto de los fármacos utilizados conlleva efectos secundarios que afectan la salud de los pacientes. Es gracias a la exploración de nuevas tecnologías tanto a nivel computacional como experimental que se busca disminuir los efectos colaterales de dichos fármacos en conjunto con aumentar su efectividad. En la actualidad, la nanomedicina mediante el uso de nanotransportadores poliméricos, ha generado un gran impulso en proponer alternativas eficientes y efectivas frente a los efectos secundarios generados por la quimioterapia.

En el presente trabajo de tesis estudiamos el uso nanopartículas poliméricas con PLA y PLGA y su interacción con distintos fármacos de acción supresora de tejido tumoral. Por medio de técnicas de dinámica molecular sumado al uso con campos de fuerza reactivo, en combinación con la metodología *steered molecular dynamics*, se exploró el comportamiento de distintas formulaciones de nanotransportadores basados en PLA/PLGA encapsulando drogas anticancerígenas, a fin de generar conocimiento crucial para el posterior diseño a nivel experimental proyectando un impacto directo en potenciar tratamientos más eficaces y menos dañinos para los pacientes afectados por cáncer colorrectal. Así logramos proponer que a nivel *in-silico*, PLGA por sobre PLA permite una liberación más prolongada en el tiempo de las moléculas menos hidrofóbicas. Además, se empleó el polímero polietilenglicol (PEG) para proteger la nanopartícula basada en PLA/PLGA, esto ya que por su naturaleza hidrofóbica no es posible incorporarla en ambientes acuosos. Las estructuras de fármaco:PLA/PLGA:PEG mostraron un cambio conformacional considerable, expandiendo su volumen luego de encontrarse en ambiente acuoso, lo cual propicio que el ingreso de moléculas de agua al interior del core de PLA/PLGA gatillaran la liberación de la droga contenida por el nanotransportador. Es así, que se espera que el conocimiento generado ayude a avanzar en mejorar los tratamientos ya existentes y de la misma manera, la calidad de vida de los afectados por esta enfermedad.

Abstract

Cancer is a deadly disease that has been present throughout the history of humanity. Thus, even without a concrete solution, cancer has prompted the development of different treatments to combat it. Chemotherapy is one of the most significant and most effective focuses to address and try to cure this condition, a therapy that many times, as a result of the drugs used, carries side effects that affect patients' health. Thanks to the exploration of new technologies both at the computational and experimental levels, the aim is to reduce the collateral effects of these drugs and increase their effectiveness. At present, nanomedicine, through the use of polymeric nanocarriers, has generated a great impulse in proposing efficient and effective alternatives to the side effects generated by chemotherapy.

In the present thesis work, we study the use of polymeric nanoparticles with PLA and PLGA and their interaction with different drugs with suppressive action on tumor tissue. Employing molecular dynamics techniques added to the use of reactive force fields, in combination with the steered molecular dynamics methodology, the behavior of different formulations of nanocarriers based on PLA/PLGA encapsulating anti-cancer drugs was explored in order to generate crucial knowledge for the subsequent design at an experimental level projecting a direct impact on promoting more effective and less harmful treatments for patients affected by colorectal cancer. Thus, we were able to propose that at the *in-silico* level, PLGA over PLA allows a more prolonged release in time of the charged molecules. In addition, the polymer polyethylene glycol (PEG) was used to protect the nanoparticle-based on PLA/PLGA, since due to its hydrophobic nature, it is not possible to incorporate it in aqueous environments. The structures of the drug:PLA/PLGA:PEG showed a considerable conformational change, expanding their volume after being in an aqueous environment, which propitiated that the entry of water molecules into the core of PLA/PLGA would trigger the release of the drug contained by the nanocarrier. Thus, it is expected that the knowledge generated will help improve existing treatments and, in the same way, the quality of life of those affected by this disease.

1. Introducción.

1.1 Cáncer.

Existen tantos cánceres como tipos de tejidos biológicos se conocen. Producto del cáncer, durante sólo el 2018 más de 9.6 millones de personas murieron (Bray et al., 2018), siendo este padecimiento la segunda enfermedad más mortal a nivel mundial, según datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS). El desarrollo de esta afección se encuentra principalmente asociada a una división descontrolada de células cancerígenas, las que logran eludir los puntos de control del ciclo celular. Este mal funcionamiento es desencadenado por alteraciones en procesos de replicación y control de daños en el material genético (Sudhakar, 2009). En particular, los errores que puedan presentarse en el ADN son de especial interés para el desarrollo de novedosas investigaciones científicas, sobre todo en lo que a cáncer respecta, debido a que el ADN es la principal macromolécula encargadas de mantener un entorno biológico estable, el que permita un desarrollo correcto de la célula (Friedberg, 2003).

De forma particular, en el sistema de salud chileno solo el cáncer colorrectal (CRC) causa la muerte de 6.2 cada 100000 habitantes por año (Donoso et al., 2006), destacando que a medida que la población envejece, la tasa de mortalidad aumenta al doble (intervalo entre 1983 a 2008) (Zarate et al., 2013). Interesantemente, el CRC ha mostrado ser uno de los cánceres que ocupa una mayor extensión en el cuerpo previo a la metástasis (You et al., 2016). Se han reportado dos causas principales que originan el CRC gatilladas por dos tipos de errores en el material genético: (1) producto de genes que presentan una inestabilidad cromosómica, y que a su vez, provoca la pérdida de copias nativas de los genes, es decir, una pérdida en la heterocigosidad en los genes que codifican a supresores de tumores. (2), la deficiencia en la maquinaria proteica involucrada en reparar y controlar los defectos del ADN (Markowitz & Bertagnolli, 2009).

En la literatura, se ha reportado que existen diversos factores hereditarios como las principales causas de distintos tipos de cáncer, sin embargo, investigadores han logrado distinguir que adicionalmente existen factores ambientales contaminantes o exógenos nocivos, que participan en la proliferación de células cancerígenas en las personas que sufren este padecimiento (Foulds,

1958). Como se mencionó, la característica principal que da origen a la enfermedad es la presencia de daño o mutaciones en el material genético (Sherr, 1996). Los genes en el ADN que provocan esta mortal enfermedad están presentes de dos formas: proto-oncogénica y oncogénicas. Los proto-oncogenes se caracterizan por estar asociados a la maquinaria biológica necesaria que promueve los estados iniciales de la mitosis (Sherr, 1996). Por otro lado, los oncogenes se definen como los estados mutados de los proto-oncogenes, es decir, estos genes son responsables de alterar la síntesis de proteínas conocidas como genes supresores de tumores, que en un estado normal deben regular el normal funcionamiento del ciclo de reproducción celular en puntos de control de las etapas G1 y G2s (Sherr, 1996). Las proteínas generadas por los oncogenes presentan mutaciones en los sitios de regulación más importantes para su actividad normal, perdiendo la capacidad de cumplir sus funciones de restricción (Pines, 1995).

Las células que expresan daño o alteraciones en su material genético no logran completar su proceso de apoptosis o muerte celular programada, que sumado a la replicación descontrolada producto de genes defectuosos, conlleva a que las células se acumulen formando una masa de tejido más conocida como tumor cancerígeno (ver Figura 1). Existen distintos estados en que los tumores se desarrollan, pasando desde el tejido sano (Figura 1, etapa 0), hasta un tejido completamente dañado en su etapa final (Figura 1, etapa 4), donde el tumor alcanza un gran volumen, provocando fallos a nivel celular y molecular dentro del organismo. Junto con el crecimiento descontrolado de células, existe también un gran consumo de recursos y nutrientes por parte del tejido afectado, impidiendo su normal funcionamiento, generando múltiples fallos a nivel sistémico en quienes presentan este tipo de alteraciones. En un estado avanzado de la enfermedad, es posible que las células cancerígenas ingresen en el torrente sanguíneo aumentando la probabilidad de expansión del cáncer a otros tejidos del cuerpo, llevando al paciente a una propagación del foco canceroso, conocido como metástasis. Bajo esta condición se manifiesta un curso irreversible de la enfermedad provocando potencialmente la muerte del paciente (Markowitz & Bertagnoli, 2009).

Considerando que la expansión del tejido cancerígeno, también aumenta el consumo de nutrientes para lograr mantener su crecimiento, se ha reportado en literatura, que las células

cancerígenas consumen altas cantidades de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos (Argilés & Azcón-Bieto, 1988). Esto trae como consecuencia la modificación del ambiente fisiológico en torno a las células tumorales, provocando una deficiencia de los nutrientes mencionados en las cercanías del tumor. Por consiguiente, producto de la metabolización acelerada de las células cancerígenas, se genera una alta cantidad de desechos (principalmente en CO₂ y ácido láctico) que propician un ambiente ácido alrededor del tumor, beneficiando directamente su crecimiento (Swietach et al., 2014).

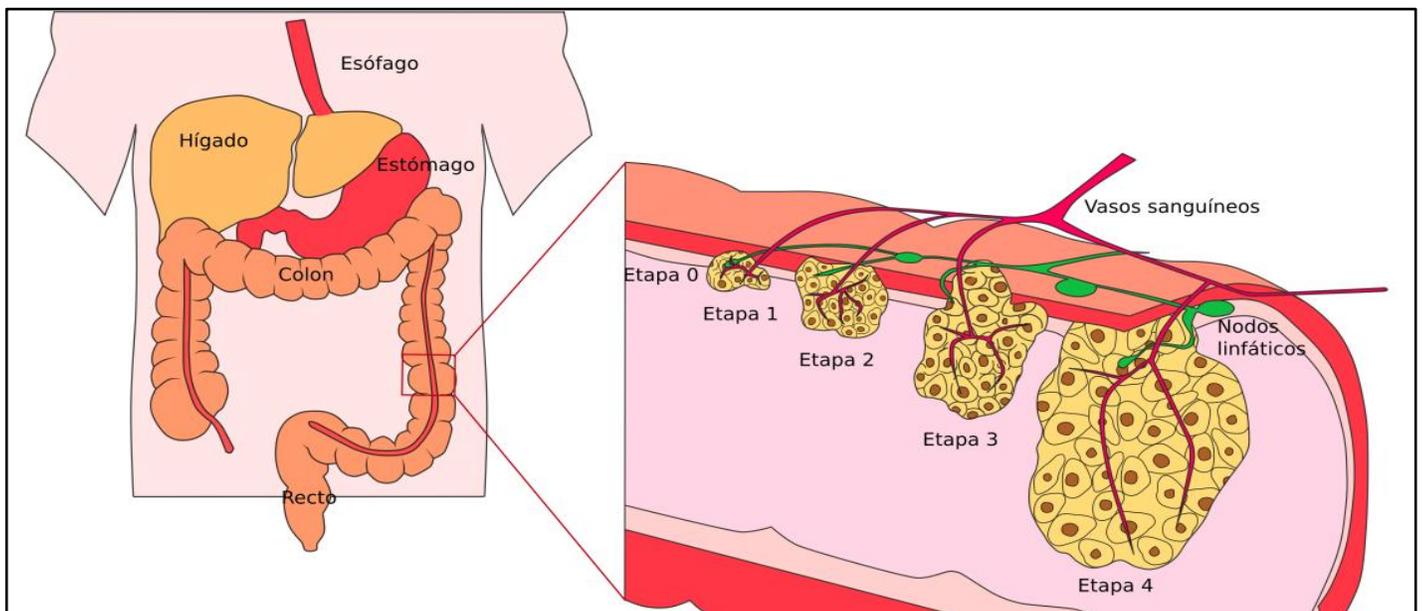


Figura 1. Crecimiento de células cancerígenas. (A) Representación y localización del crecimiento de un tumor colorrectal.(B) Etapa 0 corresponde a tejido sano, etapa 1 y 2 comienzo de formación del cáncer, en etapa 3 masa de células cancerígenas avanzada y en etapa 4 tumor rodea vasos sanguíneos y nodos linfáticos con riesgo de alcanzar otros órganos (Imagen adaptada de Cisterna *et al.*, 2016).

1.2 Tratamientos contra el cáncer.

Cómo el cáncer es una enfermedad que afecta a una gran cantidad de personas a nivel mundial, se ha motivado constantemente el desarrollo de nuevos tratamientos quirúrgicos y

paliativos para tratarlo, y así mejorar la calidad de vida de pacientes con este padecimiento. Entre los registros de la lucha contra el cáncer existen procedimientos quirúrgicos rudimentarios desde la época de los egipcios, pasando por diversas teorías sobre esta enfermedad, las que han avanzado significativamente en la generación de nuevo conocimiento para enfrentarla. En la actualidad, es posible extraer tumores mediante cirugías rutinarias, como también el uso de tratamientos de quimioterapia para frenar el avance y propagación de diversos tipos de cáncer (Sudhakar, 2009).

Entre los distintos tratamientos contra el cáncer existen 3 focos principales: la cirugía (1), la radioterapia (2) y la quimioterapia (3), los cuales se emplean según el estado de avance y complejidad de la enfermedad en cada paciente. La cirugía (1) es la primera aproximación que se trabaja en muchos tipos de cáncer, la cual consiste en extirpar el carcinoma (tumor cancerígeno) con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de células alteradas (Sullivan et al., 2015). El tratamiento mediante radioterapia (2) consiste en aplicar radiación, generalmente a través de rayos-X de distintos niveles de energía sobre el área afectada, con el fin de alterar directamente el material genético de las células cancerígenas restantes, provocando la reducción del tejido tumoral y favorecer la recuperación de células sanas circundantes (Holsti, 1995). Finalmente, la quimioterapia (3) se basa en la aplicación de distintos fármacos antitumorales para frenar la replicación celular y/o eliminar las células dañadas. Sin embargo, el uso de quimioterapia intravenosa también genera un daño en células sanas, alterando de manera considerable la calidad de vida del paciente durante el tratamiento (Bosset et al., 2006; Nygren, 2001).

En cuanto a estos 3 focos de tratamiento, la quimioterapia si bien es un método efectivo, lamentablemente lleva consigo una serie de efectos secundarios asociados, dentro de los cuales se destacan: disminución en conteo de distintos tipos de células sanguíneas (hemoglobina o leucocitos), problemas gastrointestinales (náusea, vómitos o diarreas), afecciones respiratorias, problemas cutáneos (pérdida de cabello o descamación), fallas cardíacas (arritmias o taquicardias ventriculares), problemas de neurotoxicidad y nefrotoxicidad (Miller et al., 1981). En particular, la nefrotoxicidad está relacionada con daños renales provocados por la ingesta de medicamentos, y es variable según los distintos tipos de fármaco y el origen que posean. Un caso importante son los fármacos provenientes del gas mostaza o los resultantes de metales como el

platino que son utilizados en quimioterapia, dentro de los cuales se encuentran distintos derivados como el carboplatino, oxaplatino y el cisplatino, dado que son compuestos complejos de metabolizar (Arany & Safirstein, 2003). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas tecnologías que puedan reemplazar o disminuir los efectos secundarios producto de la quimioterapia, es un área de tendencia en el mundo científico, donde existe un amplio desarrollo y necesidad en el campo biomédico.

Actualmente, en el mercado de productos farmacéuticos existen distintos fármacos con un alto efecto antitumoral, tales como 5-fluorouracilo e irinotecán (Fig. 2D y 2C, respectivamente). En el caso de 5-fluorouracilo es un derivado de uracilo, que le confiere una gran capacidad de interactuar tanto con el ARN como el ADN. Este fármaco, también ha mostrado gran capacidad de promover la apoptosis de células tumorales, aunque también puede causar una alta toxicidad en el cuerpo, producido principalmente por un grave daño causado en el material genético transcrito en células sanas (Longley et al., 2003). Por otro lado, irinotecán, molécula menos hidrofóbica que 5-fluorouracilo pero igualmente poco soluble (Qu et al., 2020), logra detener el crecimiento celular a través de un mecanismo de acción basado en la unión a la proteína ADN topoisomerasa I, lo que genera una interferencia en el funcionamiento de la enzima, y por consecuencia evita la replicación del ADN dañado en el ciclo celular (Wiseman & Markham, 1996).

A pesar de los prometedores beneficios mostrados por estos fármacos, su baja solubilidad y en especial sus efectos secundarios son los principales obstáculos para ser utilizados, siendo uno de los principales objetivos el desarrollar nuevos métodos de administración para un uso seguro de las distintas drogas disponibles. Dentro de la búsqueda de nuevos enfoques prometedores que permitan la reducción de efectos colaterales, se encuentra el uso de nanotecnología dado el gran éxito de su uso en distintas terapias. La aplicación de este tipo de tecnología permite el uso de nanopartículas (NP) de distintos materiales como transportadores de droga, evitando la libre circulación de las drogas en el torrente sanguíneo, dado que al ir inmersas en la NP disminuyen los efectos no deseados sobre células sanas, además de permitir una entrega localizada de los fármacos y tiempos de liberación prolongados.

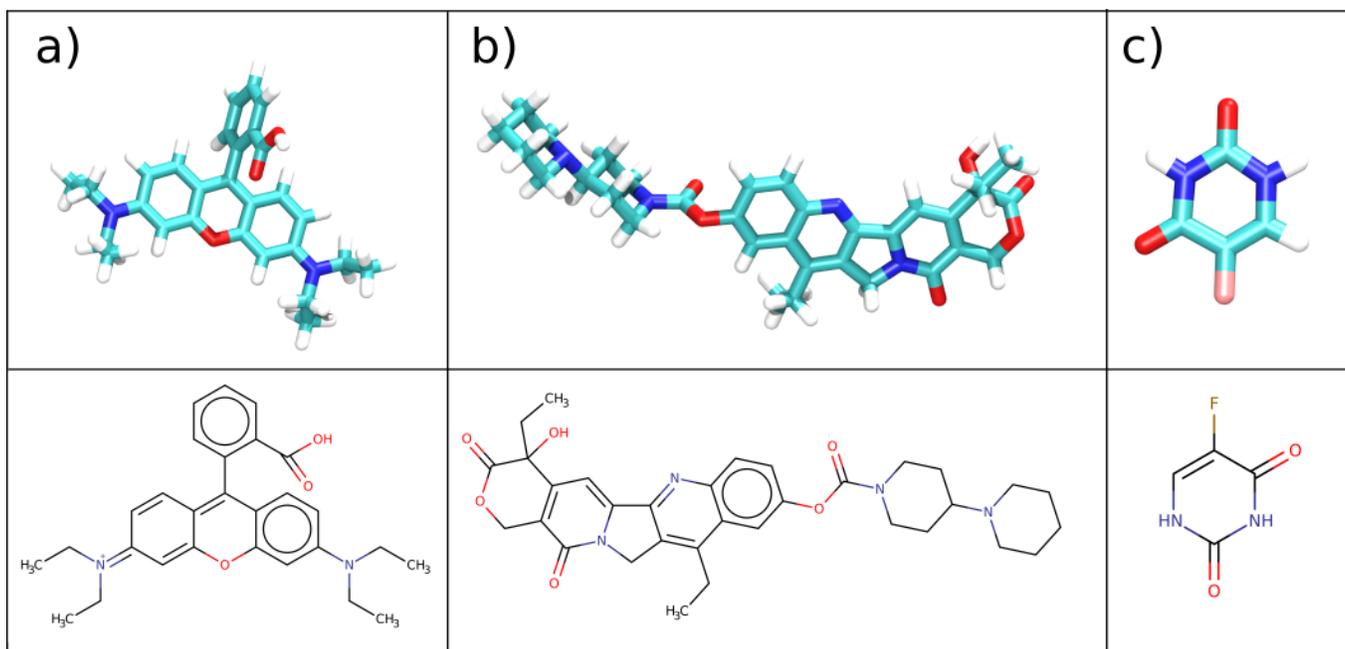


Figura 2. Moléculas utilizadas como fármacos anticancerígenos y para marcar cáncer colorrectal. (a) Rodamina, (b) Irinotecán y (c) 5-Fluorouracilo. En los tres casos se observan en azul claro los átomos de carbono, en rojo los átomos de oxígeno, en azul oscuro los átomos de nitrógeno, en blanco los átomos de hidrógeno.

1.3 Nanomedicina.

En cuanto a nuevas áreas que muestran ser una prometedora alternativa para combatir distintos tipos de enfermedades incluyendo obviamente el cáncer, se encuentra la nanomedicina, campo de la medicina que mediante el uso de la nanotecnología ha permitido la comprensión del mundo microscópico, logrando analizar problemas a escalas métricas cada vez más reducidas. La nanotecnología agrupa distintas disciplinas de la ciencia para manipular y crear estructuras de tamaño nanométrico (1×10^{-9} m) (Baker et al., 2009). Una rama principal de la nanotecnología es la nanomedicina, que presenta como objetivo central el estudio, diseño y uso de elementos tecnológicos de tamaño nanométrico para afrontar problemas biológicos y aplicarlos en el campo médico o clínico (Baker et al., 2009). Dentro de este gran campo de

estudio, se distinguen tres principales áreas de la nanomedicina: bioimagen (1), desarrollo de fármacos (2) y sistema de administración de fármacos (3) (Baker et al., 2009; Kim et al., 2010).

La bioimagen, es una de las áreas de desarrollo más importante de la nanomedicina, que mediante el uso de marcadores moleculares por medio de fluorescencia obtiene imágenes de alta definición de tejidos específicos (Jin et al., 1969). Dentro de este marco, apuntando a tratamientos para el cáncer, la identificación de tejidos afectados se logra por medio del uso de fluoróforos o nanocristales (Jin et al., 1969). En este caso, los fluoróforos permiten seguir y cuantificar la entrega de fármacos en tejidos contagiados. Un ejemplo en fluorescencia es el uso del fluoróforo anfipático rodamina B (Polat et al., 2011), el cual pertenece a la familia de los fluoróforos aminoxantenos (Yova et al., 2000). Estos aminoxantenos y sus derivados tienen como mecanismo principal interactuar con la mitocondria de células tumorales para generar un marcaje distinto entre las células sanas y enfermas (Bunting et al., 1989). Por otro lado, un mecanismo en desarrollo para el marcaje de tumores y observar sus límites en el tejido sano sobre el que se desarrolla, son los quantum dots o “puntos cuánticos”, definidos como materiales conductores que a diversos tamaños presentarán distintos colores (Kawasaki & Player, 2005). Al contrario de fluoróforos como la Rodamina B, los puntos cuánticos no generan respuesta toxicológica, lo que permite utilizarlos de forma más segura para el marcaje de tejidos tumorales. De esta forma, el desarrollo de fármacos con fines de tratamientos médicos e identificación de tejidos altamente específicos es un gran nicho de desarrollo que la nanoingeniería podría potenciar y mejorar (Kawasaki & Player, 2005; Kim et al., 2010).

En nanomedicina, el desarrollo de sistemas de administración controlada de medicamentos se centra en mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas en distribución de fármacos, orientando la disminución de toxicidad, aumento de la eficiencia y especificidad en la entrega del medicamento al blanco terapéutico (Allen & Cullis, 2004). Entre los nanotransportadores de fármacos más utilizados en la actualidad, se encuentran las NP metálicas de materiales como oro y plata (Figura 3A), micelas (Figura 3B), dendrímeros (Figura 3C), nanotubos de carbono (Figura 3D) y distintos polímeros que se ensamblan espontáneamente para formar un núcleo que contendrá el fármaco (Figura 3E) (Lombardo et al., 2019). Más en detalle, las NP poliméricas tienen un particular interés para nosotros, por lo que serán el foco

central de este estudio. Uno de los principales problemas para esta clase de NP es el desconocimiento de las reacciones que desencadena el cuerpo sobre ellas una vez administradas al paciente. Uno de los métodos más utilizados para manipular la biocompatibilidad y control hacia la diana biológica es añadir una cobertura adicional a los nanotransportadores. Esta capa externa consiste en crear un complejo entre polímero-fármaco que se encuentren revestidas por elementos biocompatibles tales como: péptidos, proteínas o polímeros (Adabi et al., 2017).

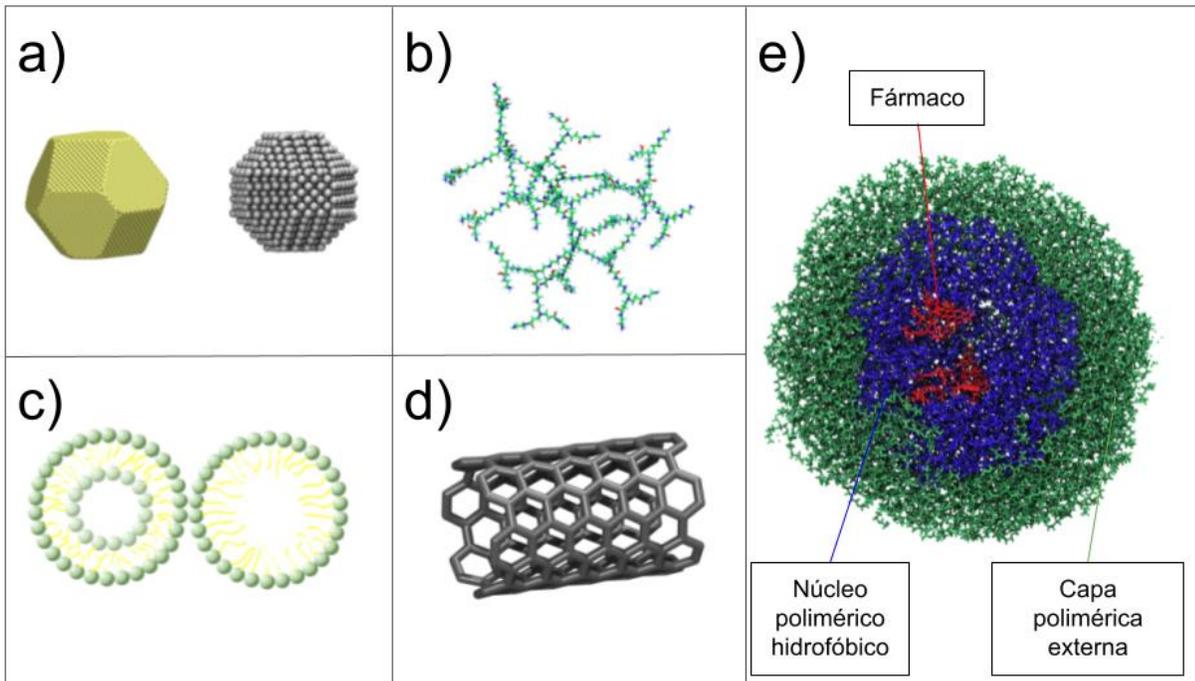


Figura 3. Tipos de nanopartículas utilizadas con fines biomédicos. (a) Nanopartícula de metal, (b) dendrímeros (PAMAM), (c) micelas, (d) nanotubo de carbono, (e) esquema de una nanopartícula polimérica.

En particular, la Figura 3E muestra una representación computacional de una NP polimérica, generada al auto ensamblar cadenas de polímeros en bloque, logrando así una partícula con geometría pseudo-esférica. Las NP poliméricas están comúnmente compuestas por un núcleo hidrofóbico que es capaz de auto-encapsular distintos tipos fármacos por efecto de su polaridad

(Kamaly et al., 2012). De este modo, las moléculas transportadas (fármacos o fluoróforos) pueden ser tanto hidrofílicas como hidrofóbicas a fin de favorecer su encapsulamiento, como también su liberación. Son estas diferencias químicas de los fármacos, las que permiten estudiar y entregar combinaciones más eficientes ante la selección del polímero a utilizar para su transporte. Adicionalmente, este núcleo polimérico (figura 3E) se puede recubrir por una capa de un polímero diferente, usualmente biodegradable con características hidrofílicas, como por ejemplo PEG (polietilenglicol) (Yang et al., 2006). Otras características de las NP poliméricas son su gran biocompatibilidad, baja toxicidad y un gran tamaño que permite cargar los núcleos hidrofóbicos con más de un fármaco a la vez (Kamaly et al., 2012). Adicional a esto, las NP poliméricas son objeto de interés para su uso en quimioterapia, gracias a que cumplen con las principales propiedades a considerar para el diseño de NP transportadoras, que es contar con una liberación controlada del fármaco sobre la diana biológica, siendo una de las características más utilizadas el gatillar la descarga de los fármacos a través de un cambio conformacional en la nanopartícula al detectar condiciones fisiológicas características del entorno de células cancerígenas. De esta forma, la liberación del fármaco se realizará al identificar este estado particular en torno a células cancerígenas tales como el pH o por la interacción específica de la NP con proteínas de reconocimiento (Lombardo et al., 2019).

En la Figura 4, se representan (a) Ácido poli láctico (PLA) y (b) ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA), ambos son polímeros hidrofóbicos biodegradables y provenientes de recursos renovables (Matsumoto et al., 1997). La estructura de estos polímeros está basada en repeticiones monoméricas que componen los núcleos hidrofóbicos de una NP polimérica, y cómo ya se ha descrito, PLA y PLGA poseen una alta compatibilidad con el ambiente fisiológico humano, explicado en su composición de átomos de carbono y oxígeno (Matsumoto et al., 1997). Así, la composición química de los polímeros PLA y PLGA, confiere una baja toxicidad y una eficiente metabolización. Por ejemplo, en un medio acuoso las cadenas de polímeros son hidrolizadas y luego metabolizadas por el cuerpo como ácido láctico en el caso de PLA. El mismo proceso ocurre con PLGA que suma ácido glicólico en su proceso de metabolismo (Bee et al., 2018; Elsayy et al., 2017). Los desechos generados por la hidrólisis de PLA y PLGA es su principal desventaja, ya que producen acumulación de ácidos, disminuyendo el nivel de pH de ambientes biológicos que

deberían ser constantes y específicos (Bee et al., 2018; Elsayy et al., 2017; Lombardo et al., 2019).

Se ha reportado que PLA y PLGA se autoensamblan en núcleos nanométricos caracterizados por la acumulación de polímeros, los cuales son consecuencia de múltiples interacciones hidrófobas entre las distintas cadenas de polímeros (Kamaly et al., 2012). De forma complementaria, se ha reportado que los núcleos poliméricos poseen una alta capacidad de encapsular fármacos en cavidades intersticiales. Sin embargo, aún no se ha reportado el mecanismo exacto por el cual los fármacos se mantienen en interacción con los polímeros (Matus et al., 2018). Interesantemente, si bien el objetivo biológico de este transporte de fármacos es disminuir efectos secundarios, como también controlar el periodo de aplicación (liberación controlada) de las moléculas de interés, aumentando también la capacidad terapéutica del medicamento (Yang et al., 2006; You et al., 2016), este tipo de nanotransporte permite facilitar la administración de moléculas de acción antitumoral que presentan una baja solubilidad (Narvekar et al., 2014), permitiendo contar con un espectro mayor de fármacos para su uso terapéutico.

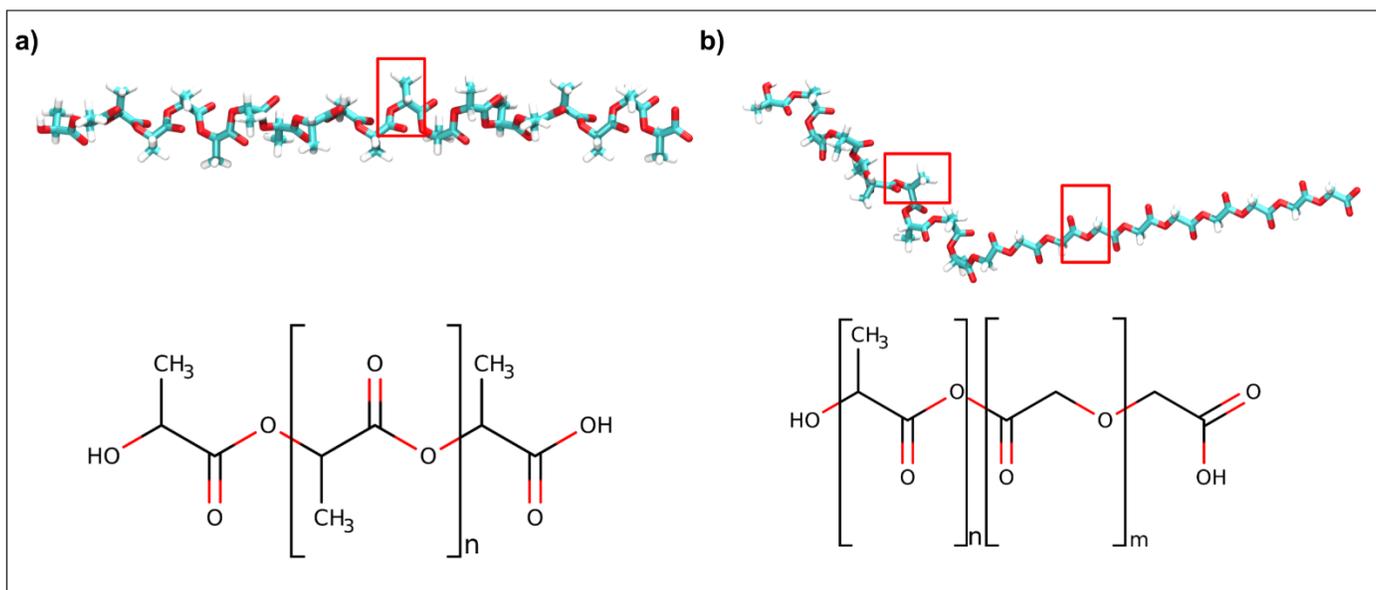


Figura 4. Representación estructural de nanopartículas PLA, PLGA. (a) Cadena de ácido poli láctico de 20 monómeros. (b) Cadena de ácido poli láctico-co-glicólico de 10 monómeros de cada segmento de ácido láctico y glicólico.

En relación a trabajos con PLA y PLGA, estudios demuestran que fluoróforos como la Rodamina B y sus derivados, al conjugarse con NP poliméricas como PLGA, son capaces de marcar selectivamente las células cancerígenas (Essa et al., 2011). La detección de fluoróforos aminoxantenos se realiza con luz irradiada hacia el tejido con un rango de onda entre 510-560 nanómetros (Gryparis et al., 2007). De la misma manera, se ha reportado la efectividad del uso de NP poliméricas en quimioterapia, en específico el uso de PLA y PLGA transportando cisplatino (Matsumoto et al., 1997). De forma similar, a fines de la década del 90 se estudió la carga de una droga en base a platino, la cual se realizó con NP de PLA conjugado a PLGA. Los resultados demostraron la exitosa encapsulación de cisplatino, en la cual la droga se mostraba en mayor concentración en las zonas ricas en PLGA y marcó un tiempo de liberación de 45 días *in vitro* (Matsumoto et al., 1997). Posteriormente, se demostró el uso de las NPs PLA/PEG-cisplatino como potencial tratamiento contra células cancerígenas, debido a que permiten una administración controlada del fármaco gracias a que la NP libera la droga en entornos ácidos. (Aryal et al., 2010). Por otro lado, se ha observado que nanotransportadores reducen la toxicidad del fármaco y aumentan la apoptosis celular del tejido enfermo, gracias a la reducción de moléculas libres de la droga presentes en el organismo del paciente, concentrando su liberación en las células en torno a las cancerígenas (Gryparis et al., 2007; Moreno et al., 2008). Estos estudios permiten tener mejor entendimiento de cómo trabajan *in vivo* e *in vitro* las NPs, sin embargo, el mecanismo estructural y fisicoquímico aún no es completamente entendido.

Debido a la fácil metabolización de los polímeros en núcleos hidrofóbicos de las NPs, es de importancia mencionar que, por medio de la combinación de distintos polímeros, se obtiene una protección adicional frente a ataques del sistema inmune y permite una degradación de la NP retardada (Yang et al., 2006). Uno de los polímeros comúnmente utilizados en la capa exterior (hidrofílica) de las NP poliméricas es polietilenglicol (PEG), el cual al añadirse a la NP y recubrir el núcleo hidrofóbico, mejora la estabilidad estructural del nanotransportador (Yang et al., 2006).

Las propiedades previamente discutidas de PLA y PLGA han mostrado ser potenciadas al ser conjugadas con PEG, el cual les confiere un gran potencial para aplicaciones contra distintas enfermedades, incluido el cáncer colorrectal. También, ha sido reportado que PEG facilita la encapsulación de fármacos en polímeros, y adicionalmente, al añadir una capa externa de este

polímero el núcleo de la NP mejora las interacciones nano-bio en el organismo en términos de aumentar la vida media de los fármacos y disminuir su eliminación por el sistema fagocítico mononuclear que protege al organismo (Betancourt et al., 2009; Essa et al., 2011; Yang et al., 2006). Se ha demostrado que la manipulación de los grupos funcionales en los terminales de las cadenas de PEG hace más eficiente el transporte y la liberación del fármaco, debido a que la presencia de estos grupos terminales provoca una respuesta distinta a los ambientes biológicos presentes en el organismo, un ejemplo de esto es la detección células tumorales por medio de la interacción de grupos con proteínas sobre expresadas (Betancourt et al., 2009). Adicionalmente, las NPs co-poliméricas funcionalizadas no solo han demostrado la entrega sitio dirigida de fármacos, sino que también permiten reconocer células o tejidos tumorales, mediante el transporte de fluoróforos y/o marcadores moleculares. Por consecuencia, se ha logrado detectar los márgenes fisiológicos precisos de los tumores cancerígenos permitiendo orientar una extracción exitosa a través de cirugías (Jin et al., 1969). Por otro lado, gracias a la modificación de los grupos terminales de estos polímeros, ha sido posible controlar el sistema de liberación de sustratos (fluoróforos o fármacos) cargados en las NPs (Argilés & Azcón-Bieto, 1988). Tanto en el ambiente extracelular como en el intracelular de los tejidos cancerígenos, presentan una alta incidencia de acidez, producto de la proliferación celular y angiogénesis del tejido (Izumi et al., 2003), siendo las diferencias de pH en ambos medios celulares, los principales indicadores para la liberación controlada de las moléculas de interés. Considerando estos parámetros, es que se podrían diseñar NPs con la capacidad de liberar fármacos de forma autocontrolada y gatilladas por diferencias en la acidez del ambiente fisiológico, una característica clave para la detección de enfermedades como por ejemplo el cáncer (Aryal et al., 2010; You et al., 2016).

La nanomedicina tiene proyecciones prometedoras, que gracias al avance en la aplicación de nuevas tecnologías computacionales en el estudio del diseño de nanotransportadores y nuevos fármacos, es así como gracias a técnicas como dinámicas de simulación molecular permiten el estudio in-silico de NP y distintos materiales para la entrega dirigida de fármacos (Maleki et al., 2021). Estas herramientas que a través del modelado tanto de sistemas de transporte como de sus entornos biológicos, entregan detalles de comportamientos físico químicos y la respuestas que tienen los nanotransportadores a distintas condiciones del organismo.

Ante todos los antecedentes expuestos anteriormente, y con el fin de **caracterizar las principales interacciones moleculares existentes entre el polímero PLA y el co-polímero PLGA al encapsular fármacos antitumorales**, durante la presente memoria de título se utilizaron técnicas de simulación molecular y cálculos de potencial de fuerza para explorar el comportamiento de **Rodamina B, Irinotecán y 5-Fluorouracilo** (ver Figura 2) y así entender la naturaleza de las interacciones entre los fármacos y nanopolímeros. De esta manera se espera aportar con valiosa información a nivel atómico sobre los tipos de enlaces/interacciones que forman y mantienen los complejos polímero-fármaco, lo cual permitirá un futuro desarrollo de nuevas y mejoradas NP transportadoras de drogas anticancerígenas.

2. Hipótesis

Tomando en consideración los antecedentes expuestos anteriormente, nosotros hipotetizamos que: “Nanopartículas formuladas con el copolímero PLGA cargan de forma más eficiente fármacos antitumorales menos hidrofóbicos (anfipáticos) que el polímero PLA, permitiendo así una liberación más prolongada de drogas en ambientes ácidos que rodean a células cancerígenas.”

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Estudiar el proceso de asociación/disociación entre fármacos que impiden la proliferación tumoral y polímeros biodegradables/biocompatibles mediante el uso de dinámicas moleculares clásicas, cálculos de energía libre y campos de fuerza reactivos, para su utilización en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos basados en nanopartículas poliméricas.

3.2 Objetivos específicos

1. Modelar y equilibrar nanopolímeros de PLA y PLGA utilizando campos de fuerza reactivos.
2. Generar nanopartículas de nano-polímeros y un grupo de 3 fármacos (Rodamina B, Irinotecán y 5-fluorouracilo) con diversas características a través de ReaxFF
3. Estimar la afinidad energética de distintos fármacos antitumorales por nanopartículas poliméricas a través de la metodología SMD y caracterizar estructuralmente los sitios de mayor afinidad de los fármacos.
4. Explorar la degradación y liberación de drogas encapsuladas en solvente explícito mediante dinámica molecular clásica.

4. Materiales y métodos.

Para llevar a cabo los objetivos de la presente memoria de título, se planteó el uso de un grupo de metodologías de simulación molecular, incluyendo el uso de campos de fuerza clásicos y reactivos, que serán la base para la formulación de los complejos de polímero-fármaco. Complementariamente, se desarrollaron dinámicas del tipo SMD para determinar la afinidad en los complejos creados con anterioridad. Además, se evaluaron estructuralmente los complejos con mejores valores energéticos para caracterizar las interacciones más importantes generadas entre el nanotransportador (NP polimérica) y los fármacos seleccionados. Finalmente se exploró en la degradación de las NPs ante un medio acuoso mediante dinámica molecular clásica.

Las simulaciones de dinámica molecular (DM) permiten modelar sistemas biológicos y estimar su comportamiento en el tiempo, utilizando ecuaciones del movimiento Newtoniano para evaluar el movimiento en el tiempo de moléculas que se encuentran interactuando. Adicionalmente, las dinámicas moleculares permiten observar el comportamiento de sistemas bajo distintas condiciones iniciales, controlando presión, temperatura, volumen o número de átomos, al mismo tiempo permite conocer dimensiones de los sistemas simulados como energía libre, entropía o trabajo. Esto permite ser un puente entre la teoría y el experimento (Durrant & McCammon, 2011; Hansson et al., 2002).

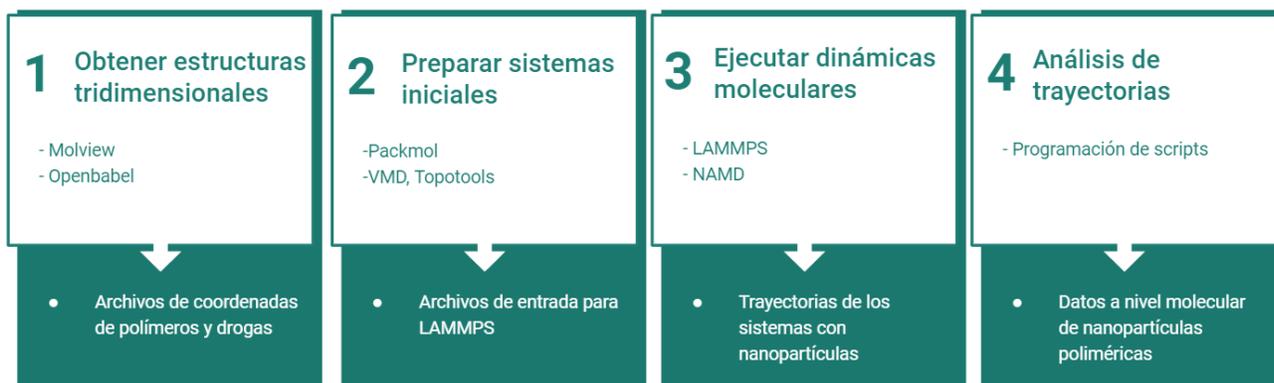


Figura 5. Esquema que describe el protocolo de dinámica molecular a implementar. Se muestran las principales etapas de preparación, ejecución y análisis de dinámicas moleculares. De igual manera, se

mencionan las herramientas computacionales para lograr cada paso. Finalmente, se ejemplifica el resultado a obtener en las distintas etapas.

4.1. Modelar y equilibrar nanopolímeros de PLA y PLGA utilizando campos de fuerza reactivos.

Si bien, las simulaciones de DM con campos de fuerza clásicos es un área que se ha desarrollado durante años y es un método ampliamente probado (Best et al., 2012; Vanommeslaeghe et al., 2010) este tipo de simulaciones sólo se limita a estudiar el cambio estructural a lo largo de un determinado tiempo. Es aquí, donde el uso de nuevos campos de fuerza puede ayudar a generar información más detallada del comportamiento físico-químico de distintos sistemas. Los Campos de Fuerza Reactivos (ReaxFF) (Senftle et al., 2016), permiten lograr este objetivo realizando una estimación de distancias y ángulos para todos los pares atómicos en cada paso de simulación, evaluando así el orden de enlace de cada par atómico y por lo tanto, permite romper como formar nuevos enlaces, lo cual no es posible calcular en métodos clásicos de DM (Senftle et al., 2016).

Los campos de fuerza ReaxFF han demostrado tener éxito en varios estudios pasados, como por ejemplo en el desarrollado por Matus y colaboradores en el año 2018 (Matus et al., 2018), estudio que devela el comportamiento estructural de los polímeros en la formación de NPs con PLA a través de campos de fuerza reactivos. Como resultado de la investigación realizada, se evidencia que las interacciones entre polímeros son del tipo electrostática, sin embargo, debido al gran costo computacional que implica estos estudios, no fue posible aplicar ReaxFF para caracterizar las interacciones entre el núcleo hidrofóbico y el fármaco estudiado. De una manera similar se ha utilizado ReaxFF para investigación en biomedicina, pero aplicado a otros casos de estudio, por ejemplo, en el trabajo de Douglas-Gallardo y colaboradores el año 2017 (Douglas-Gallardo et al., 2017) donde se utilizó ReaxFF, para estudiar los efectos de la oxidación en las propiedades plasmónicas en nanoclusters de aluminio. Dado lo expuesto sobre ReaxFF, en una primera etapa, se crearon los núcleos hidrofóbicos de las NP poliméricas usando dinámicas moleculares bajo el esquema de campos de fuerza reactivos. Para cumplir con lo mencionado, se utilizó el protocolo esquematizado en la Figura 5.

4.1.1 Preparación de la estructura tridimensional de complejos polímeros- fármacos y verificación de estados de protonación.

Se determinaron las estructuras moleculares de las unidades monoméricas de los polímeros PLA y PLGA (Figura 4), como también la estructura química de los fármacos: Rodamina B, 5-Fluorouracilo e Irinotecán (Figura 2), empleando la plataforma web Molview (Bergwerf, 2015). Molview es una herramienta para la obtención de estructuras tridimensionales de forma fácil, eficiente y gratuita a través de una plataforma web (Steinbeck et al., 2003). En detalle, las cadenas poliméricas de PLA se conforman por cadenas de 20 monómeros de ácido láctico, mientras que para PLGA contienen 10 monómeros de ácido láctico de forma continua y luego 10 monómeros de ácido glicólico. A partir de las cadenas obtenidas tanto de PLA como de PLGA, se manipuló y ajustó el formato de los archivos de coordenadas con el software OpenBabel (O'Boyle et al., 2011).

Se determinó el estado de protonación de cada una de las moléculas en estudio (PLA, PLGA, Rodamina B, 5-Fluorouracilo e Irinotecán) en todo el rango de pH utilizando el software MarvinSketch (Csizmadia, 1999). MarvinSketch, utiliza la estructura bidimensional de cada droga para estimar la probabilidad de encontrar a las moléculas en diferentes estados de protonación (cargadas o neutras) por medio de un cálculo de pKa. De esta manera, será posible seleccionar el estado de protonación de cada molécula para realizar las simulaciones de dinámica en un pH ácido, imitando al ambiente ácido que rodea a células cancerígenas

4.1.2 Creación de configuraciones iniciales de sistemas empacados.

Para estudiar el empaquetamiento de los distintos polímeros y con el fin de crear modelos manejables por los recursos computacionales disponibles (en una escala de relación aproximada de 1:10 contra las NPs a nivel experimental (Locatelli & Comes Franchini, 2012), se dispusieron 10 cadenas de polímero (20 monómeros cada uno) por cada núcleo utilizando el software

Packmol (Martínez et al., 2009). La disposición de estas cadenas fue determinada aleatoriamente en el espacio de trabajo predeterminado. Para obtener las configuraciones iniciales representativas de la formación de los núcleos hidrofóbicos, y con el fin de asegurar completamente que un nanotransportador no interactúa consigo mismo por las condiciones de contorno periódicas propias de la simulación molecular. Para ello, se fijó un espaciado de 60 \AA^3 tanto para PLA como PLGA. De esta manera, la NP formada estará ubicada en un espacio lo suficientemente ancho respecto a los bordes de la caja del sistema durante las simulaciones moleculares. Adicionalmente, con el fin de determinar la distribución óptima de polímeros para un ensamblado eficiente, se establecieron distintas distancias interpoliméricas iniciales entre cadenas (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 \AA), para en una etapa posterior facilitar el ensamble en conjunto con fármacos.

4.1.3 Ejecución de dinámica molecular con campo de fuerza reactivo para los polímeros PLA y PLGA.

Se utilizó un enfoque de dinámica molecular, bajo la parametrización de campos de fuerza reactivos, para explorar el modo de unión y ensamblado estructural de cadenas poliméricas de PLA y PLGA. Para este propósito, se usó el *software* LAMMPS (Thompson et al., 2022) el cual permite realizar tanto simulaciones atomísticas de gran escala, como también la integración de esta clase de campos de fuerza (Aktulga et al., 2012). Dado lo anterior, en una primera etapa se emplearon simulaciones con campo de fuerza reactivo, ya que, permiten estudiar la formación y ruptura de enlaces, especialmente en sistemas poliméricos en los cuales no existen datos claros que demuestren la naturaleza de estas interacciones (electrostáticas o covalentes). Producto de lo mencionado, el uso de LAMMPS en simulaciones de campos de fuerza reactivos se respalda en el interés de entender la naturaleza de las interacciones involucradas en la formación de núcleos hidrofóbicos y su interacción con fármacos antitumorales. Adicionalmente, esta metodología ha mostrado un buen rendimiento entre detalle de interacción y tiempo de simulación en comparación con métodos similares o cuánticos. Tal como describen sus desarrolladores, está

tipo de campo de fuerza está especialmente orientado al desarrollo y caracterización de nanomateriales como polímeros (Senftle et al., 2016).

Inicialmente, los sistemas moleculares se ensamblaron utilizando el software VMD (Humphrey et al., 1996), en el cual mediante la herramienta Topotools (Axel Kohlmeyer et al., 2020) se asignó la topología de cada molécula, es decir, los tipos de átomos, enlaces, masas y cargas tanto de los polímeros como de los fármacos antitumorales involucrados en este estudio. La construcción de los sistemas poliméricos se realizó siguiendo el protocolo planteado por Matus y colaboradores (Matus et al., 2018). En concreto, se prepararon 9 sistemas considerando dos tipos de polímeros (PLA y PLGA) a distintas distancias iniciales (entre cada cadena de polímero). Por otro lado, para favorecer el empaquetamiento de los núcleos hidrofóbicos, se dio uso a un potencial de solvente implícito, replicando de esta forma las condiciones experimentales sin un costo excesivo en el número de átomos del sistema (no se agregan los átomos de solvente correspondientes al sistema). Cabe destacar, que en base a simulaciones previas, se han reportado resultados donde los polímeros usados son hidrolizados al tener contacto con moléculas de agua (Dasgupta et al., 2020; Mlyniec et al., 2016). Por tanto, se descarta el uso del esquema de moléculas de agua como solvente explícito. Por consecuencia, con el objeto de diseñar un protocolo de simulación molecular eficiente en el cual se pudiesen abordar las simulaciones de los complejos polímeros-fármacos implicados, se ejecutaron dinámicas del tipo Langevin (Dünweg & Paul, 1991), donde cuya característica principal es el uso de solvente implícito imitando la viscosidad que entrega un solvente.

Con la finalidad de identificar las conformaciones de mínima energía de los núcleos poliméricos, a cada sistema se le aplicó una minimización por 5000 pasos utilizando un algoritmo de gradiente conjugado de Polak-Ribiere (Grippio & Lucidi, 1997) en una dinámica molecular del tipo Langevin donde se aplicó un coeficiente de fricción de 30 ps^{-1} . Adicionalmente, para controlar la temperatura durante las simulaciones se utilizó un termostato de Langevin (Pastorino et al., 2007) para mantener la temperatura del sistema a 310° K . A razón de que el uso de dinámicas Langevin en el *software* LAMMPS no permite la integración del tiempo, se debe aplicar un ensamble termodinámico microcanónico, que permite mantener constante el número de partículas, volumen y la energía para actualizar las velocidades y posiciones de los átomos

(Grønbech-Jensen, 2020). Finalmente, se equilibró cada sistema por 0,5 nanosegundos y se ejecutó un tiempo de producción de 4,5 nanosegundos, empleando un tiempo de integración de 1 femtosegundo (fs).

4.1.4 Análisis de la estructura de los núcleos de polímeros.

Para asegurar y comprender el proceso de empaquetamiento de los núcleos poliméricos, se analizaron las trayectorias de dinámica molecular obtenidas de las NPs en ausencia de fármacos. De esta manera se analizó el radio de giro de los núcleos para evaluar el grado de esfericidad de las NPs, permitiendo determinar también el grado de compactación de los núcleos hidrofóbicos.

4.2. Evaluar los complejos nanopartículas-fármaco de polímeros PLA Y PLGA con el grupo de tres fármacos (Rodamina B, Irinotecán y 5-fluorouracilo) a través de ReaxFF.

Se evaluó el empaquetamiento y la capacidad de carga de fármacos en cada NP polimérica, se crearon los complejos de polímeros de PLA y PLGA, encapsulando Rodamina B, 5-Fluorouracilo e Irinotecán de forma independiente con ambos polímeros a distintas concentraciones (18 complejos en total).

4.2.2 Creación complejos iniciales de polímero-fármaco.

A partir de las estructuras obtenidas en el punto 4.1.1, se crearon las configuraciones iniciales de los complejos polímero-fármaco con el *software* Packmol (Martínez et al., 2009). Para las moléculas Rodamina B, 5-Fluorouracilo e Irinotecán se establecieron distintos sistemas iniciales con una relación cadenas de polímero-fármaco de 10:1, 10:2 y 10:3 (18 sistemas iniciales). Lo anterior, corresponde a la evaluación de la capacidad de carga de cada polímero

frente a distintas cantidades de droga. Los sistemas anteriores estarán confinados en una caja ficticia y periódica de 100 \AA^3 . Adicionalmente, con el *plugin* topotools (Axel Kohlmeyer et al., 2020) se asignaron las cargas correspondientes a los distintos estados de protonación obtenidos en el punto 4.2.1.

4.2.3 Ejecución de simulaciones de dinámica molecular de los complejos polímero-fármaco con ReaxFF.

Con el fin de comparar el encapsulamiento estructural de los fármacos estudiados dentro del núcleo hidrofóbico de las NPs poliméricas, se establecieron las mismas condiciones de solvente implícito descritas en el punto 4.1.4. Cada sistema polímero-fármaco (18 sistemas totales) fue sometido a 5000 pasos de minimización, 1 ns de equilibrado y finalmente 4 ns de producción para la recolección de datos de la trayectoria de dinámica molecular. Todo lo anterior, utilizando el esquema de campos de fuerza reactivos bajo la misma configuración mencionada anteriormente, implementada en el software LAMMPS. Este tipo de simulación nos permitió entender la naturaleza de la interacción polímero-fármaco, además de estimar la cantidad de droga que puede ser encapsulada ante distintos estados de protonación de los nanopolímeros.

4.3. Estimar la afinidad energética de los complejos nanopartícula-fármaco utilizando la metodología SMD y caracterizar estructuralmente los sitios de mayor afinidad de los fármacos.

Con el fin de establecer un ordenamiento de afinidades intermoleculares entre las NPs (PLA/PLGA) y los fármacos (Rodamina B, 5-Fluorouracilo e Irinotecán), se ejecutaron cálculos de dinámica molecular dirigida (*Steered molecular dynamics, SMD*), método que se representa en la Figura 6. En detalle, SMD puede explicarse en términos del desplazamiento de una molécula desde un sitio de unión, en este caso desde el núcleo polimérico, hasta un medio externo (medio acuoso). Es pertinente destacar que la distancia que recorre la molécula de interés en SMD, debe

ser suficientemente grande para alcanzar una diferencia en donde no existan interacciones de ningún tipo con el núcleo hidrofóbico. Así, durante este proceso de desplazamiento se registran todas las fuerzas involucradas en la unión del ligando con la estructura de la NP, mientras se conserva una velocidad de movimiento constante.

La metodología SMD permite explorar conformaciones estructurales que no son observables en una dinámica molecular clásica, en donde a diferencia de simular los posibles estados energéticos de un sistema basado en la naturaleza de los átomos presentes, en este tipo de simulaciones se obliga a una molécula a recorrer una coordenada de reacción determinada, forzando al sistema (polímero-fármaco) salga de su equilibrio conformacional permitiendo encontrar nuevos mínimos y máximos de fuerza, relacionados a distintas afinidades moleculares dentro de cada complejo. Consecuentemente mediante la aplicación de esta metodología es posible obtener un estimado de la energía libre de unión (ΔG_{bind}) considerando la igualdad de Jarzynski. Esta ecuación (Ecuación 1), relaciona la diferencia de energía libre entre dos estados. Este cálculo es estimado a través de la fuerza y el trabajo irreversible de transportar una molécula entre dos puntos de un ensamble de trayectorias que conectan una misma coordenada de reacción (Park et al., 2003). Interesantemente, al considerar esta igualdad es posible estimar un perfil de fuerza media (del inglés *Potential Mean Force* (PMF)) asociado a la separación de dos estructuras moleculares, permitiendo categorizar la diferencia de afinidad de distintas moléculas por un mismo receptor.

$$\langle e^{-W/KbT} \rangle = e^{-\Delta F/KbT}$$

Ecuación 1. Igualdad de Jarzynski, donde e es energía, W es el trabajo, Kb es la constante de los gases para un estado b y T la temperatura.

4.3.1 Preparación de sistemas para SMD.

Se configuró SMD en 6 de los complejos de polímero-fármaco mencionados. Se utilizó como punto de partida las conformaciones finales de las simulaciones de equilibrio bajo el esquema de campos de fuerza reactivos del punto 4.2.3 en los complejos que presentaban una

relación 3:10. Se procedió a solvatar los sistemas en una caja de agua de 150 \AA^3 mediante el *software* VMD (Humphrey et al., 1996). Posteriormente, utilizando el *plugin* psfgen implementado con el *software* VMD se creó la topología necesaria para ejecutar los cálculos de dinámica molecular dirigida en el *software* NAMD2 (Phillips et al., 2020) empleando el campo de fuerza CHARMM36 (Vanommeslaeghe et al., 2010). Es de relevancia mencionar que los parámetros de polímeros, fármacos y fluoróforo fueron determinados con la plataforma web Paramchem (Vanommeslaeghe et al., 2012) para su aplicación con el campo de fuerza ya mencionado.

4.3.2 Ejecución de cálculos SMD.

A modo de mantener la posición inicial de la NP, se fijó en el espacio del sistema la posición de los átomos de carbono presente en los extremos y centro de las cadenas poliméricas. Adicionalmente, se configuró la coordenada de reacción sobre uno de los compuestos de los complejos estudiados, se usó una distancia de mínimo 35 \AA con dirección en el eje X del mismo sistema, de manera que las moléculas (Rodamina B, 5-Fluorouracilo e Irinotecán) exploren distintas conformaciones a lo largo de SMD. En particular, se empleó una velocidad de tiro de 1 \AA/ns sobre un átomo de los distintos ligandos cargados dentro de la NP, hasta asegurar que la droga se encontrara fuera del rango de interacción con la NP. Para asegurar el correcto muestreo de la coordenada de reacción, se realizaron 3 réplicas (18 sistemas totales) para cada cálculo SMD, asegurando con esto que los resultados obtenidos fuesen los correctos. Además, en base a los datos obtenidos de las distintas dinámicas moleculares dirigidas, se obtuvo la fuerza idónea por tiempo de tiro que permitieron la extracción de la droga desde el interior del núcleo hidrofóbico de NPs poliméricas.

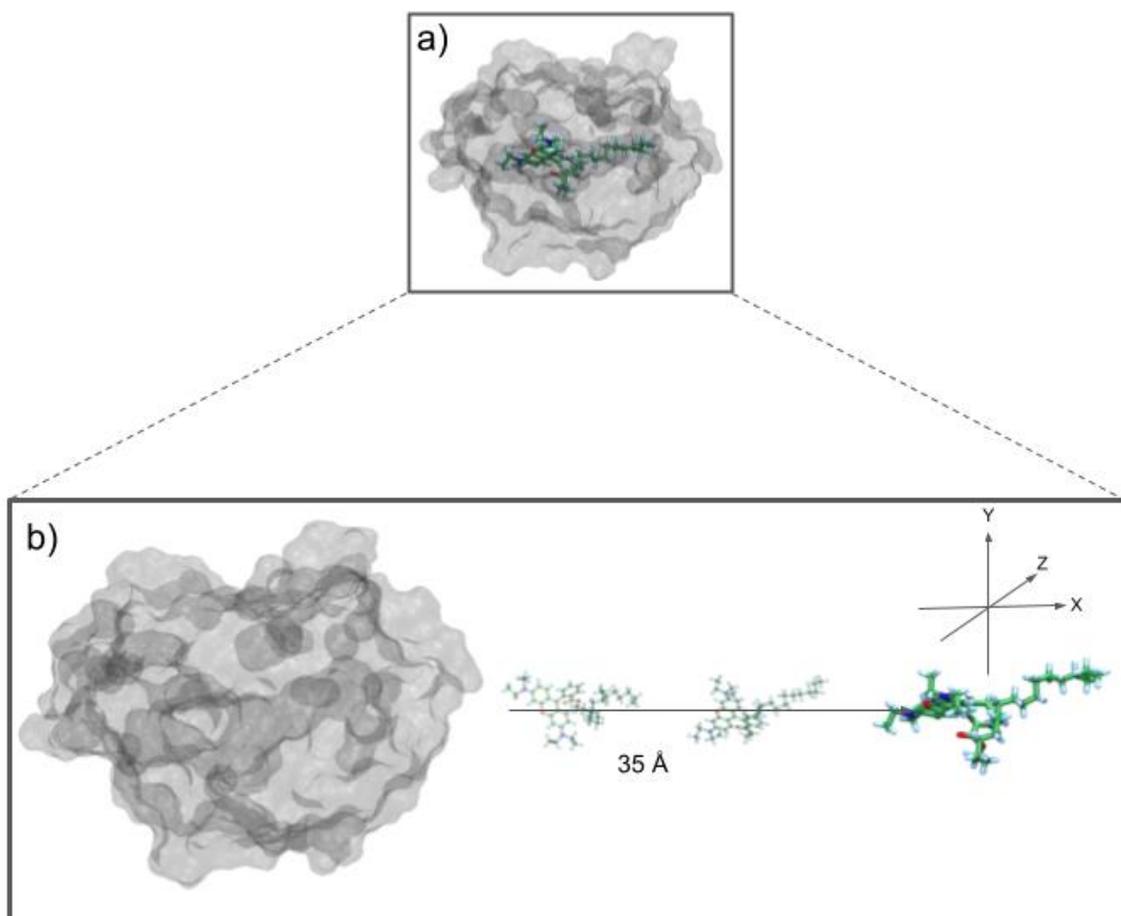


Figura 6. Representación de la coordenada de reacción a utilizar en SMD. a) Complejo polímero-fármaco. **b)** Procedimiento *Steered Molecular Dynamics* aplicado al extraer la droga desde la nanopartícula, siendo la coordenada de reacción una distancia de 20 Å en el eje x.

4.3.3 Caracterización estructural de los sitios de mayor afinidad identificados en las simulaciones de SMD.

Se realizó una caracterización sobre las conformaciones representativas de sitios de alta afinidad (mayor fuerza de interacción) obtenidos en los gráficos de fuerza generados por SMD. De esta forma se logró observar las interacciones que rigen el encapsulamiento de fármacos en NPs poliméricas. Se estudiaron 2 conformaciones desde cada sector de alta afinidad. De este modo, mediante la examinación de las estructuras polímero-fármaco extraídas, se determinaron las posibles interacciones claves dentro de cavidades (o bolsillos) generados en las NPs. Lo

anterior, permite entender la naturaleza de las interacciones intermoleculares existentes entre los fármacos y el interior de las NPs.

4.4. Explorar la degradación de nanopartículas y liberación de una molécula de interés ante un solvente en dinámica molecular clásica.

Se planteó un modelo de NPs a partir de los polímeros estudiados recubiertos por PEG que a su vez contienen moléculas de Rodamina B. Esta NP fue expuesta al solvente, en este caso agua, para comenzar su degradación producto de las propiedades fisicoquímicas intrínsecas de los polímeros (Bee et al., 2018). De esta forma, la metodología de simulación de dinámica clásica a través de campo de fuerza CHARMM36, permitió el estudio de la dispersión de estas moléculas, analizando el espacio del sistema simulado para estimar el nivel de degradación de la NP y liberación del fármaco.

4.4.1 Creación de configuraciones de estructuras iniciales para los sistemas a simular.

Se generaron conformaciones iniciales utilizando nuevamente el software *Packmol* (Martínez et al., 2009). Se dispuso de 10 moléculas de rodamina B en un espacio esférico al centro del sistema abarcando un diámetro de 15 Å, esta esfera central fue recubierta disponiendo las cadenas de polímeros (PLA/PLGA) nuevamente en espacio conformacional esférico menor de 50 Å de diámetro, seguido de una última capa esférica de PEG-2000 en un diámetro de 80 Å, que entregó como resultado un gran sistema inicial esférico de tres capas (núcleo de rodamina B, capa hidrofóbica y capa exterior hidrofílica). Es a partir de este posicionamiento inicial para el complejo fluoróforo-polímeros, que se dió lugar a los archivos de topología con el uso del *plugin* *psfgen* implementado en el *software* VMD (Humphrey et al., 1996), de la misma manera que en el punto 4.3.1.

4.4.2 Formación de nanopartículas con Rodamina B en vacío.

Se ejecutaron cálculos de dinámica molecular con el software NAMD2 (Phillips et al., 2020) aplicando los parámetros entregados por el campo de fuerza CHARMM36. Para realizar esto, se aplicó una minimización de 10000 pasos para posteriormente efectuar 10 nanosegundos de equilibrado y 40 nanosegundos de producción en vacío. Para la realización de ello, se utilizó un ensamble isotérmico-isobárico, manteniendo la temperatura y presión constante usando el barostato y termostato de Langevin (Pastorino et al., 2007). Se utilizó un tiempo de 4 femtosegundos (4 fs) para integrar las ecuaciones de movimiento, aplicando el método de repartición de masa de hidrógenos (Hopkins et al., 2015).

4.4.3 Ejecución de dinámicas de nanopartículas en solvente.

Tomando como punto de partida las configuraciones finales de los sistemas obtenidos en el paso 4.4.2, se solvataron los sistemas con el *software* VMD en una caja de agua de 160 \AA^3 cada sistema. Al igual que en el punto 4.4.1, se utilizó psfgen en el software VMD para crear los archivos de topología necesarios que contienen los parámetros de los polímeros, fluoróforo y agua. Se realizó una minimización de 10000 pasos, un equilibrado de 10 nanosegundos y 30 nanosegundos de producción en el software NAMD2 bajo el campo de fuerza CHARMM36 y utilizando los mismos parámetros del punto 4.4.2.

4.4.4 Análisis de dinámicas de nanopartículas en solvente.

Se realizó un análisis de la distribución en el tiempo de las distintas moléculas presentes en el sistema, para lo cual se calculó la función de distribución radial (RDF) que incluye el software VMD. Este análisis es ampliamente usado para determinar la densidad de determinados elementos entre dos puntos, en otras palabras, el RDF permite evidenciar la presencia de moléculas vecinas a un punto en el espacio, determinado cuán ordenada es una estructura biológica en particular (Levine et al., 2011). Es mediante las gráficas de dispersión generadas se

observaron las diferencias entre la degradación de las NPs con PLA y PLGA bajo condiciones similares.

5. Resultados.

5.1. Modelar y equilibrar nanopolímeros de PLA y PLGA utilizando campos de fuerza reactivos.

5.1.1 Preparación de la estructura tridimensional de complejos polímeros- fármacos y verificación de estados de protonación.

Las estructuras químicas para los compuestos Rodamina B, Irinotecán y 5-Fluorouracilo (Figura 2) fueron generadas en la plataforma web Molview (Bergwerf, 2015). En cuanto a los polímeros PLA y PLGA, se crearon los 20 monómeros de la cadena de ácido poli-láctico y los 10 monómeros de cadena de ácido láctico conjugadas con los 10 monómeros de ácido glicólico respectivamente. A partir de las estructuras obtenidas de Molview se realizó un estudio de pKa con el *software* MarvinSketch (Csizmadia, 1999), en donde se tomó en cuenta las especies bajo el estado de protonación dentro del rango de pH [5.5 – 7], correspondiente a un entorno biológico normal y otro entorno cancerígeno. Para todas las moléculas se obtuvo un solo estado de protonación (Figura 7) correspondiente al rango de pH de interés.

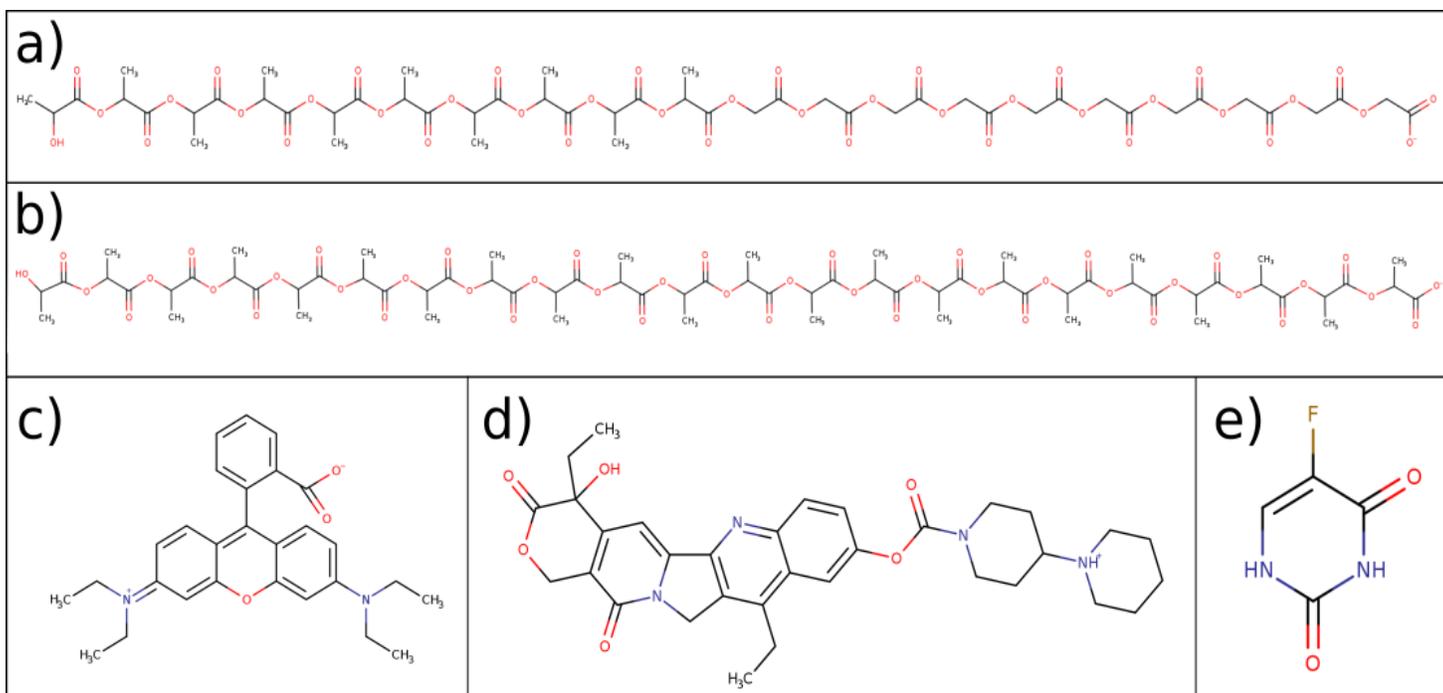


Figura 7. Representación estructural de estados de protonación en polímeros, moléculas antitumorales y de marcaje molecular. Estados de protonación de moléculas en estudio a rango de pH 5.5-7. (a) PLGA. (b) PLA. (c) Rodamina B. (d) Irinotecán. (e) 5-Fluorouracilo.

Para los polímeros PLA y PLGA se observa su terminal carboxilo desprotonado dando lugar al grupo terminal $R-COO^-$ en ambos casos (ver Figura 7.a, 7.b). Para el compuesto rodamina B, adicionalmente a su nitrógeno con carga positiva (su forma comercial), se detecta para los rangos de pH estudiados que, al igual que los polímeros, tiene un grupo carboxilo que pasa a ser $R-COO^-$ junto al anillo bencénico superior, (ver Figura 7.c). En el caso del fármaco irinotecán, se observa la protonación del nitrógeno al extremo de la molécula que une al anillo heterocíclico, (ver Figura 7.d). Finalmente, en la droga 5-Fluorouracilo, no se observan cambios respecto a la molécula obtenida desde Molview (ver Figura 7.e).

5.1.2 Ejecución de dinámica molecular con campo de fuerza reactivo para los polímeros PLA y PLGA.

A través del *software* Packmol (Martínez et al., 2009) se obtuvieron los productos iniciales para los sistemas de NPs a ensamblar. Se dispusieron 9 sistemas iniciales tanto para PLA y PLGA desde una distancia mínima de 2 hasta una distancia máxima de 10 Å, dando como resultado las ubicaciones aleatorias de las cadenas de polímeros extendidas en un espacio de 60 Å.

Las DM fueron realizadas tal como se indica en el punto 4.1.3 utilizando el *software* LAMMPS implementado con el campo de fuerza ReaxFF. A partir de las 18 dinámicas moleculares se observó la formación de núcleos pseudo-esféricos a excepción de las distancias iniciales de 9 y 10 Å para el polímero PLA y de 10 Å iniciales para el polímero PLGA, sistemas que no se vio la formación de una NP definida debido a que no todas las cadenas se encuentran interactuando entre sí.

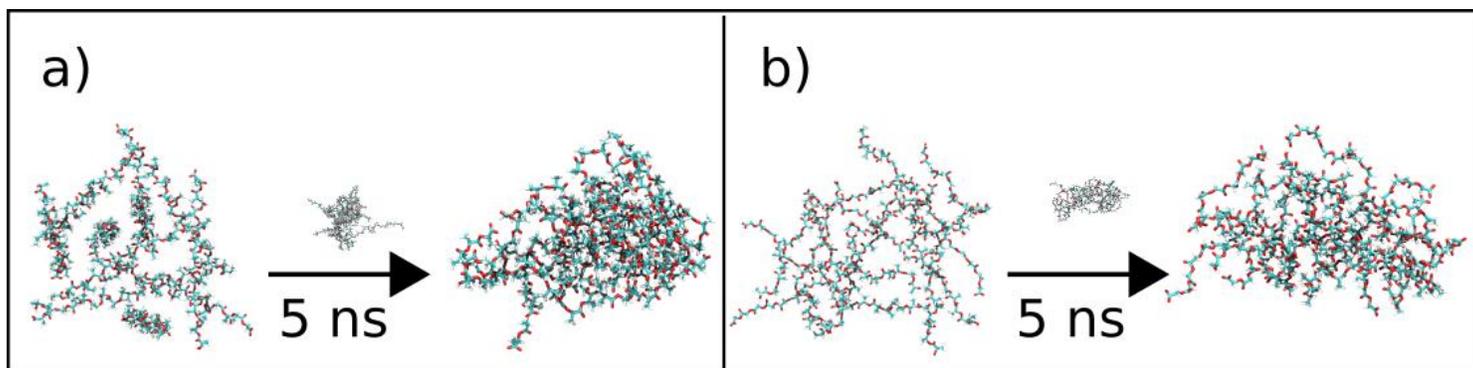


Figura 8. Formación de nanopartículas en dinámicas moleculares reactivas. Sistemas iniciales y finales de formación de núcleo polimérico con una distancia inicial de 5 Å. (a) Sistema de PLA. (b) Sistema de PLGA.

Tal como se observa en la figura 8, la compactación de los núcleos hidrofóbicos, atraviesan un proceso en el cual se estabilizan hasta que las cadenas poliméricas se orientan hacia la NP en formación, esto se puede visualizar en los estados de transición en 8.a) y 8.b) que corresponden a los momentos en que no existe un orden determinado entre cadenas en ambos polímeros.

Además, se evidencia, que durante la DM con el campo de fuerza ReaxFF no se observa la formación y tampoco la ruptura de enlaces entre cadenas, donde las interacciones electrostáticas y la gran flexibilidad de los polímeros corresponden a los facilitadores en la compactación observada. Adicionalmente, es destacable que los núcleos formados presentan pequeñas aberturas entre las cadenas, hendiduras que podrían ser utilizadas por distintas moléculas para ser cargadas dentro de la NP.

Sobre la base de las DM en el punto 5.1.3, se analizaron los radios de giro durante los 5 nanosegundos totales simulados, con el fin de establecer la distancia inicial mínima que permitiera obtener una NP lo suficientemente esférica, y a la vez, que las interacciones que ocurren entre las cadenas al compactarse no sean abruptas. Se descartó el uso de distancias menores a 4 Å y mayores a 8 Å de distancias, dado que a distancias pequeñas y tal como se observa en la figura 9, existe una formación acelerada de las NP en un tiempo menor a los 2 ns, y a su vez en distancias superiores a 8 Å no existe una clara definición de NP pseudo-esféricas. En cuanto a las distancias de 5 hasta 7 Å se observó un comportamiento similar a lo largo de la DM, llegando a un radio de giro de 17 Å aproximados para PLA y PLGA que coincide con los resultados obtenidos por Matus y colaboradores (Matus et al., 2018). Producto de los datos obtenidos del radio de giro de las NP, se determinó una distancia mínima inicial de 5 Å para disponer espacialmente las cadenas poliméricas y las moléculas en estudio para la formación de los complejos polímero-fármaco.

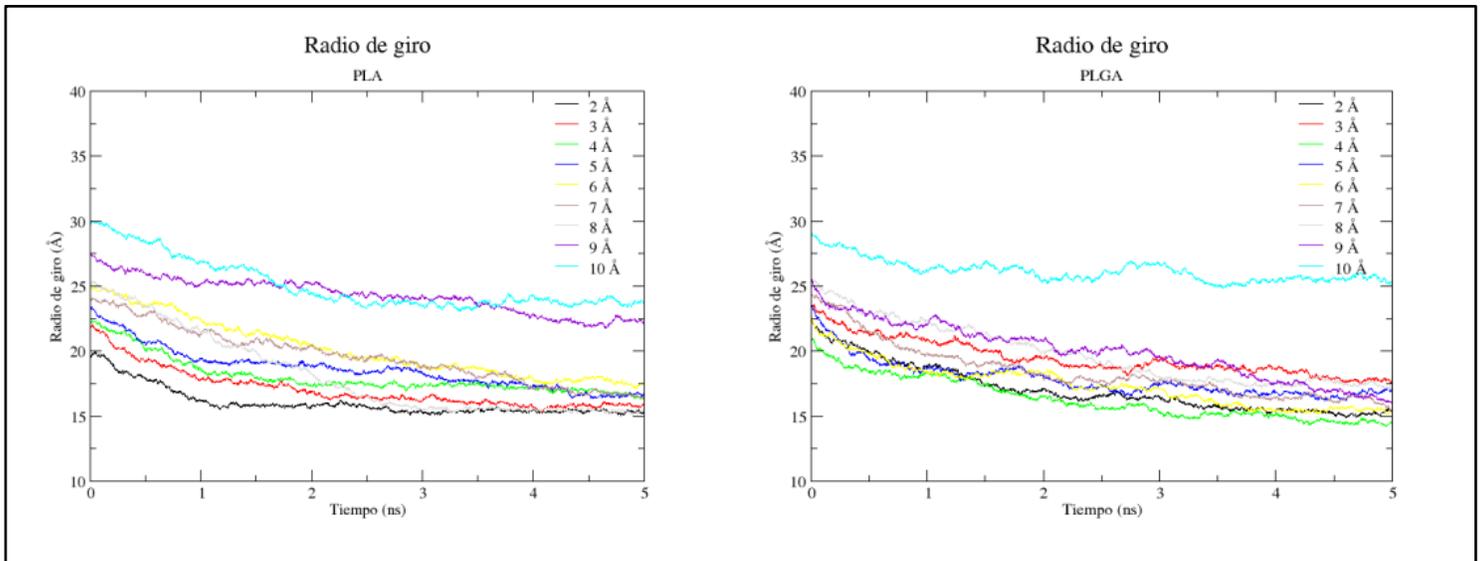


Figura 9. Radio de giro en polímeros PLA y PLGA. Sistemas tanto de PLA (a) como PLGA (b) a distintas distancias iniciales en un tiempo de DM de 5 ns.

5.2. Evaluar los complejos nanopartículas-fármaco de polímeros PLA Y PLGA con el grupo de tres fármacos (Rodamina B, Irinotecán y 5-fluorouracilo) a través de ReaxFF.

5.2.1 Relajación de los complejos polímero fármaco con ReaxFF.

Se generaron 3 sistemas iniciales para cada molécula de interés (rodamina b, irinotecán y 5-fluorouracilo) con ambos polímeros (PLA y PLGA) empleando el *software* packmol, las distintas disposiciones polímero-fármaco fueron a razones de 1:10, 2:10 y 3:10 (fármaco:polímero) usando una separación mínima de 5 Å tal cómo se indica en el punto 5.1.2.

Se ejecutó el protocolo descrito en el punto 4.2.2, en donde se utilizaron campos de fuerza reactivos para obtener DM de 5 ns y se analizó el radio de giro durante la compactación de los complejos en estudio.

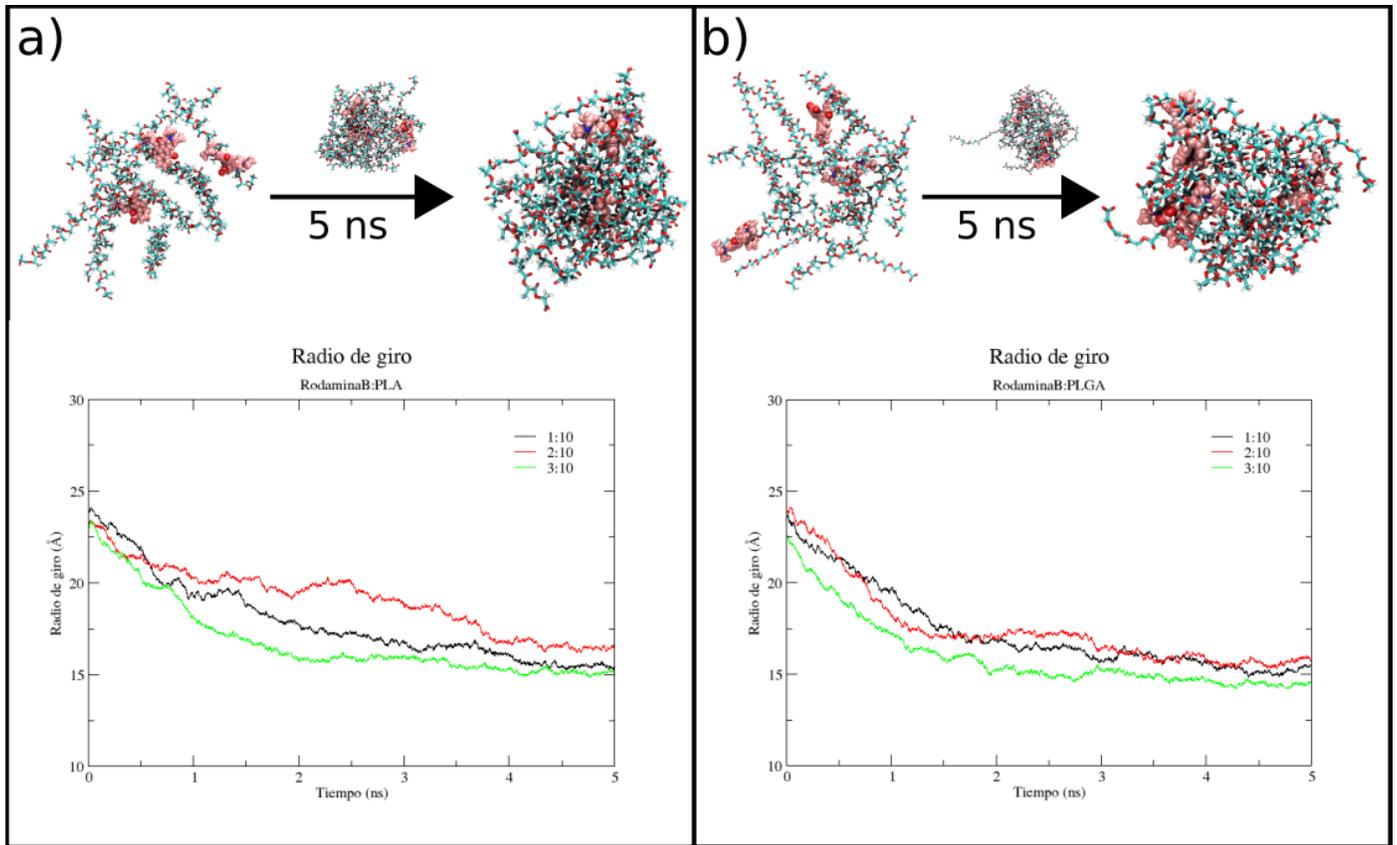


Figura 10. Radio de giro durante formación de nanopartícula rodamina B-polímeros a distintas concentraciones. En la parte superior se muestra la formación de las NP para la concentración 3:10. (a) Rodamina B-PLA (b) Rodamina B-PLGA

La Figura 10 muestra un comportamiento similar en el comportamiento de ambas nanopartículas al encapsular a rodamina B, destacando que en las 3 concentraciones se llega a un radio de giro cercano a 15 Å, lo cual es menor al observado para el empacamiento del polímero sin droga (ver Figura 8). En cuanto a las razones de 2:10 y 1:10, el volumen del núcleo formado fue mayor e incluso se evidencia (figura 8, línea roja) que en ambos casos sufren un aumento en su radio de giro durante la DM.

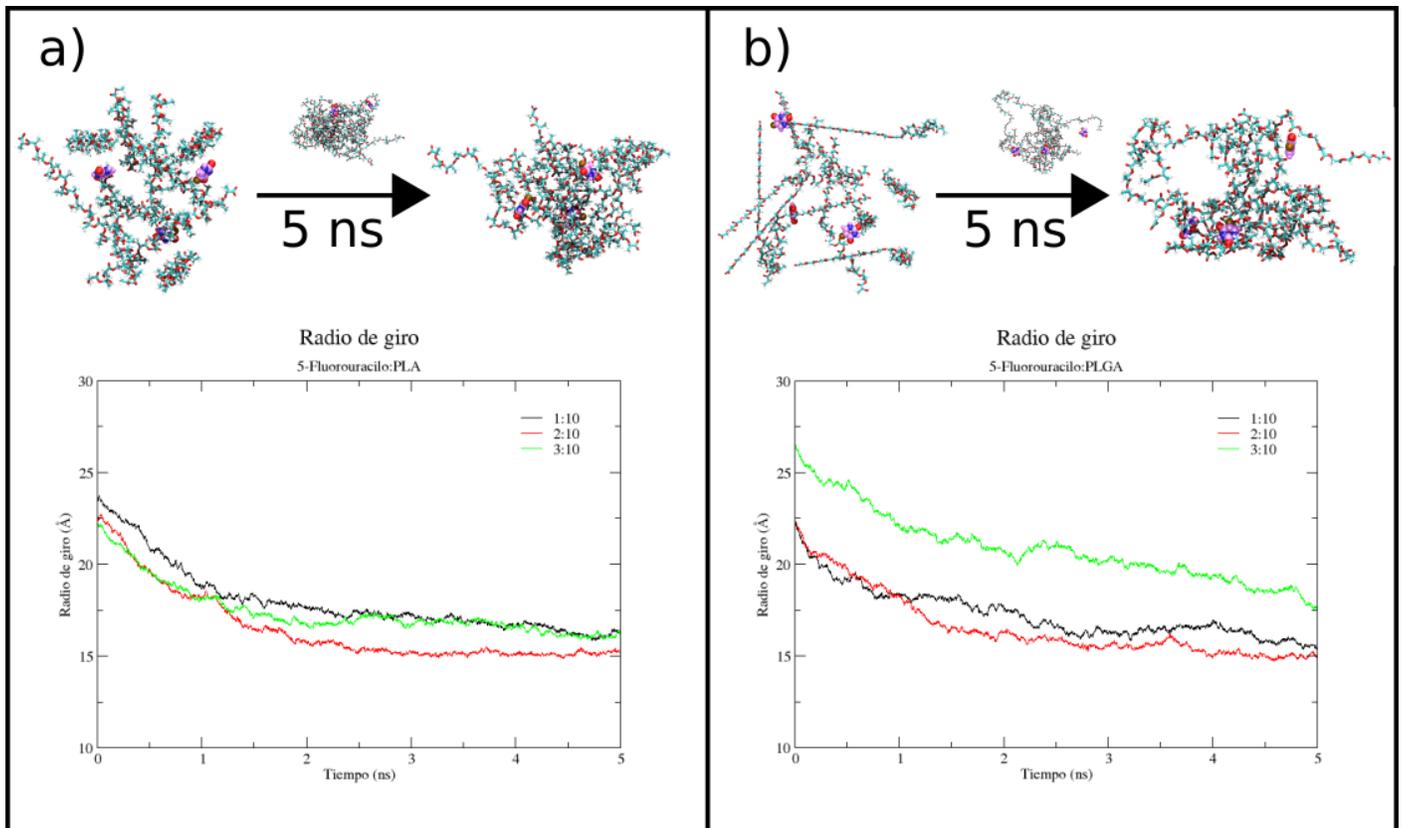


Figura 11. Radio de giro durante formación de nanopartícula 5-fluorouracilo-polímeros a distintas concentraciones. En la parte superior se muestra la formación de las NP para la concentración 3:10. (a) 5-fluorouracilo -PLA (b) 5-fluorouracilo-PLG.

En la figura 11 se exponen los radios de giros de las NP de PLA y PLGA con 5-fluorouracilo. Se destaca que, a pesar de utilizar un fármaco antitumoral de tamaño pequeño, el grado de empaquetamiento fue similar a las obtenidas para rodamina B e irinotecán respectivamente (figura 10 y 12). La figura 11 muestra que el modelo de razón 2:10 muestra una compactación mayor (menor radio de giro) considerando ambos polímeros. También es importante destacar que para todos los sistemas evaluados, la razón 3:10 muestra un comportamiento similar al observado para 1:10, lo cual resalta la capacidad de carga de droga y compactación de la razón 2:10.

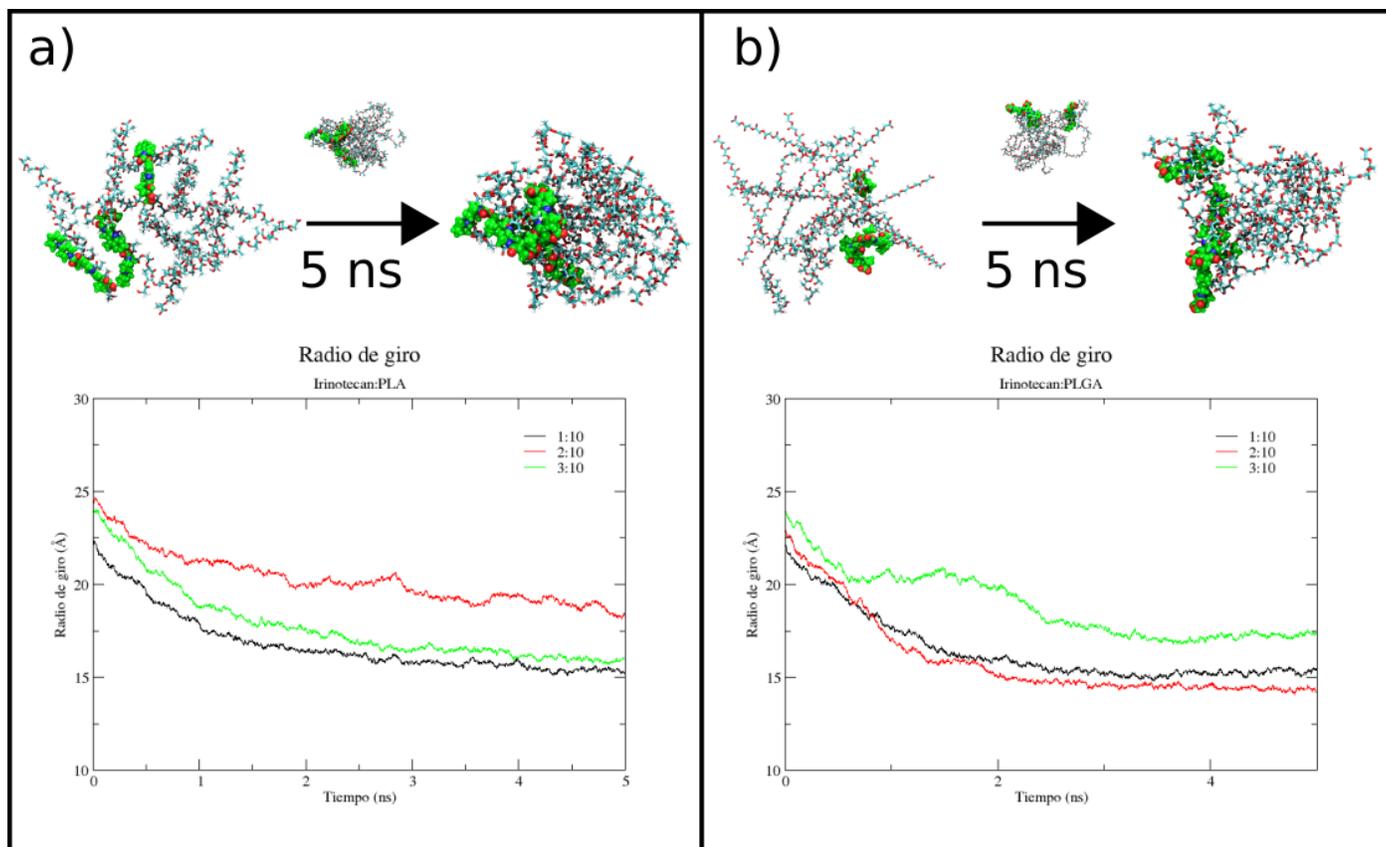


Figura 12. Radio de giro durante formación de nanopartícula irinotecán-polímeros a distintas concentraciones. En la parte superior se muestra la formación de las NP para la concentración 3:10. (a) Irinotecán-PLA. (b) Irinotecán-PLGA.

Para el caso particular de los sistemas de los polímeros con irinotecán (ver Figura 12), sólo existen similitudes entre los sistemas de relación 1:10 que llegan a un radio de giro aproximado de 15 Å. Entre estos estos sistemas a baja concentración resulta ser mejor PLA en cuanto a la compactación de la NP, no así para PLGA, que demostró un mejor resultado al tener casi 14 Å de radio de giro para el sistema 2:10. Los sistemas de razón 2:10 en PLA y 3:10 PLGA, mostraron un aumento de casi 2.5 Å más en el mismo análisis, comportamiento que lleva a tener NPs menos esféricas, cualidad fundamental de una NP (Locatelli & Comes Franchini, 2012). Bajo los datos obtenidos, a diferencia de rodamina B y 5-fluorouracilo, el comportamiento de irinotecán es poco estable en ambos polímeros, esto sugiere que el gran tamaño del fármaco utilizado puede variar el tiempo y el grado de empaquetamiento en que se obtiene en las NP.

5.3. Estimar la afinidad energética de los complejos nanopartícula-fármaco utilizando la metodología SMD y caracterizar estructuralmente los sitios de mayor afinidad de los fármacos.

5.3.1 Ejecución de cálculos SMD.

Se realizaron los cálculos de *Steered Molecular Dynamics* con los sistemas obtenidos de las dinámicas moleculares realizadas en el punto 5.2. Se utilizaron las dinámicas de razón 3:10, debido a que en condiciones experimentales las NPs contienen más de una molécula de interés. El cálculo de SMD requiere seleccionar un átomo desde el cual aplicar la fuerza de tiro, como también mantener la estructura “hospedadora” restringida al centro de masas del sistema para evitar que se desplace en el sentido de aplicación de la fuerza. Así, se seleccionó el átomo cargado de los fármacos rodamina B e irinotecán, así como también el átomo de flúor de 5-fluorouracilo como átomos al que se le aplicó la fuerza a velocidad constante, mientras que todas las moléculas de PLA y PLGA se fijaron en el espacio del sistema.

A través del *software* NAMD2, se llevaron a cabo los SMD aplicando una fuerza constante de tiro de 1 Å/ns hasta una distancia de 10Å fuera del núcleo polimérico, de manera tal que se realizaron DM durante 40 ns para rodamina B, 35 ns para 5-fluorouracilo y 52 ns para irinotecán.

5.3.2 Caracterizar estructuralmente los sitios de mayor afinidad identificados en las simulaciones de SMD.

En base a las simulaciones de SMD se obtuvieron trayectorias en que siempre el ligando logró salir de la nanopartícula. La figura 13 muestra los gráficos de fuerza obtenidos para la molécula Rodamina B frente a PLA (A) y PLGA (B). En detalle, en la parte superior se destacan las conformaciones estructurales representativas de los puntos de mayor fuerza observados en cada gráfico. Durante el recorrido realizado por rodamina B hacia el exterior de las NP, en ambos polímeros se manifiestan distintos rangos de fuerza, en los que ocurren los eventos durante SMD. Se observa en la figura 13.a, que los *peaks* de fuerza para PLA se encuentran en el rango de 40 (kcal/mol/Å), en cambio para PLGA (figura 13.b) superan a los 50 (kcal/mol/Å), es decir, las

interacciones con este polímero tienden a ser más fuertes, lo que a su vez se podría interpretar como una liberación más lenta del fluoróforo.

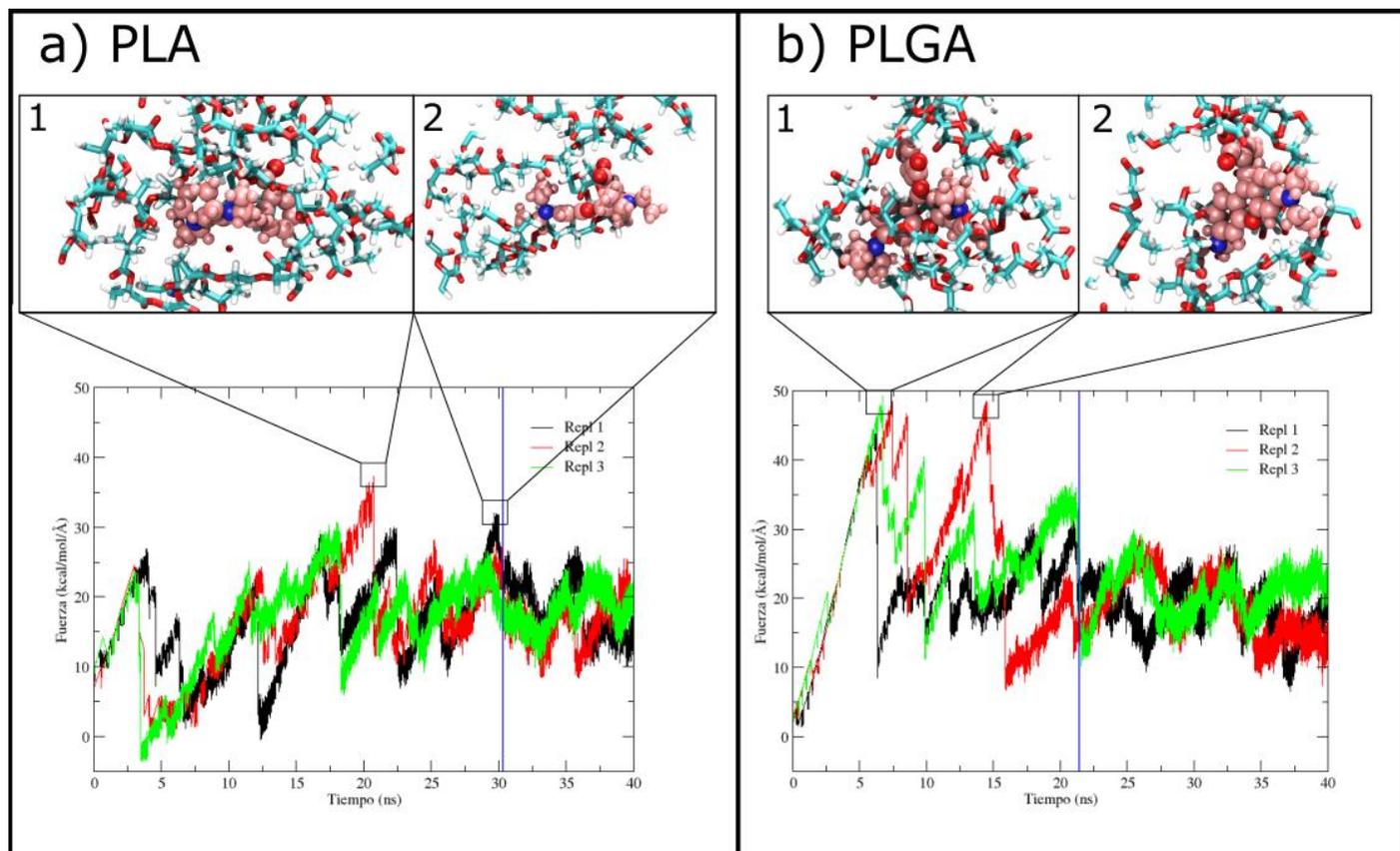


Figura 13. Gráfico de fuerza contra tiempo de SMD de rodamina B que muestra los distintos niveles de fuerza necesaria para superar un estado conformacional a medida que avanza por la coordenada de reacción. SMD de rodamina B en NPs de PLA (a) y PLGA (b). Se aplicó una fuerza a velocidad constante en el eje x a una de las 3 moléculas de rodamina B hasta extraerla del núcleo polimérico. La línea azul representa la salida de la molécula desde la NP. Se representan estructuralmente los momentos de mayor fuerza en ambos polímeros. La línea azul representa la salida de la molécula desde la NP.

En la parte superior de la figura 13 se puede observar en detalle las conformaciones de los puntos de mayor fuerza, los cuales evidencian que la droga establece interacciones principalmente con los oxígenos pertenecientes a la cadena polimérica, esto a través de los átomos cargados de cada

fármaco (Figura 7.c). En el caso de PLA, se presenta una interacción entre el grupo R-COO⁻ de la rodamina B con un oxígeno de una cadena de polímero PLA. Distinto es el caso, para el segundo *peak* fuerza analizado (ver Figura 13.a.2), en donde sólo se exhibe la presencia de las cadenas de PLA ante el paso del compuesto rodamina B, en específico, los grupos metilos al estar en cercanía del fluoróforo generan un aumento en la fuerza al ser extraído de la NP. Para el caso de PLGA (ver Figura 13.b) los puntos de mayor fuerza se dieron predominantemente por la complejidad en el empaquetamiento del polímero alrededor de rodamina B, ocasionando una mayor cantidad de contactos del polímero sobre el fluoróforo, ocasionando más dificultad al paso de la molécula hacia el exterior de la NP. Además, al igual que con PLA se generan interacciones entre los oxígenos de los monómeros del polímero con el grupo carboxilo de rodamina B, generando una mayor fuerza para extraer el compuesto en SMD.

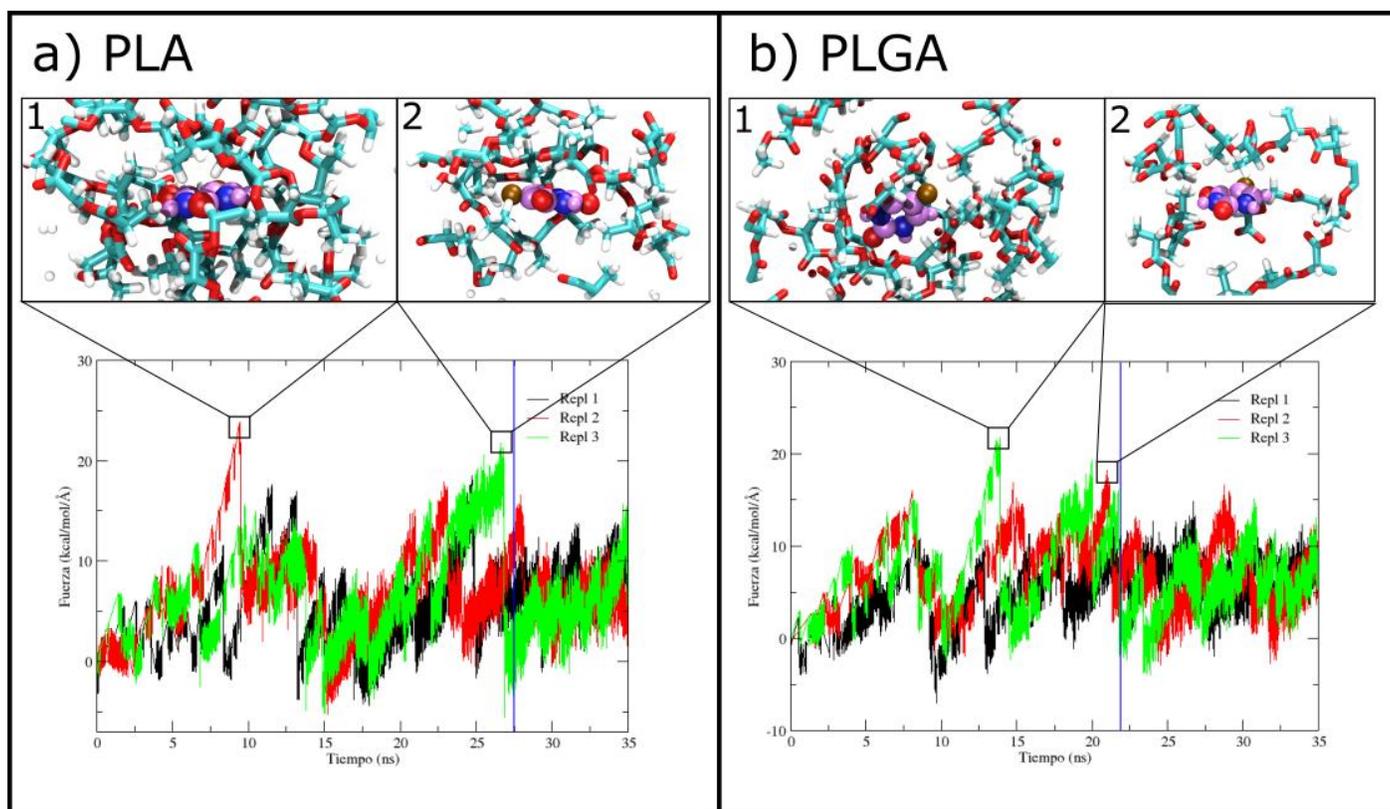


Figura 14. Gráfico de fuerza contra tiempo de SMD de 5-fluorouracilo que muestra los distintos niveles de fuerza necesaria para superar un estado conformacional a medida que avanza por la coordenada de

reacción. SMD de 5-fluorouracilo en NPs de PLA (a) y PLGA (b). Se representan estructuralmente los estados de mayor afinidad de ambos complejos. La línea azul representa la salida de la molécula desde la NP.

Por otra parte, en la figura 14 se muestra el comportamiento del fármaco 5-Fluorouracilo a lo largo de las trayectorias de SMD. Esta droga presenta similitudes entre los puntos de mayor fuerza al comparar ambos polímeros, siendo ambos en una escala de menor fuerza en comparación a lo observado para rodamina B e irinotecán. En cuanto a 5-fluorouracilo, al ser una molécula pequeña que no presenta cargas, mostró un desplazamiento facilitado para recorrer la coordenada de reacción descrita, lo que podría indicar una rápida liberación del fármaco desde la NP. Se destaca que en los puntos más altos en los gráficos tanto de la figura 14.a como 14.b, existe una orientación de los grupos metilos de las cadenas poliméricas hacia los compuestos, lo que podría generar un aumento de la fuerza por los distintos contactos que se producen entre la NP y 5-fluorouracilo.

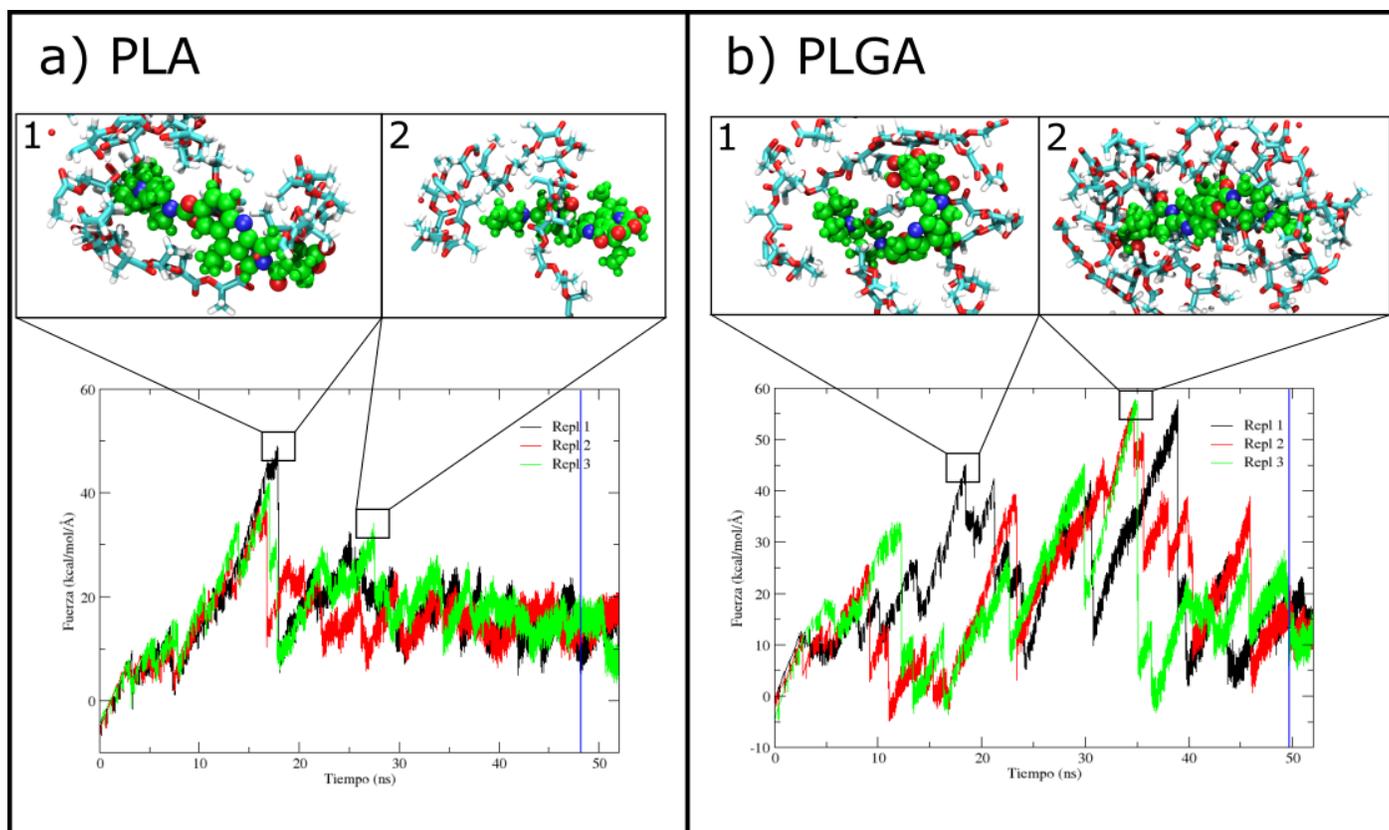


Figura 15. Gráfico de fuerza contra tiempo de SMD de irinotecán que muestra los distintos niveles de fuerza necesaria para superar un estado conformacional a medida que avanza por la coordenada de reacción. SMD de irinotecán en NPs de PLA (a) y PLGA (b). Se representan estructuralmente los estados de mayor afinidad de ambos complejos.

Los cálculos de SMD, demostraron que el compuesto irinotecán fue el que demostró una fuerza de interacción mayor en comparación a las otras drogas. Esto podría explicarse debido a la carga presente en su estructura y su gran tamaño, lo que provoca un mayor número de interacciones a lo largo de la ruta de salida. En la figura 15 se observa que en ambos polímeros se identifican máximos de fuerzas en el rango de 40 y 60 kcal/mol/Å, lo cual sugiere que el grupo terminal R-COO⁻ del polímero genera contactos estrechos el átomo de nitrógeno cargado positivamente presente en irinotecán. Particularmente en PLGA, es destacable que tal como ocurre con rodamina B y 5-fluorouracilo, este polímero tiende a cubrir una mayor superficie de las moléculas añadidas al núcleo hidrofóbico.

5.4. Explorar la degradación de nanopartículas y liberación de una molécula de interés ante un solvente en dinámica molecular clásica.

5.4.1 Creación de configuraciones de estructuras iniciales para los sistemas a simular.

Luego de comprender las distintas afinidades de cada droga por las distintas nanopartículas, se decidió explorar el efecto del solvente pero en una escala de tamaño comparable con las condiciones experimentales. Es por esto que se construyeron modelos de nanopartículas conteniendo un gran número de moléculas tanto de PLA/PLGA, de droga como también del polímero protector PEG. Para completar este objetivo, se utilizó Packmol para ensamblar un sistema que contenía 10 moléculas de rodaminas B, 100 PLA/PLGA y 200 PEG2000 respectivamente, generando una nanopartícula pseudoesférica de radio 80Å (Figura 16). Los polímeros utilizados fueron previamente compactados mediante una dinámica de 20 ns en vacío por cada cadena mediante NAMD2 bajo el campo de fuerza CHARMM36. Finalmente, se obtuvo una NP de aproximadamente 84.000 átomos PLA y de 81.000 átomos para PLGA, con un radio de giro de 45 Å y 46 Å respectivamente, y se ejecutó DM por un periodo de 50 ns en vacío.

5.4.3 Ejecución de dinámicas de nanopartículas en solvente.

Una vez que las NPs fueron compactadas y estabilizadas en vacío, estas se dispusieron en una caja de agua de 190 Å³, generada a través de *VMD*, produciendo un sistema de 670.000 átomos aproximadamente para PLA y 680.000 átomos para PLGA. Ambos sistemas fueron simulados por DM clásica durante 40 ns.

En la figura 16a y 16b se puede observar que durante las simulaciones de las NPs de rodamina B, PLA/PLGA y PEG2000, ocurre una disgregación de las moléculas que componen a las NPs debido al ingreso de moléculas de agua en las cavidades interiores, generando repulsión en las moléculas hidrofóbicas y por lo tanto permitiendo que los fármacos tiendan a salir de la NP.

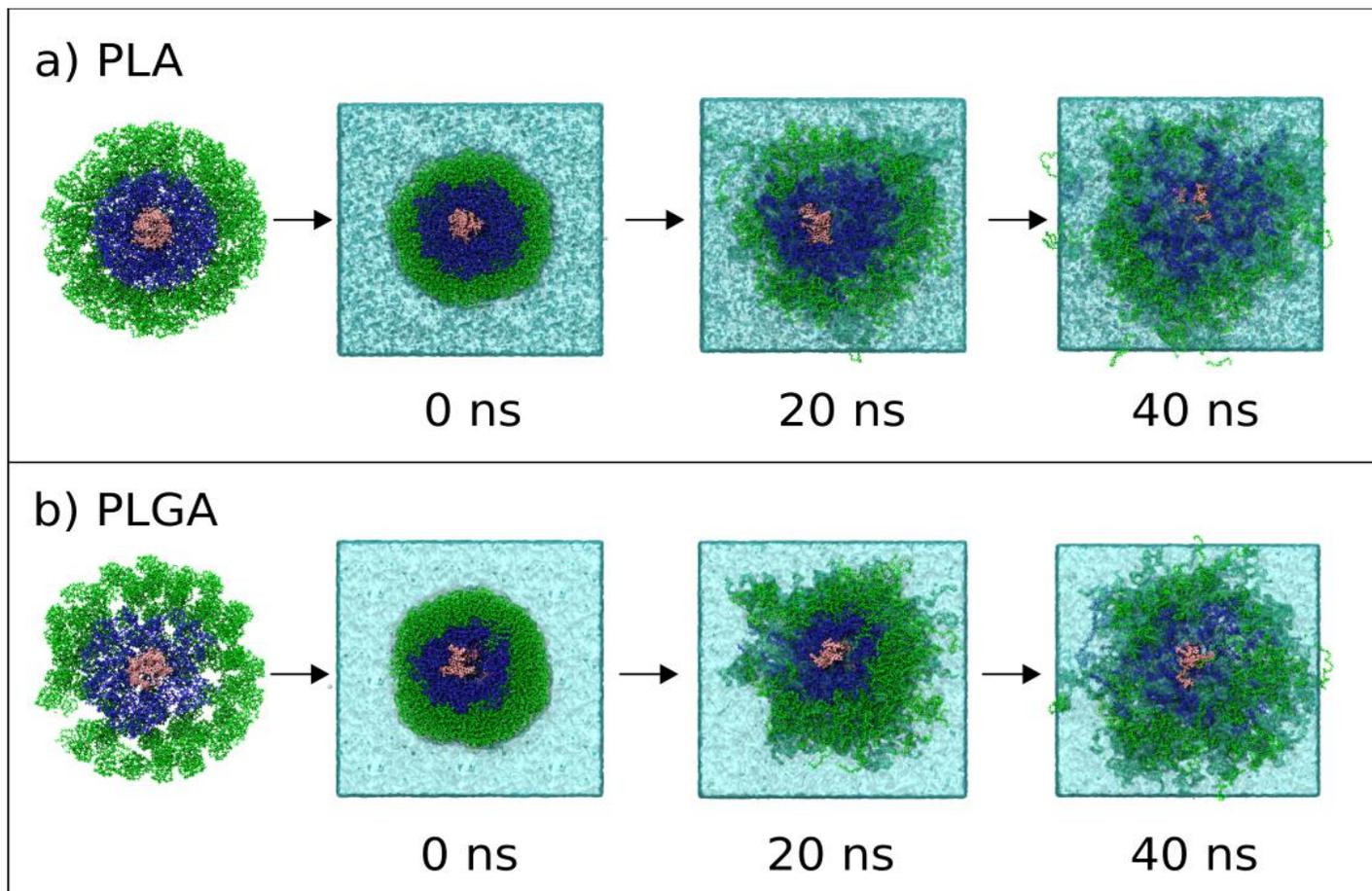


Figura 16. Formación de nanopartículas co-polimérica (PLA/PLGA-PEG) en conjunto con rodamina B y su respuesta en solvente a lo largo de una dinámica molecular clásica. Al extremo izquierdo se observa el sistema inicial previo a ser sometido a DM en vacío, subsecuentemente se observa la NP resultante embebida en una caja de agua y su posterior comportamiento a medida que avanza el tiempo.

5.4.4 Análisis de dinámicas de nanopartículas en solvente.

Con el objetivo de observar la dispersión de las moléculas en los sistemas de ambos polímeros estudiados (PLA y PLGA), se realizó un análisis utilizando la función de distribución radial para el estado inicial de la DM a los 0 ns, en el estado intermedio a los 20 ns y finalmente a los 40 ns de simulación. En la figura 16 se observa que a medida que la simulación molecular avanza, ambas nanopartículas sufren un cambio conformacional, que puede ejemplificarse como

una expansión de tamaño, lo cual permite que las moléculas de agua ingresen en el interior de la NP e interactúan con los polímeros PLA (Fig 16a) como PLGA (Fig. 16b). Bajo una inspección visual, el fluoróforo rodamina B tiende a desplazarse hacia el exterior de la NP potenciado por moléculas de agua que solvatan cada droga. De la misma forma, los polímeros de PLA y PLGA quedan expuestos a solvente y por su carácter hidrofóbico tienden a repelerse mediados por el incremento de moléculas de agua en su interior. Cabe destacar, que en el mismo periodo de tiempo (40ns) el polímero PLGA tiende a permanecer compactado en comparación con PLA, lo cual podría indicar una mayor capacidad de mantener la droga en su interior por períodos más largos.

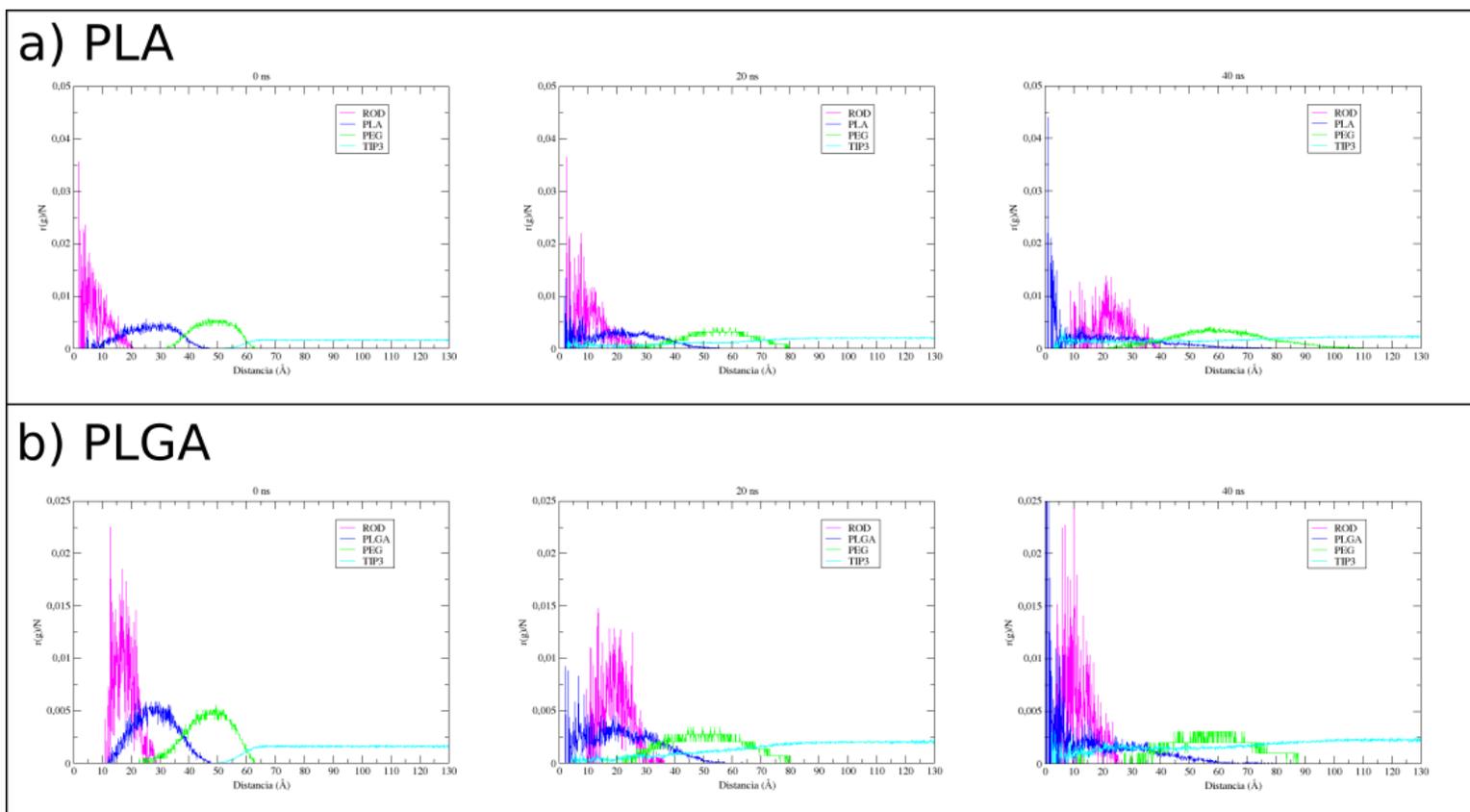


Figura 17. Gráficos de función de distribución radial o $g(r)$ normalizada. Se muestra la dispersión de moléculas desde el sistema inicial de la NP copolimérica (PLA/PLGA-PEG) con rodamina B (extrema izquierda) hasta completar 50 ns de DM.

En la figura 17 se muestra cuantitativamente la distribución de las moléculas de Rodamina, PLA, PEG y agua respecto al centro geométrico de la NP a distintos tiempos de simulación, evidenciando la liberación de la droga desde el núcleo polimérico (Curva celeste) y como es facilitada por la entrada de agua al núcleo de la NP. Simultáneamente, es posible observar que tanto las distribuciones de rodamina, PLA/PLGA y PEG se desplazan a distancias mayores del centro geométrico de la nanopartícula, lo cual está de acuerdo con el cambio conformacional observado en las trayectorias de DM. Estos cambios estructurales del nanotransportador, ocurren de forma gradual aumentando el radio de giro de los ~ 46 Å hasta los ~ 67 Å tanto para PLA como para PLGA. En el caso de la NP con PLGA se observa una mayor estabilidad ante el solvente, dado que a los 40 ns hay presencia de rodamina B hasta los 27 Å desde el origen, y que a diferencia de la NP con PLA existe una dispersión de las mismas molécula hasta los 40 Å. Adicionalmente, es destacable que a pesar de existe un comportamiento similar en la entrada de moléculas de agua a cada NP, la capa exterior de PEG2000 se mantiene más estable en la nanopartícula compuesta por PLGA, evidenciando que este polímero podría presentar mejores características que PLA al momento de contener una droga más “protegida” en ambientes acuosos. Estos resultados se correlacionan con ensayos de microscopía electrónica (datos no reportados) y se proponen como candidatos para diseñar nanotransportadores basados en los requerimientos de los distintos tratamientos demandados por los pacientes.

6. Conclusiones.

El uso de técnicas computacionales para simular nanopartículas poliméricas y así evaluar su capacidad de encapsular/liberar drogas anticancerígenas, ha demostrado ser una alternativa crucial previo a pruebas experimentales *in-vitro* e *in-vivo*, permitiendo elucidar interacciones que rigen la unión entre polímeros y distintos tipos de fármacos antitumorales. En concreto, las herramientas computacionales aplicadas en este proyecto de memoria, proveen información estructural de mucha importancia para el futuro diseño a nivel experimental de NPs. Estas metodologías teóricas logran explorar diversos ensambles de nanopartículas y su movimiento en el tiempo, considerando distintas cantidades de cada componente logrando así identificar una combinación particular de polímeros y fármacos que potencialmente sea más eficiente a nivel experimental. Cabe considerar, que dependiendo el sistema en estudio como también el tipo de cáncer a estudiar, las necesidades biomédicas son distintas, ya sea liberando la cantidad rápidamente o entregando el fármaco lentamente pero por un periodo de tiempo mayor.

En referencia puntual a los resultados obtenidos en esta memoria, se puede argumentar que el grado de compactación que tendrían las NPs está directamente relacionado con el tipo de polímero utilizado (PLA o PLGA), como también del tipo de fármaco que se disponga para su formación. Más en detalle, PLA principalmente por sus grupos metilo, muestra encapsular eficientemente fármacos pequeños como lo es 5-fluorouracilo, por otro lado, PLGA gracias a la proporción de ácido glicólico permite un mejor empaquetamiento con moléculas de mayor tamaño tales como irinotecán y rodamina B.

La metodología SMD posibilita explorar distintas conformaciones estructurales de los fármacos en los polímeros acelerando el proceso de liberación la droga, logrando así identificar las fuerzas asociadas a dichas configuraciones. Es así como las distintas conformaciones estructurales observadas, llevan a señalar que PLGA muestra fuerzas con una magnitud mayor que PLA, lo cual se podría traducir en un mejor comportamiento en cuanto a liberación prolongada de moléculas anfipáticas tales como rodamina B e irinotecán (figura 13 y figura 15), lo anterior respaldado por radios de giro inferiores a PLA, causado presumiblemente por la polaridad de los grupos de ácido glicólico lo que favorecen el encapsulamiento. Es así como las dinámicas molecular y SMD

podrían aplicarse a distintos problemas asociados a polímeros, ayudando en el estudio sobre la capacidad de transporte y liberación de distintos fármacos, de igual forma esta metodología puede ayudar a entender el comportamiento de NPs en su paso por sistemas biológicos más grandes, por ejemplo, en presencia de membrana celular.

En conjunto resultados obtenidos en esta memoria de título entregan conocimiento estructural del comportamiento tridimensional de nanotransportadores poliméricos de fármacos. En este sentido, el comportamiento de las NPs modeladas de PLA y PLGA en solvente acuoso propone que el uso de PLGA fomentaría una liberación más eficiente de los fármacos menos hidrofóbicos, ya que se observa una menor dispersión del fluoróforo desde el núcleo de la NP y a lo largo de la trayectoria de salida desde la NP. Es así como mediante el uso de DM clásica se puede plantear sistemas con gran escalabilidad estructural, apoyados por el análisis de dispersión, radio de giro y función de distribución radial. Una proyección a futuro de este trabajo de tesis es realizar modificaciones a la capa externa de las NPs, es decir, funcionalizando los polímeros de PEG mediante distintos grupos terminales y de forma más ambiciosa, uniendo pequeños péptidos que identifiquen blancos terapéuticos sobreexpresados en tejidos tumorales.

7. Referencias.

1. Adabi, M., Naghibzadeh, M., Adabi, M., Zarrinfard, M. A., Esnaashari, S. S., Seifalian, A. M., Faridi-Majidi, R., Aiyelabegan, H. T., & Ghanbari, H. (2017). Biocompatibility and nanostructured materials: Applications in nanomedicine. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *45*(4), 833-842. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1178134>
2. Aktulga, H. M., Fogarty, J. C., Pandit, S. A., & Grama, A. Y. (2012). Parallel reactive molecular dynamics: Numerical methods and algorithmic techniques. *Parallel Computing*, *38*(4), 245-259. <https://doi.org/10.1016/j.parco.2011.08.005>
3. Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2004). Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science*, *303*(5665), 1818-1822. <https://doi.org/10.1126/science.1095833>
4. Arany, I., & Safirstein, R. L. (2003). Cisplatin nephrotoxicity. *Seminars in Nephrology*, *23*(5), 460-464. [https://doi.org/10.1016/S0270-9295\(03\)00089-5](https://doi.org/10.1016/S0270-9295(03)00089-5)
5. Argilés, J. M., & Azcón-Bieto, J. (1988). The metabolic environment of cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *81*(1), 3-17. <https://doi.org/10.1007/BF00225648>
6. Aryal, S., Hu, C.-M. J., & Zhang, L. (2010). Polymer–Cisplatin Conjugate Nanoparticles for Acid-Responsive Drug Delivery. *ACS Nano*, *4*(1), 251-258. <https://doi.org/10.1021/nn9014032>
7. Axel Kohlmeyer, Josh Vermaas, & Efreem Braun. (2020). *akohlmey/topotools: Release 1.8*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3845031>
8. Baker, J. R., B. Ward, J., Brent, & P. Thomas, T. (2009). Chapter 8—Nanotechnology in Clinical and Translational Research. En D. Robertson & G. H. Williams (Eds.), *Clinical and Translational Science* (pp. 123-135). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373639-0.00008-X>
9. Bee, S.-L., Hamid, Z. A. A., Mariatti, M., Yahaya, B. H., Lim, K., Bee, S.-T., & Sin, L. T. (2018). Approaches to Improve Therapeutic Efficacy of Biodegradable PLA/PLGA Microspheres: A Review. *Polymer Reviews*, *58*(3), 495-536. <https://doi.org/10.1080/15583724.2018.1437547>
10. Bergwerf, H. (2015). *MolView: An attempt to get the cloud into chemistry classrooms*. 9.
11. Best, R. B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P. E. M., Mittal, J., Feig, M., & MacKerell, A. D. (2012). Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling

of the Backbone ϕ , ψ and Side-Chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(9), 3257-3273. <https://doi.org/10.1021/ct300400x>

12. Betancourt, T., Byrne, J. D., Sunaryo, N., Crowder, S. W., Kadapakkam, M., Patel, S., Casciato, S., & Brannon-Peppas, L. (2009). PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91A(1), 263-276. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32247>

13. Bosset, J.-F., Collette, L., Calais, G., Mineur, L., Maingon, P., Radosevic-Jelic, L., Daban, A., Bardet, E., Beny, A., & Ollier, J.-C. (2006). Chemotherapy with Preoperative Radiotherapy in Rectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 355(11), 1114-1123. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa060829>

14. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

15. Bunting, J. R., Phan, T. V., Kamali, E., & Dowben, R. M. (1989). Fluorescent cationic probes of mitochondria. Metrics and mechanism of interaction. *Biophysical Journal*, 56(5), 979-993. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(89\)82743-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82743-2)

16. Csizmadia, P. (1999). MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web. *Proceedings of The 3rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, 1775. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-3-01775>

17. Dasgupta, N., Yilmaz, D. E., & van Duin, A. (2020). Simulations of the Biodegradation of Citrate-Based Polymers for Artificial Scaffolds Using Accelerated Reactive Molecular Dynamics. *The Journal of Physical Chemistry B*, 124(25), 5311-5322. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c03008>

18. Donoso, A., Villarroel, L., & Pinedo, G. (2006). [Increase in colon cancer mortality rates in Chile, during the period 1990-2003]. *Revista Medica de Chile*, 134(2), 152-158. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872006000200003>

19. Douglas-Gallardo, O. A., Soldano, G. J., Mariscal, M. M., & Sánchez, C. G. (2017). Effects of oxidation on the plasmonic properties of aluminum nanoclusters. *Nanoscale*, *9*(44), 17471-17480. <https://doi.org/10.1039/C7NR04904H>
20. Dünweg, B., & Paul, W. (1991). Brownian dynamics simulations without gaussian random numbers. *International Journal of Modern Physics C*, *02*(03), 817-827. <https://doi.org/10.1142/S0129183191001037>
21. Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2011). Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biology*, *9*(1), 71. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-71>
22. Elsayy, M. A., Kim, K.-H., Park, J.-W., & Deep, A. (2017). Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *79*, 1346-1352. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.143>
23. Essa, S., Rabanel, J. M., & Hildgen, P. (2011). Characterization of rhodamine loaded PEG-g-PLA nanoparticles (NPs): Effect of poly(ethylene glycol) grafting density. *International Journal of Pharmaceutics*, *411*(1), 178-187. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.039>
24. Foulds, L. (1958). The natural history of cancer. *Journal of Chronic Diseases*, *8*(1), 2-37. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(58\)90039-0](https://doi.org/10.1016/0021-9681(58)90039-0)
25. Friedberg, E. C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, *421*(6921), 436-440. <https://doi.org/10.1038/nature01408>
26. Grippo, L., & Lucidi, S. (1997). A globally convergent version of the Polak-Ribière conjugate gradient method. *Mathematical Programming*, *78*(3), 375-391. <https://doi.org/10.1007/BF02614362>
27. Grønbech-Jensen, N. (2020). Complete set of stochastic Verlet-type thermostats for correct Langevin simulations. *Molecular Physics*, *118*(8), e1662506. <https://doi.org/10.1080/00268976.2019.1662506>
28. Gryparis, E. C., Hatziapostolou, M., Papadimitriou, E., & Avgoustakis, K. (2007). Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *67*(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.12.017>

29. Hansson, T., Oostenbrink, C., & van Gunsteren, W. (2002). Molecular dynamics simulations. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(2), 190-196. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00308-1](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00308-1)
30. Holsti, L. R. (1995). Development Of Clinical Radiotherapy Since 1896. *Acta Oncologica*, 34(8), 995-1003. <https://doi.org/10.3109/02841869509127225>
31. Hopkins, C. W., Le Grand, S., Walker, R. C., & Roitberg, A. E. (2015). Long-Time-Step Molecular Dynamics through Hydrogen Mass Repartitioning. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(4), 1864-1874. <https://doi.org/10.1021/ct5010406>
32. Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33-38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
33. Izumi, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Uramoto, H., Yoshida, Y., Tanabe, M., Ise, T., Murakami, T., Yoshida, T., Nomoto, M., & Kohno, K. (2003). Cellular pH regulators: Potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, 29(6), 541-549. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(03\)00106-3](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(03)00106-3)
34. Jin, K.-T., Yao, J.-Y., Ying, X.-J., & Chen*, Y. L. and Y.-F. (1969, diciembre 31). *Nanomedicine and early cancer diagnosis: Molecular imaging using fluorescence nanoparticles*. Current Topics in Medicinal Chemistry. <https://www.eurekaselect.com/186173/article>
35. Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F., & Farokhzad, O. C. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: Design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2971-3010. <https://doi.org/10.1039/C2CS15344K>
36. Kawasaki, E. S., & Player, A. (2005). Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1(2), 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.03.002>
37. Kim, B. Y. S., Rutka, J. T., & Chan, W. C. W. (2010). Nanomedicine. *New England Journal of Medicine*, 363(25), 2434-2443. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0912273>
38. Levine, B. G., Stone, J. E., & Kohlmeyer, A. (2011). Fast analysis of molecular dynamics trajectories with graphics processing units—Radial distribution function histogramming. *Journal of Computational Physics*, 230(9), 3556-3569. <https://doi.org/10.1016/j.jcp.2011.01.048>

39. Locatelli, E., & Comes Franchini, M. (2012). Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: Synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system. *Journal of Nanoparticle Research*, *14*(12), 1316. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1316-4>
40. Lombardo, D., Kiselev, M. A., & Caccamo, M. T. (2019, febrero 27). *Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine* [Review Article]. *Journal of Nanomaterials*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2019/3702518>
41. Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, *3*(5), 330-338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
42. Maleki, R., Rezvantalab, S., & Shahbazi, M.-A. (2021). Role of molecular simulation in the future of nanomedicine. *Nanomedicine*, *16*(24), 2133-2136. <https://doi.org/10.2217/nnm-2021-0120>
43. Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular Basis of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, *361*(25), 2449-2460. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804588>
44. Martínez, L., Andrade, R., Birgin, E. G., & Martínez, J. M. (2009). PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(13), 2157-2164. <https://doi.org/10.1002/jcc.21224>
45. Matsumoto, A., Matsukawa, Y., Suzuki, T., Yoshino, H., & Kobayashi, M. (1997). The polymer-alloys method as a new preparation method of biodegradable microspheres: Principle and application to cisplatin-loaded microspheres. *Journal of Controlled Release*, *48*(1), 19-27. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00031-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00031-X)
46. Matus, M. F., Ludueña, M., Vilos, C., Palomo, I., & Mariscal, M. M. (2018). Atomic-level characterization and cilostazol affinity of poly(lactic acid) nanoparticles conjugated with differentially charged hydrophilic molecules. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *9*(1), 1328-1338. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.126>
47. Miller, A. B., Hoogstraten, B., Staquet, M., & Winkler, A. (1981). Reporting results of cancer treatment. *Cancer*, *47*(1), 207-214. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19810101\)47:1<207::AID-CNCR2820470134>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19810101)47:1<207::AID-CNCR2820470134>3.0.CO;2-6)

48. Mlyniec, A., Ekiert, M., Morawska-Chochol, A., & Uhl, T. (2016). Influence of density and environmental factors on decomposition kinetics of amorphous polylactide – Reactive molecular dynamics studies. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, *67*, 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.jmkgm.2016.04.010>
49. Moreno, D., de Ilarduya, C. T., Bandrés, E., Buñuales, M., Azcona, M., García-Foncillas, J., & Garrido, M. J. (2008). Characterization of cisplatin cytotoxicity delivered from PLGA-systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *68*(3), 503-512. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.006>
50. Narvekar, M., Xue, H. Y., Eoh, J. Y., & Wong, H. L. (2014). Nanocarrier for Poorly Water-Soluble Anticancer Drugs—Barriers of Translation and Solutions. *AAPS PharmSciTech*, *15*(4), 822-833. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0107-x>
51. Nygren, P. (2001). What is cancer chemotherapy? *Acta Oncologica*, *40*(2-3), 166-174. <https://doi.org/10.1080/02841860151116204>
52. O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, *3*(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
53. Park, S., Khalili-Araghi, F., Tajkhorshid, E., & Schulten, K. (2003). Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using Jarzynski's equality. *The Journal of Chemical Physics*, *119*(6), 3559-3566. <https://doi.org/10.1063/1.1590311>
54. Pastorino, C., Kreer, T., Müller, M., & Binder, K. (2007). Comparison of dissipative particle dynamics and Langevin thermostats for out-of-equilibrium simulations of polymeric systems. *Physical Review E*, *76*(2), 026706. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.76.026706>
55. Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D. C., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., Buch, R., Fiorin, G., Hénin, J., Jiang, W., McGreevy, R., Melo, M. C. R., Radak, B. K., Skeel, R. D., Singharoy, A., Wang, Y., Roux, B., Aksimentiev, A., Luthey-Schulten, Z., ... Tajkhorshid, E. (2020). Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *The Journal of Chemical Physics*, *153*(4), 044130. <https://doi.org/10.1063/5.0014475>
56. Pines, J. (1995). Cyclins, CDKs and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, *6*(2), 63-72. <https://doi.org/10.1006/scbi.1995.0009>

57. Polat, B. E., Lin, S., Mendenhall, J. D., VanVeller, B., Langer, R., & Blankschtein, D. (2011). An Experimental and Molecular Dynamics Investigation into the Amphiphilic Nature of Sulforhodamine B. *The journal of physical chemistry. B*, *115*(6), 1394-1402. <https://doi.org/10.1021/jp109866q>
58. Qu, W., Yang, Q., Wang, G., Wang, Z., Huang, P., Huang, W., Zhang, R., & Yan, D. (2020). Amphiphilic irinotecan–melampomagnolide B conjugate nanoparticles for cancer chemotherapy. *RSC Advances*, *10*(15), 8958-8966. <https://doi.org/10.1039/D0RA00912A>
59. Senftle, T. P., Hong, S., Islam, M. M., Kylasa, S. B., Zheng, Y., Shin, Y. K., Junkermeier, C., Engel-Herbert, R., Janik, M. J., Aktulga, H. M., Verstraelen, T., Grama, A., & van Duin, A. C. T. (2016). The ReaxFF reactive force-field: Development, applications and future directions. *Npj Computational Materials*, *2*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/npjcompumats.2015.11>
60. Sherr, C. J. (1996). Cancer Cell Cycles. *Science*, *274*(5293), 1672-1677. <https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1672>
61. Steinbeck, C., Han, Y., Kuhn, S., Horlacher, O., Luttmann, E., & Willighagen, E. (2003). The Chemistry Development Kit (CDK): An Open-Source Java Library for Chemo- and Bioinformatics. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, *43*(2), 493-500. <https://doi.org/10.1021/ci025584y>
62. Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, *01*(02), i-iv. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2>
63. Sullivan, R., Alatise, O. I., Anderson, B. O., Audisio, R., Autier, P., Aggarwal, A., Balch, C., Brennan, M. F., Dare, A., D’Cruz, A., Eggermont, A. M. M., Fleming, K., Gueye, S. M., Hagander, L., Herrera, C. A., Holmer, H., Ilbawi, A. M., Jarnheimer, A., Ji, J., ... Purushotham, A. (2015). Global cancer surgery: Delivering safe, affordable, and timely cancer surgery. *The Lancet Oncology*, *16*(11), 1193-1224. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00223-5)
64. Swietach, P., Vaughan-Jones, R. D., Harris, A. L., & Hulikova, A. (2014). The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1638), 20130099. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0099>
65. Thompson, A. P., Aktulga, H. M., Berger, R., Bolintineanu, D. S., Brown, W. M., Crozier, P. S., in ’t Veld, P. J., Kohlmeyer, A., Moore, S. G., Nguyen, T. D., Shan, R., Stevens, M. J., Tranchida,

- J., Trott, C., & Plimpton, S. J. (2022). LAMMPS - a flexible simulation tool for particle-based materials modeling at the atomic, meso, and continuum scales. *Computer Physics Communications*, 271, 108171. <https://doi.org/10.1016/j.cpc.2021.108171>
66. Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., & Mackerell, A. D. (2010). 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*, 31(4), 671-690. <https://doi.org/10.1002/jcc.21367>
67. Vanommeslaeghe, K., Raman, E. P., & MacKerell, A. D. (2012). Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(12), 3155-3168. <https://doi.org/10.1021/ci3003649>
68. Wiseman, L. R., & Markham, A. (1996). Irinotecan. *Drugs*, 52(4), 606-623. <https://doi.org/10.2165/00003495-199652040-00013>
69. Yang, Y.-Y., Wang, Y., Powell, R., & Chan, P. (2006). Polymeric Core-Shell Nanoparticles for Therapeutics. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(5-6), 557-562. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04408.x>
70. You, X., Kang, Y., Hollett, G., Chen, X., Zhao, W., Gu, Z., & Wu, J. (2016). Polymeric nanoparticles for colon cancer therapy: Overview and perspectives. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(48), 7779-7792. <https://doi.org/10.1039/C6TB01925K>
71. Yova, D., Atlamazoglou, V., Kavantzias, N., & Loukas, S. (2000). Development of a Fluorescence-Based Imaging System for Colon Cancer Diagnosis Using Two Novel Rhodamine Derivatives. *Lasers in Medical Science*, 15(2), 140-147. <https://doi.org/10.1007/s101030050059>
72. Zarate, A. J., Alonso, F. T., Garmendia, M. L., & López-Köstner, F. (2013). Increasing crude and adjusted mortality rates for colorectal cancer in a developing South American country. *Colorectal Disease*, 15(1), 47-51. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2012.03110.x>