



Facultad de Ingeniería

Escuela de Ingeniería Civil en Bioinformática

Caracterización estructural de matrices peptídicas con aplicaciones en regeneración de tejido biológico

Memoria para optar al título de Ingeniero Civil en Bioinformática

Alumno: Patricio Ignacio Briones Rebolledo

Prof. Guía: Dr. Horacio Poblete

Cotutor: Dr. Matías Zúñiga

Prof. Informante: Dra. Janin Riedelsberger

Talca-Chile

2022

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

Agradecimientos

Llegar a este punto y conseguir cada uno de mis logros no fue fácil, sin embargo, muchas personas estuvieron (y siguen) presentes en todo el proceso.

Quiero agradecer en primer lugar a mi tutor, Horacio Poblete, quien puso su confianza en mi desde aquel verano en el que solicité realizar mi práctica junto a él. La enseñanza y sobre todo el trato humano que ha tenido es algo que valoro mucho. También agradecer a todo el grupo de investigación, a Matías Zúñiga que aceptó ser el cotutor en esta última y difícil tarea que fue la tesis y al resto del equipo que siempre estuvo dando retroalimentación, aconsejando y ayudando cuando algún trabajo se complicaba.

Gracias también a la escuela y a todos quienes forman parte de ella, desde la secretaria hasta los docentes, siempre estaré agradecido de su aporte en mi crecimiento.

Agradezco a mi familia, el pilar fundamental en todo este camino, que, sobre todo estos últimos años y quizá sin darse cuenta, fueron un apoyo día a día para seguir dando lo mejor de mí. Gracias a mi mamá y papá, mis hermanas, sobrinos y cuñados, cada momento fue un impulso para ir logrando lo que se me pusiera en frente y no hay como devolverles todo lo que me entregaron. Al resto de mi familia, porque en cada junta familiar hubo risas y buenos momentos que amortiguaban la avalancha de tareas con la que cargaba en el tiempo.

Le doy las gracias a mis amigos y amigas que encontré por este paso en la Universidad, algunos de ellos desde un inicio, como Tiaren y Eduardo, y otros que aparecieron en el camino. Sin duda en este tiempo creo haber encontrado a las personas correctas a mi alrededor.

Gracias a los de la casa, los yetas, a mis cabros “los Vilches”, gracias a todos por cada momento, palabra de aliento, risas, enojos, y un sinfín de cosas que hemos compartido y estoy seguro de que seguiremos haciendo. Le agradezco a mis amigos de Linares, con quienes comencé toda la etapa unos cuantos años atrás, gracias por siempre estar.

Es un orgullo llegar hasta este punto y le reitero mis agradecimientos a cada persona aludida en estas palabras, espero que puedan conseguir todo lo que se propongan en su vida, y ser parte de aquello, y celebrarlo como debe ser.

***“Un lugar donde alguien todavía piensa en ti
es un lugar al que puedes llamar hogar.”***

Índice

Agradecimientos	2
Índice	4
Índice de figuras	6
Resumen	8
Abstract	9
Introducción	10
1. Biomateriales	10
1.1 Hidrogeles	12
1.2 Características de los hidrogeles	13
1.3 Propiedades de los hidrogeles	13
2. Corona proteica y matriz extracelular	14
2.1 Corona proteica	14
2.2 Matrices extracelulares	15
2.3 Componentes de la ECM	17
2.4 Integrinas	20
3. Polietilenglicol (PEG)	22
Hipótesis	26
Objetivo General	26
Objetivos Específicos	26
Materiales y Métodos	27
4. Modelado y generación de estructuras	28
4.1 Modelado tridimensional de estructuras tipo colágeno	28
4.2 Modelamiento de cadenas de PEG	29
4.3 Generación de modelos conjugados de Péptido-PEG	30
5. Dinámica Molecular	31
5.0.1 Sistemas de estudio	33
5.1 Dinámica molecular sin presencia de solvente	34
5.2 Dinámica molecular con solvente explícito	35
5.3 Dinámica molecular con sistemas replicados tridimensionalmente y a diferentes valores de presión	36
6. Análisis de conformaciones de PEG-CLP mediante script en TCL	36
7. Resultados	37
7.1 Modelado de núcleo y estructura de PEG ramificado	37
7.2 Modelado de péptido tipo colágeno	38

7.3	Generación de modelos conjugados péptido-polímero	40
8.	Dinámica molecular con solvente explícito	43
8.1	Ejecución de dinámica molecular a gran escala de tiempo.	43
8.2	Análisis conformacional de las estructuras obtenidas.	46
9.	Dinámica molecular con sistemas replicados tridimensionalmente y a diferentes valores de presión.	46
9.1	Generación de sistemas replicados en los 3 ejes.	46
9.2	Ejecución de dinámica molecular a 0.2, 1, 5 y 10 atmósfera.	48
9.3	Análisis conformacional de PEG-Péptido en valores de energía a diferente presión inicial.....	48
9.4	Desviación cuadrática media (RMSD) y análisis conformacional.	50
9.5	Radio de giro	52
9.6	Análisis de función de distribución radial para sistemas con presencia de péptidos	53
9.7	Propuesta de protocolo para el estudio de sistemas poliméricos funcionalizados con péptidos.	55
10.	Conclusiones.....	56
	Referencias	58

Índice de figuras

Figura 1. Esquema general del diseño racional de péptidos y funcionalización de PEG-CLP.....	11
Figura 2. Esquema de la funcionalización superficial de nanopartículas.....	12
Figura 3. Esquema de la formación de una corona en un ambiente fisiológico. .	15
Figura 4. Esquema de la matriz extracelular y su diversidad de funciones	16
Figura 5. Representación del cristal 3DMW correspondiente al colágeno tipo 3 humano y su triple hélice.	17
Figura 6. Esquema que representa la creación de fibras de colágeno a partir de la secuencia de aminoácidos.	19
Figura 7. Familia de integrinas.....	20
Figura 8. Estructura química del polietilenglicol (PEG)	22
Figura 9. Estructura química de productos comercializados de PEG	24
Figura 10. Resumen de metodología a seguir en este trabajo.	27
Figura 11. Estructura tridimensional de CLP1.....	29
Figura 12. Representación 3D de una molécula de etilenglicol.....	30
Figura 13. Representación del sistema Péptido:8-arm PEG-Mal a ejecutar en las simulaciones de dinámica molecular	31
Figura 14. Diagrama de flujo que indica el rol de cada archivo y su utilización en VMD, NAMD y psfgen	32
Figura 15. Ecuación de la función de energía potencial para un campo de fuerza.	33
Figura 16. Representación de un sistema con solvente explícito (a) y sistema sin presencia de solvente (b).....	34
Figura 17. Representación de moléculas generadas.....	38
Figura 18. Representación 3D y secuencia del péptido a utilizar.....	39
Figura 19. Proceso de “patch” de moléculas	41
Figura 20. Estructura ensamblada de 8PEG-Mal.	41
Figura 21. Sistema ensamblado en la razón 4:1 (Péptido:8PEG-Mal)	42
Figura 22. Cambio conformacional durante la trayectoria sin presencia de solvente en sistema con proporciones 4:1	43
Figura 23. Sistema en la razón 8:2 (Péptido:8PEG-Mal), solvatado y neutralizado con iones de NaCl.....	44
Figura 24. Análisis conformacional de sistema 4:1.....	45
Figura 25. Representación 3D del sistema 4:1 replicado en dos ejes.....	47
Figura 26. Gráfico de presión vs energía para los sistemas replicados	49
Figura 27. Gráficos de RMSD para el sistema sin péptido, 2:1 y 4:1 replicados ..	50
Figura 29. Radio de giro para el sistema sin péptidos, 2:1 y 4:1 replicados	52

Figura 30. Análisis de RDF para sistemas 2:1 y 4:1 replicados a 0.2 atm (a) y 10 atm (b)	54
Figura 31. Propuesta de protocolo para el estudio de sistemas poliméricos funcionalizados con péptido.....	55

Resumen

Los biomateriales son compuestos sintéticos diseñados para interactuar con sistemas biológicos y que, junto a la ingeniería de tejidos, han generado una gran revolución en el campo biomédico. Enfocados en la medicina regenerativa, se ha demostrado que algunos péptidos similares al colágeno (CLP) al estar funcionalizando y protegiendo nanopartículas metálicas, han logrado regenerar tejido biológico de piel, cornea e incluso tejidos tan complejos como el de corazón. Más en detalle, se ha propuesto que los CLP permitirían la comunicación del nanomaterial a la matriz extracelular (EMC), la cual está formada de redes macro-biomoleculares tridimensionales y proteínas de comunicación extracelular tales como las Integrinas. Por otro lado, los CLPs han sido destacados por su unión selectiva a integrinas por medio de motivos conocidos (GFOGER, RGD). Sumado a esta gran red de elementos que conforman la matriz extracelular, el polietilenglicol (PEG) es un poliéter muy utilizado en la funcionalización de nanomateriales y posee características químicas que lo hacen candidato directo para la creación de hidrogeles basados en nanopartículas poliméricas. Por ende, el uso de PEG podría otorgar cualidades de señalización celular específica a nanopartículas, como lo son las terapias contra el cáncer. Sin embargo, poco se conoce respecto a la organización estructural de esta matriz sintética extracelular, como tampoco el efecto estabilizador que a nivel macroscópico otorga la utilización de PEG en conjunto con CLP. En este ámbito, se ha postulado que el uso de matrices sintéticas y bio-funcionales sería clave para la estabilización de la ECM. Adicionalmente, el conocer detalles estructurales del autoensamblado de estas matrices extracelulares permitiría comprender los mecanismos de ordenamiento, así como también las interacciones moleculares involucradas en la estabilización, que le confieren propiedades macromoleculares de interés para el diseño y optimización de este tipo de materiales. En base a lo expuesto, **en este proyecto se propone realizar un estudio del orden tridimensional adquirido luego del proceso de autoensamblado de una matriz peptídica**, y con ello orientar al futuro desarrollo de biomateriales sintéticos con aplicaciones en regeneración de tejido biológico. Para ello, se utilizará un set de herramientas computacionales tales como simulación molecular con y sin presencia de solvente, así como también análisis masivos mediante VMD para poder estudiarlos en tiempos a nanoescala.

Abstract

Biomaterials are synthetic compounds designed to interact with biological systems, which, together with tissue engineering, have generated a great revolution in the biomedical field. Focusing on regenerative medicine, several studies have shown that collagen-like peptides (CLP), by functionalizing and protecting metallic nanoparticles, have managed to regenerate biological tissue of the skin, cornea, and even tissues as complex as the heart. In detail, it has been proposed that CLPs would allow the communication of the nanomaterial to the extracellular matrix (ECM), which is made up of three-dimensional macro-biomolecular networks and extracellular communication proteins such as integrins. On the other hand, CLPs have been highlighted for their selective binding to integrins through known motifs like GFOGER and RGD. In addition to this large network of elements that make up the extracellular matrix, polyethylene glycol (PEG) is a polyether widely used in the functionalization of nanomaterials. Furthermore, its chemical characteristics make it a direct candidate for creating hydrogels based on polymeric nanoparticles. Therefore, PEG could provide specific cell signaling qualities to nanoparticles, such as cancer therapies. However, there is poor knowledge about the structural organization of this synthetic extracellular matrix nor the stabilizing effect that the use of PEG in conjunction with CLP provides at a macroscopic level. In this field, it has been postulated synthetic and bio-functional matrices would be the key to stabilizing the ECM. Additionally, knowing the structural details of the self-assembly of this extracellular matrix would allow us to understand the ordering mechanisms, and the molecular interactions involved in stabilization, which confer macromolecular properties of interest for the design and optimization of this type of materials. Based on the above, this project proposes to study the three-dimensional order acquired after the self-assembly process of peptide matrix and thereby guide the future development of synthetic biomaterials with applications in biological tissue regeneration. For this, a set of computational tools will be used, such as molecular simulation, with and without the presence of a solvent, along with massive analysis through VMD to study them in nanoscale times.

Introducción

1. Biomateriales

A principios del siglo XX han ocurrido grandes avances en cuanto a la ciencia de los materiales, la biología celular y molecular, los que en conjunto han dado paso al desarrollo de novedosos biomateriales. Estos compuestos, particularmente en forma de dispositivos médicos, han mejorado la calidad de vida de muchos pacientes con implantes dentales, articulaciones artificiales y lentes oculares (Othman *et al.*, 2018), como los ejemplos más populares. Los biomateriales llevan dicho nombre ya que corresponden a un material utilizado para evaluar, curar, corregir o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. En este sentido, los biomateriales aplicados a medicina deben cumplir con distintas características tales como: biocompatibilidad, estabilidad química, no toxicidad, resistencia mecánica, entre otros. Estos materiales sintéticos se pueden separar en metálicos, cerámicos, poliméricos y materiales compuestos.

El rol y uso de los biomateriales se incrementó con el surgimiento de la ingeniería de tejidos entre los años 1980 y 1990, donde la función de dichos materiales para aplicaciones biomédicas, comenzó a cambiar del reemplazo de partes del cuerpo dañadas y enfermas, a la estimulación de respuestas biológicas deseadas en el cuerpo, con el objetivo de iniciar procesos regenerativos inherentes, mecanismos e **incluso recuperar la función natural de tejidos** (Holzapfel *et al.*, 2013). Así, los biomateriales se han utilizado como portadores, temporales, de moléculas biológicas. Uno de los ejemplos conocidos es el uso clínico de INFUSE Bone Graft, una construcción basada en un transportador esponjoso de colágeno degradable y proteína morfogenética ósea humana recombinante tipo 2, la cual fue desarrollada para tratar defectos óseos grandes y de tamaño crítico, lo que provoca que no tengan una curación espontánea, a diferencia de los defectos óseos no críticos. (Othman *et al.*, 2018).

En los últimos años, se ha observado la evolución en el área farmacéutica en cuanto a la disponibilidad de múltiples medicamentos. Estos avances incluyen la aplicación de técnicas de biología molecular y un amplio desarrollo en la farmacología molecular y genómica. Actualmente es posible utilizar nanotecnología de ADN y otros biopolímeros directamente en tecnologías de matriz para aplicaciones en detección y diagnóstico. Ligado a lo anterior, diferentes formas de tratar las enfermedades han sido posible gracias a los fármacos basados en proteínas y péptidos de distinto peso molecular, la conjugación de estructuras basadas en aminoácidos, las que ayudan a mejorar la farmacocinética de agentes terapéuticos, buscando la optimización de su administración en tejidos o articulaciones (Bumbaca *et al.*, 2019), lo cual se asocia al objetivo de este trabajo, que se representa en la Figura 1.

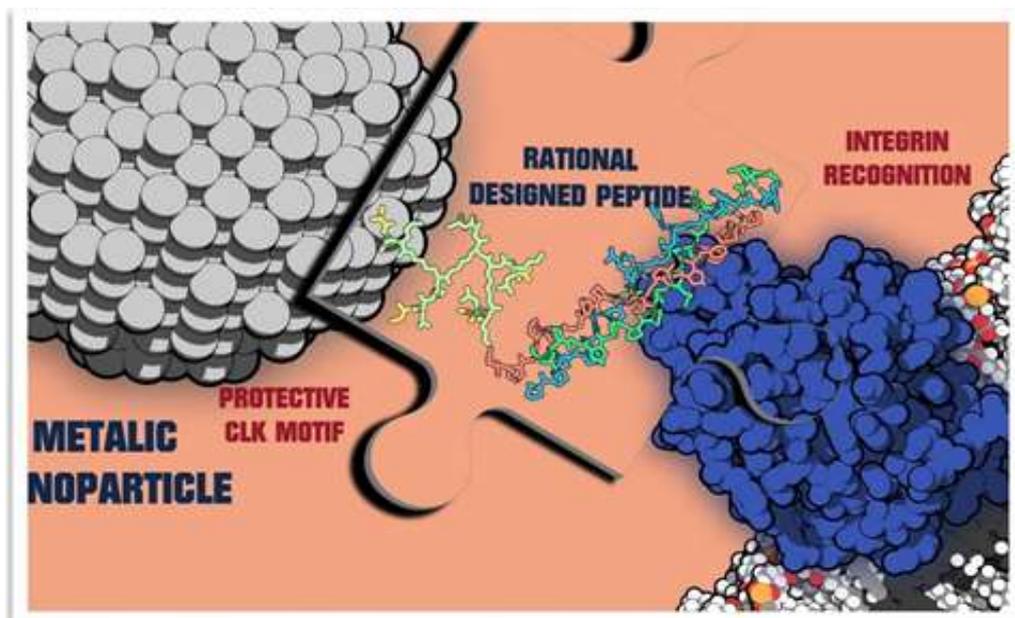


Figura 1. Esquema general del diseño racional de péptidos y funcionalización de PEG-CLP para aplicaciones en la regeneración de tejidos.

Por otro lado, el campo de la nanotecnología ha facilitado un sin número de procesos en este siglo, y continua en un crecimiento exponencial al utilizar estructuras, dispositivos de tamaño nanométrico (escala de 1 a 100 nm) (Bayda *et al.*, 2019). Un ejemplo de esto son el uso de vesículas y nanopartículas en base a lípidos, para aplicaciones dermatológicas, los cuales otorgan una interacción eficaz, penetrando en la región de la córnea a través del intercambio de lípidos, distribuyéndose en la epidermis y en la dermis (Shabbir *et al.*, 2020).

Adicionalmente, las nanopartículas de hidrogeles se utilizan ampliamente como vehículos para agentes terapéuticos y liberación de drogas, esto último gracias a su alta biodegradabilidad que permiten la liberación sostenida del fármaco, durante periodos de días o inclusive semanas. Sumado a lo anterior, su producción es fácil, asequible y pueden incorporar de manera efectiva una variedad de medicamentos, incluidos los de carácter farmacéutico (Gonçalves *et al.*, 2010) .

1.1 Hidrogeles

Dentro de los materiales más innovadores producto de la nanotecnología, se encuentran los hidrogeles sintéticos, los cuales poseen un amplio uso debido a su capacidad de administrar los compuestos de forma eficaz y conveniente. Lo anterior, gracias a la solubilidad que algunos de estos biomateriales poseen tanto en disolventes orgánicos como en agua, como también por el recubrimiento que otorga a una variedad de biomoléculas que rodean a nanopartículas (Figura 2).

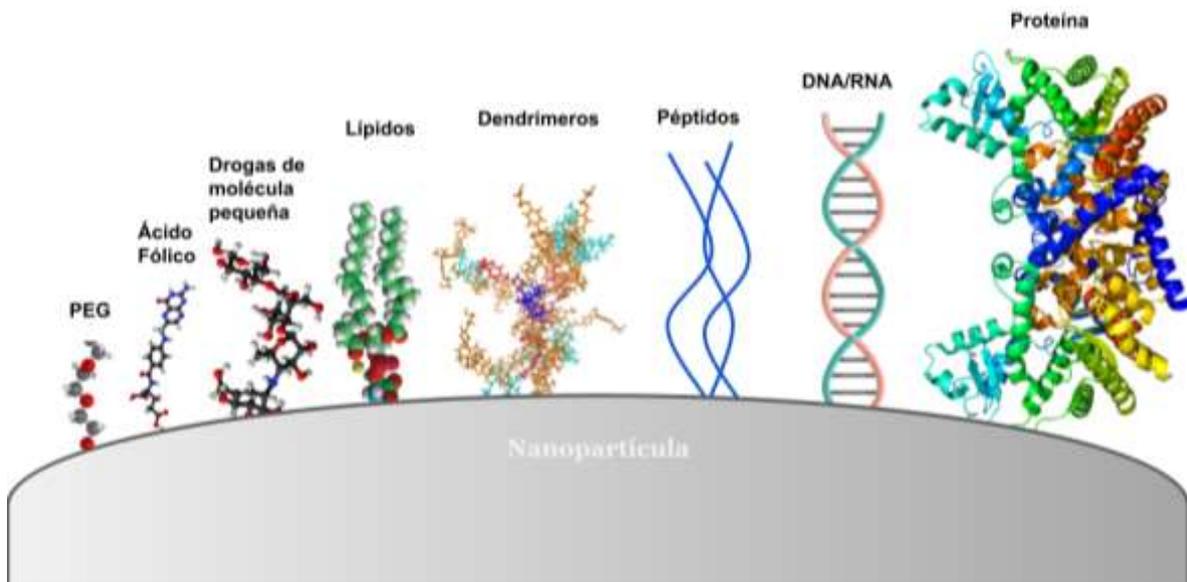


Figura 2. Esquema de la funcionalización superficial de nanopartículas. En gris se representa la superficie ficticia de una nanopartícula, y sobre ella diferentes estructuras con las cuales podría funcionalizarse, de izquierda a derecha, PEG, ácido fólico, drogas de moléculas pequeñas, lípidos, dendrímeros, péptidos, DNA/RNA y proteína. Las estructuras no están a la escala real de tamaño. (Imagen adaptada de Alarcon & Ahumada, 2019).

1.2 Características de los hidrogeles

Los hidrogeles se caracterizan por su baja densidad, facilidad de modificación, degradabilidad controlada y efectos ambientales leves (Boffito *et al.*, 2014; Thakur & Thakur, 2015), como también por su estructura hidrofílica tridimensional, que puede tanto absorber como retener grandes cantidades de agua. Adicionalmente, los hidrogeles son capaces de realizar transferencia efectiva de masa, tiene similitud con los tejidos naturales (Ahmed, 2015) y también la habilidad de adoptar diferentes formas (Thakur & Thakur, 2015).

1.3 Propiedades de los hidrogeles

Los hidrogeles contemplan parámetros importantes para ser considerados en la confección de otros hidrogeles, tanto para el uso farmacéutico como biomédico (Oyen, 2014). Oyen y colaboradores mostraron que las propiedades de los hidrogeles son intrínsecamente importantes y pueden limitar su uso y aplicación en la ingeniería de tejidos, debido a esto, las características mecánicas de los hidrogeles toman importancia tanto a nivel microscópico como macroscópico, en la regulación del comportamiento celular. Una de las principales teorías que define dichas propiedades mecánicas, se definen por la teoría de la elasticidad de goma independiente del tiempo, y la viscoelasticidad dependiente del tiempo, con ello, es posible analizar la estructura de los hidrogeles (Anseth *et al.*, 1996). Si bien existen varias ecuaciones que se derivan de este comportamiento mecánico, los términos para tener en cuenta son la elasticidad, resistencia a la tracción, deformación, y resistencia a la compresión.

Por elasticidad se entiende a la capacidad de un material para deformarse instantáneamente cuando se somete a una carga mecánica. La resistencia a la tracción se define como el esfuerzo en el punto de ruptura durante un alargamiento de un hidrogel. Por su parte, la resistencia a la compresión se refiere a la capacidad de soportar una carga inducida para disminuir el tamaño del material. Mientras que la rigidez se define como la resistencia a sufrir una deformación cuando el material se expone a una carga mecánica. Cabe destacar que la resistencia, en contraste a la rigidez, representa la resistencia del material frente a la fractura o falla resultante de una deformación excesiva (Vedadghavami *et al.*, 2017).

En paralelo a las propiedades mecánicas que puede soportar un hidrogel, que a nivel experimental se miden mediante la presión, se ha descubierto la existencia de una “protein corona”, la cual es un entorno biomolecular que rodea a nanopartículas que ingresan al cuerpo. Esta corona se conforma de una capa de biomoléculas (proteínas, péptidos, fosfolípidos, y otros) alrededor de las nanopartículas y otorga cualidades de protección, biocamuflaje y funcionalización a nanoestructuras sintéticas (Monopoli et al., 2012)

2. Corona proteica y matriz extracelular

2.1 Corona proteica

La “*protein corona*” o corona biomolecular, está compuesta principalmente de proteínas, pero diversos estudios han reportado que además se incluyen otras biomoléculas como lípidos, metabolitos y azúcares (Corbo *et al.*, 2017). El hecho de que se forme una corona proteica es un fenómeno universal, exceptuando aquellas con recubrimientos zwitteriónico. La composición de la corona proteica se ve influenciada principalmente por las características de la nanopartícula, sus propiedades fisicoquímicas, como también por variables ambientales, incluyendo temperatura, fuente de proteína y el tipo de enfermedad específica presente en el paciente (Corbo *et al.*, 2017).

Se ha reportado que la formación de una corona proteica consta de distintos componentes, lo cual lo hace un proceso dinámico. En primer lugar, las propiedades fisicoquímicas ya mencionadas, como también el tamaño, carga, forma, morfología y heterogeneidad de las nanopartículas poliméricas es variable, lo que puede afectar la formación de la corona de proteínas a su alrededor. Por otro lado, la naturaleza y estructura tridimensional de la proteína o péptido juega un papel importante en la formación de la corona, en cuanto a la constante de asociación/disociación, estabilidad, forma y eficiencia de unión específica (Pareek *et al.*, 2018). De esta forma, la corona es determinante en la distribución de las nanopartículas en fluido biológico, como también en su destino, ya que esta corona proteica es la que será identificada por varias células y logrará tanto proteger como camuflar los componentes internos de la nanopartícula (Pareek *et al.*, 2018). Todos los factores que forman o alteran a una corona proteica la harán más reconocible para una proteína que otra (Figura 3). Así, la manipulación

controlada en el diseño de la “*protein corona*” toma un rol muy importante para que la nanopartícula funcionalizada reconozca una proteína objetivo de forma selectiva y con alta afinidad.

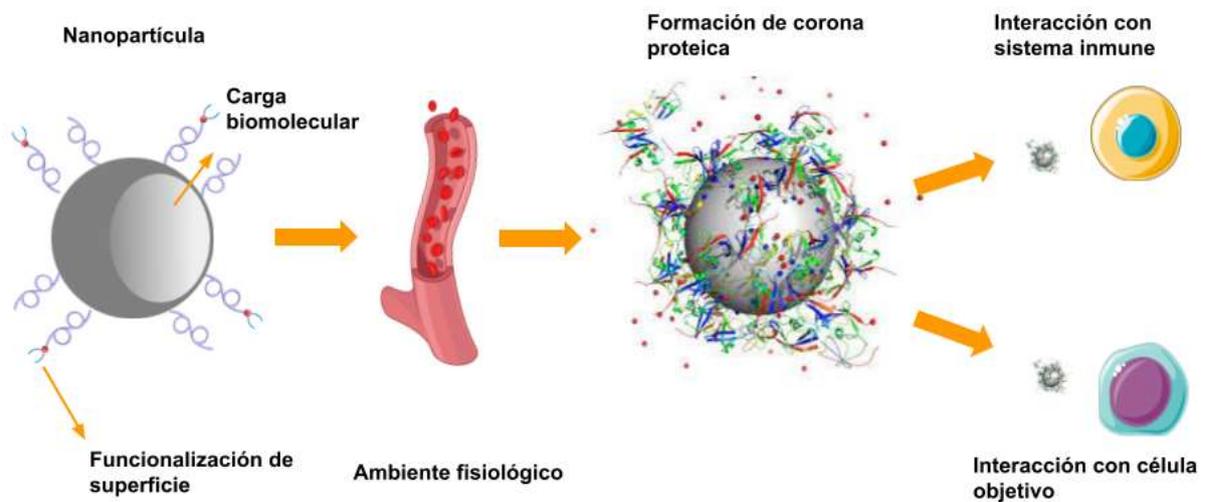


Figura 3. Esquema de la formación de una corona en un ambiente fisiológico. (Imagen adaptada de Digiacomo *et al.*, 2020).

Las nanopartículas han sido parte de estudios en las que su uso en macromoléculas y matrices extracelulares mejoran la homogeneidad y cumplen propiedades óptimas para la regeneración tisular e incluso cardíaca. Como ejemplo, nanopartículas de oro sintetizadas tienen una naturaleza biocompatible y un alto potencial para mejorar las comunicaciones eléctricas intercelulares con células cardíacas, su forma esférica y homogénea hace que se distribuyan en la superficie porosa de la matriz, proporcionando una conductividad favorable e influencias biológicas en la reparación cardíaca (Dong *et al.*, 2020).

2.4 Matrices extracelulares

Las matrices extracelulares (ECM, por sus siglas en inglés) corresponden a redes macromoleculares tridimensionales y altamente especializadas (Figura 4). Están compuestas de colágeno, proteoglicanos/glicosaminoglicanos, elastina, fibronectina, lamininas y varias otras glicoproteínas, las cuales son moléculas altamente ácidas e hidratadas (Theocharis *et al.*, 2016). La ECM proporciona los espacios donde se incrustan las células para completar las estructuras generales que forman los tejidos (Theocharis

et al., 2019), dando así, mediante su interconexión, la formación de órganos con funciones fisiológicas apropiadas. Como otra característica, la ECM suministra a las células señales químicas y mecánicas que son adecuadas para regular la migración, supervivencia, proliferación y diferenciación celular, manteniendo la homeostasis y las funciones de los tejidos.

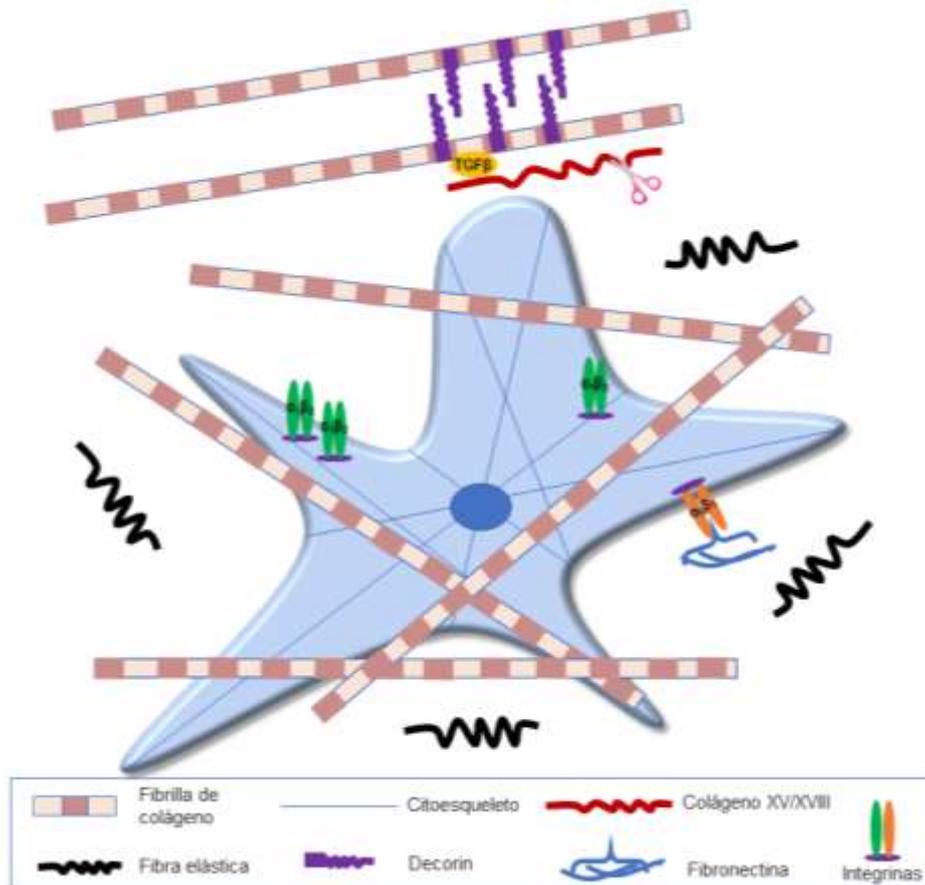


Figura 4. Esquema de la matriz extracelular y su diversidad de funciones. Proteínas de la matriz dan soporte estructural (colágeno tipo I, fibras elásticas), interacción con receptores de la superficie celular para proporcionar señales mecánicas (colágeno e integrina $\alpha1\beta2$), migración celular directa (fibronectina e integrina $\alpha5\beta1$), captan factores de crecimiento (decorina y TGF β) y a través de la degradación, proporcionan moléculas de señalización bioactivas (colágenos XV y XVIII liberan endostatina). (Imagen adaptada de (Birch, 2018)).

Las moléculas de la ECM interactúan con células residentes a través de numerosos receptores de superficie celular, incluyendo las integrinas, receptores de dominio de discoidina, y receptores como CD44, RHAMM, LYVE-1 y layilin (Theocharis *et al.*, 2019). Tanto sus componentes, como las interacciones que producen, hacen que la ECM se someta a continuas remodelaciones, ya sea en condiciones normales como en el caso de la cicatrización por heridas. Así, dependiendo de las circunstancias patológicas como también de los niveles de cada elemento que compone a la ECM, el mantener una

composición y estructura adecuada de las ECM es fundamental e importante para la integridad y funcionalidad del tejido (Theocharis *et al.*, 2019).

2.4 Componentes de la ECM

Uno de los principales componentes de las ECM corresponde al colágeno. Si bien la familia de proteínas del colágeno contiene 28 tipos diferentes de arquitecturas y funcionalidades muy variadas, todas poseen la estructura de triple hélice (Ramachandran & Kartha, 1954). Los enlaces de hidrógeno intercatenarios periódicos entre tres hélices del tipo poliprolina-II forman la triple hélice de colágeno (Luo & Kiick, 2013). Dichas hebras están hechas de repeticiones de tripéptidos "GXY", siendo las posiciones X e Y principalmente usadas por prolina y 4R-hidroxiprolina, en colágenos nativos (Figura 5) (Chen & Zou, 2019).

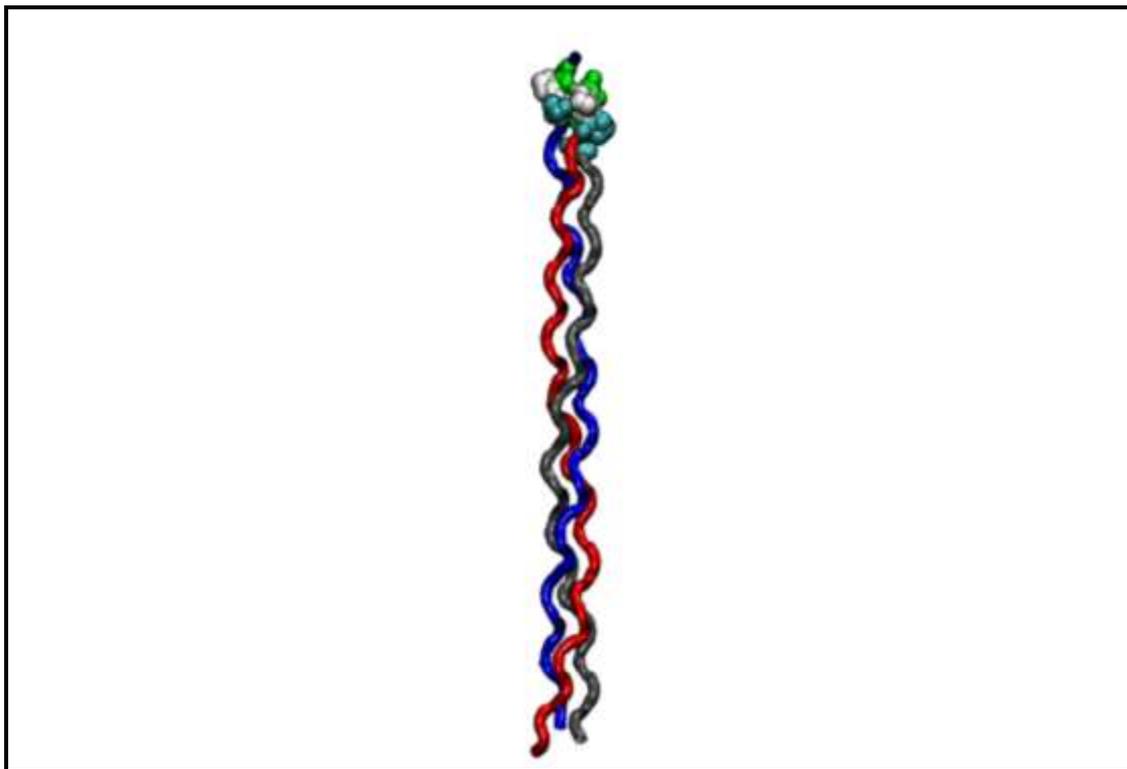


Figura 5. Representación del cristal 3DMW correspondiente al colágeno tipo 3 humano y su triple hélice. Se diferencian las 3 cadenas por colores rojo, azul y gris. Se destaca uno de los tripéptidos Gly-Pro-Hyp presentes en la secuencia en verde-blanco-cian, respectivamente.

Debido a la limitación del uso de colágenos de origen animal, es que se propone el uso de un péptido sintético similar al colágeno, como alternativa para su uso clínico. Estos tipos de péptidos, dado el autoensamblaje multi-jerárquico característico del colágeno, han atraído a los científicos desde hace mucho tiempo por las posibles aplicaciones en la ingeniería de tejidos. Como ejemplo, el péptido a utilizar, de secuencia (NH₂-GC(GPO)₈GGCG-OH) es un péptido que presenta la característica unidad repetitiva de glicina-prolina-hidroxiprolina del colágeno, complementado por puentes de hidrógeno, esto dándole estabilidad a la triple hélice mediante su ensamble (O'Leary *et al.*, 2011) y a su vez propagándose en nanofibras con empaquetamiento de triple hélice y longitudes nanométricas (O'Leary *et al.*, 2011).

Si bien estos tipos de péptidos son difíciles de producir, tienen a nivel estructural y funcional la capacidad de ser bloques de construcción ideales para el desarrollo de adhesivos de tejido biológico y rellenos de activación a distancia y controlada (McTiernan *et al.*, 2019).

Así lo ha demostrado una investigación donde, gracias a la triple hélice compactada del colágeno, se forman estructuras pseudo-hexagonales y escalonadas, llamadas fibrillas de colágeno (Islam *et al.*, 2016). En la figura 6 se observa como estas fibrillas se autoensamblan lineal y lateralmente, dando fibras de colágeno y una red de hidrogel. Para lograr esto, el diseño y síntesis del péptido debe estar en las concentraciones suficientes para agrupar las nanofibras con el triple empaquetamiento helicoidal, característico del colágeno natural, para que interactúen y formen los hidrogeles de alta calidad, dando resultados prometedores para procesos en donde el colágeno tiene un rol principal (Islam *et al.*, 2016).

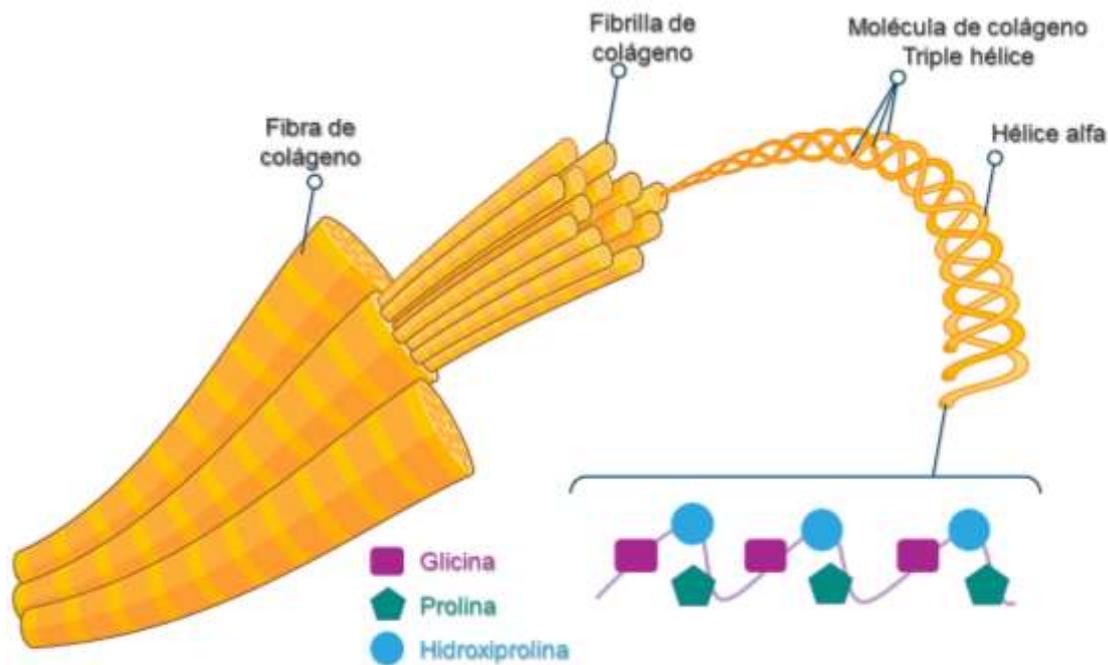


Figura 6. Esquema que representa la creación de fibras de colágeno a partir de la secuencia de aminoácidos.

Otros estudios han reportado que hidrogeles de colágeno con péptidos derivados de la histona desacetilasa 7 (HDAC7) promueven la regeneración del miocardio infartado. El hidrogel de colágeno tipo I es inyectado por vía intramiocárdica en la región infartada de la pared del corazón, lo que reduce la apoptosis celular y promueve la progresión en el ciclo de los cardiomiocitos (Zhang *et al.*, 2019). Aunque el colágeno es el componente de importancia para este estudio, existen otros elementos de las ECM.

La elastina es un componente de la ECM que está presente en tejidos que experimentan un estiramiento continuo, como los pulmones, la piel, ligamentos, el cartílago elástico y los vasos sanguíneos elásticos. Las lamininas por su parte, son componentes importantes en las membranas basales, que consisten en grandes heterotrímeros que forman una cruz de 3 cadenas y tienden a auto-asociarse para crear una gran red de laminina en las membranas basales, las cuales interactúan con colágeno IV (Theocharis *et al.*, 2019). Las fibrillas están compuestas principalmente de colágeno I y cantidades menores de colágeno III y V y su formación en la ECM se da gracias a la fibronectina. La fibronectina tiene varios motivos funcionales que son capaces de interactuar con receptores como las integrinas, colágeno y fibrina, que actúan como puente en la organización de la matriz y las interacciones matriz-célula (Zollinger & Smith, 2017). En

cuanto a los proteoglicanos, otro constituyente principal de las matrices extracelulares, están presentes también en la superficie celular e intracelular. Son clasificados en base a su localización, características genéticas, estructurales y funcionales comunes. La comunicación de estos componentes y las funciones de las que son protagonistas es clave para el funcionamiento de las ECM.

2.4 Integrinas

Como se comentó anteriormente, el colágeno es la principal proteína de este estudio y se destaca como la proteína estructural más abundante en el organismo de vertebrados, siendo crucial en la reparación de heridas, como también en la morfogénesis, inflamación, entre otros (Siljander *et al.*, 2004). En este sentido, las integrinas son moléculas de adhesión heterodiméricas, que forman un subgrupo importante de receptores, que regulan la interacción entre el colágeno y las células. Cuatro son las subunidades que se asocian de forma no covalente a la integrina β_1 (Figura 7), constituyendo la familia de integrinas de unión a colágeno nativo (Gullberg & Lundgren-Akerlund, 2002).

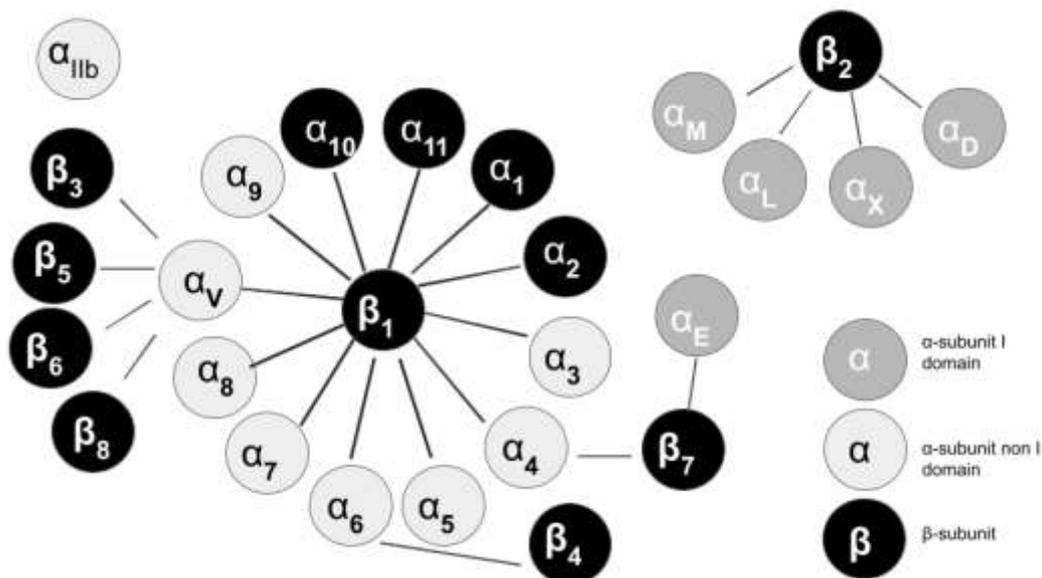


Figura 7. Familia de integrinas. Se muestran las cadenas de integrinas actualmente conocidas de la familia de las integrinas vertebradas, con diferentes etiquetas de colores según la subunidad. (Imagen adaptada de Donald *et al.*, 2002).

La integrina $\alpha 2\beta 1$ es un receptor bien caracterizado y extendido para colágeno, laminina y otros ligandos que no forman parte de la matriz. Esta integrina es la única que se une al colágeno en las plaquetas y es crucial para la deposición en los colágenos expuestos en las paredes arteriales dañadas. La clave entre la asociación de las integrinas y los péptidos de tipo colágeno, es que en este tipo de péptidos se identificó la secuencia GFOGER, como el motivo de reconocimiento mínimo para 3 tipos de esta familia de proteínas, que gracias a la co-cristalización, reveló una interacción crucial entre los sitios de adhesión dependiente de iones metálicos y la secuencia GER (Knight *et al.*, 2000). Además de esto, el colágeno proporciona sitios de unión para que los receptores celulares de integrina produzcan adherencias focales (Mostafavi-Pour *et al.*, 2001; Tulla *et al.*, 2001; Berrier & Yamada, 2007). Estas adherencias célula-matriz, son esenciales para la regulación de procesos biológicos como la proliferación, supervivencia celular y la tumorigénesis (Berrier & Yamada, 2007). Por ende, las integrinas juegan un papel clave, actuando como receptores para los objetivos de la matriz extracelular, transmitiendo señales tanto dentro como fuera de la célula, proceso que involucra a más de 50 proteínas (Zamir *et al.*, 1999; Hynes, 2004).

Las características de esta comunicación entre matriz-célula es el blanco para diferentes proteínas, y biomoléculas en general que incluyen los péptidos de tipo colágeno mencionado anteriormente, y un compuesto altamente utilizado en el área farmacéutica, el polietilenglicol.

3. Polietilenglicol (PEG)

Dentro de los diferentes polímeros utilizados en nanotecnología, se puede encontrar el polietilenglicol (PEG), el cual posee las ventajas mencionadas anteriormente para un hidrogel, además de que se caracteriza por poseer una baja toxicidad, siendo a su vez eliminado tanto por vía hepática, como por vía renal (Greenwald *et al.*, 2003), posicionándolo como uno de los compuestos más utilizados para aplicaciones farmacéuticas.

PEG es un poliéter termoplástico cristalino, con una alta solubilidad en agua en todas las concentraciones, presenta a su vez inmunogenicidad y antigenicidad (Herzberger *et al.*, 2016). La alta solubilidad lo hace único entre los poliéteres alifáticos, lo cual está dado por la distancia de los oxígenos en la estructura de este polímero (Figura 8), que es compatible con la distancia de los hidrógenos en la molécula de agua (Herzberger *et al.*, 2016).

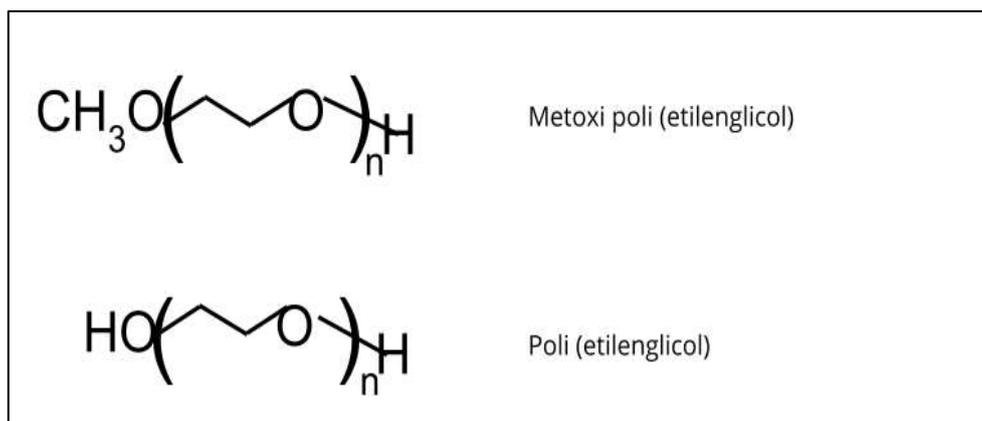


Figura 8. Estructura química del polietilenglicol (PEG). La letra n corresponde al número de repeticiones de grupos oxietileno. (Imagen adaptada de Greenwald *et al.*, 2003).

Se debe considerar que PEG es un líquido o sólido de bajo punto de fusión, dependiendo del peso molecular, vale decir, el número de n. El punto de fusión de este poliéter depende de la longitud de la cadena y se puede adaptar al rango de temperatura fisiológica mezclando y co-cristalizando diferentes pesos moleculares de PEG, que son importantes para cremas, ungüentos para la piel y supositorios (Herzberger *et al.*, 2016). Las características y usos ya implementados de polietilenglicol dan lugar a una amplia gama de aplicaciones clínicas ya sea en el área cosmética, farmacéutica y médica, lo cual podría generar nuevas tecnologías en biomateriales al combinarlo con péptidos de

función conocida, quienes pueden verse favorecidos por las características que posee PEG.

Entender el autoensamble de estos polímeros es clave para el futuro desarrollo de nuevos biomateriales, y es que han demostrado una alta biocompatibilidad, biodegradabilidad y microambientes que imitan la matriz extracelular (Chen & Zou, 2019). Su ensamblaje puede desencadenarse por estímulos externos, como la fuerza iónica, temperatura y pH, dando así la formación de nanoestructura o nanomateriales mediante condiciones fisiológicas (Chen & Zou, 2019).

Un beneficio característico del uso de PEG, es su “*stealth*” o propiedad anti-incrustante, la cual repele la adsorción de proteínas no específicas en regeneración de tejidos y la adhesión celular. Gracias a esto, le permite crear patrones funcionales en superficies de PEG o dentro de hidrogeles de PEG tridimensionales cuando se modifica con moléculas de adhesión adecuadas. Así, la capacidad de las moléculas de PEG para prevenir interacciones biomoleculares no específicas tiene ciertas ventajas y desventajas (Lin & Anseth, 2009). En el caso de la regeneración de tejido, las moléculas de PEG y su característica como hidrogel anti-incrustante reducen la adhesión de células inflamatorias a la superficie del hidrogel, disminuyendo las posibilidades de formación de cápsulas. No obstante, dicha propiedad dificulta la adsorción de moléculas bioactivas, como aquellas de la matriz extracelular, que apoya el crecimiento y función de las células encapsuladas, reduciendo la viabilidad de dichas células que requieren interacciones con la matriz circundante. Aun así, el motivo funcional es fácil de incorporar dentro de los hidrogeles de PEG mediante copolimerización (Lin & Anseth, 2009). Algunos investigadores, ya han incorporado una variedad de secuencias de péptidos de adhesión celular derivadas de la matriz extracelular dentro de hidrogeles de PEG, promoviendo la supervivencia de células encapsuladas, incluyendo células β pancreáticas, células madre mesenquimales humanas, entre otras.

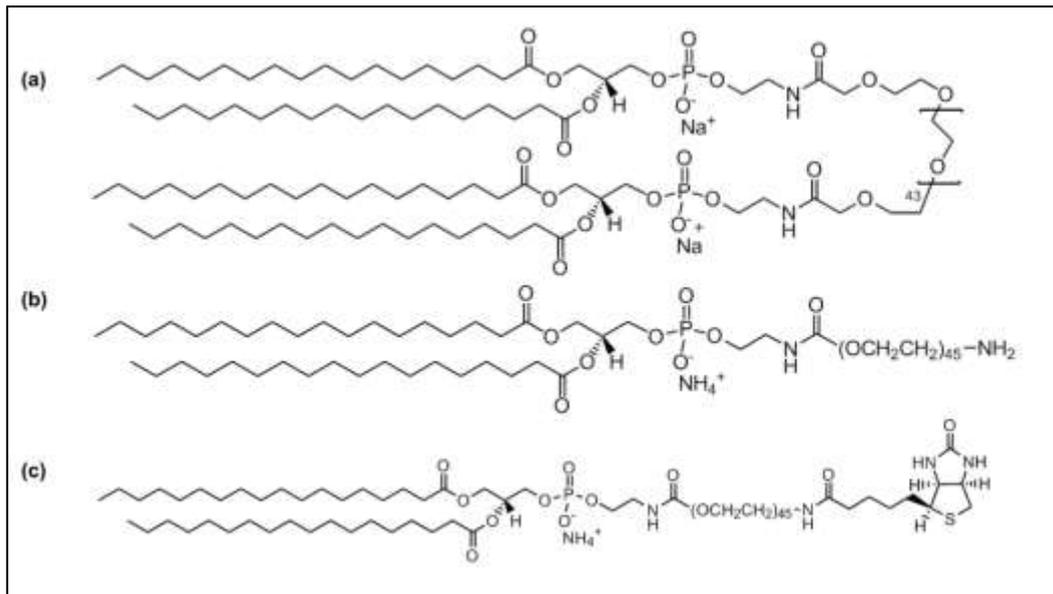


Figura 9. Estructura química de productos comercializados de PEG. A DSPE-mPEG-2000, b DSPE-PEG-NH₂, y c DSPEPEG(2000)Biotin[®] Avanti Polar Lipids, Inc. (Imagen adaptada de Alarcon *et al.*, 2019).

Otros usos de PEG han sido la solución para la proteólisis excesiva de fibronectina (FN), la cual altera la reparación tisular en heridas crónicas (Zhang *et al.*, 2014). Este componente es esencial en la cicatrización de heridas y gracias al grupo químico polietilenglicol, se ha logrado, junto a residuos de cisteína, darle más estabilidad de la cual tiene la misma FN nativa (Zhang *et al.*, 2013). Así, la FN “pegilada” con cisteína fue un apoyo en la adhesión y migración celular en la misma medida que esta proteína en su estado nativo. No obstante, no fue ensamblada en una matriz extracelular al inmovilizarse, por lo que, el conjugado de FN-PEG con residuos de lisina no perturba la estructura de FN y presenta una adhesión celular comparable a su estado nativo, ensamblándose además en fibrillas de matriz extracelular (Zhang *et al.*, 2014).

El rol de PEG en la señalización celular de la ECM necesita de una incorporación celular sistemática. La ausencia de moléculas de señalización celular en hidrogeles de PEG los convierte en matrices biocompatibles inertes, sin adhesión celular o adsorción de proteínas (Papavasiliou *et al.*, 2012). Es por esto, que el uso de matrices sobre las cuales introducir señales biofuncionales para la ECM en forma soluble o inmovilizada covalentemente, ayudaría a modular respuestas celulares específicas. Para aquello, el requisito mínimo para que las células de anclaje sobrevivan sobre y dentro de las

matrices de PEG es hacerlas adhesivas a las células (Papavasiliou *et al.*, 2012). Es por esto, que es importante funcionalizar los hidrogeles de PEG con secuencias que ayudan a la adhesión celular, como los péptidos de tipo colágeno, y con ello poder evaluar preguntas tales como: **¿Qué aportaría PEG a la estabilización y ordenamiento de la matriz extracelular?, ¿Es importante el ordenamiento estructural de una matriz extracelular?, ¿Qué tipo de ordenamiento adoptaría una matriz basada en péptidos CLP y PEG? ¿Qué características mecánicas poseen estos hidrogeles?** Estas interrogantes son las que se buscan responder en el presente trabajo de tesis, mediante **el estudio estructural de la funcionalización de sistemas PEG-CLP, utilizando simulaciones de dinámica molecular**, métodos computacionales que permiten seguir el movimiento conformacional de una molécula o proteína, a lo largo del tiempo en un nivel atómico (Collier *et al.*, 2020). Este método ha expandido drásticamente el descubrimiento de fármacos gracias a la resolución temporal fina, la precisión y accesibilidad de la simulación.

Los sistemas serán simulados en diferentes concentraciones de péptidos y 8PEG-Mal (ver sección 5.0.1). En primer lugar, sin presencia de solvente, dado el tamaño de los sistemas, para que ocurra una compactación y se reduzca la caja de agua a utilizar en el segundo acercamiento de dinámica molecular a utilizar, correspondiente al uso de solvente explícito, para lograr en este punto, altos tiempos de simulación. Estas trayectorias se analizarán mediante scripts en Tcl, con un enfoque en las interacciones moleculares, parámetros geométricos de ordenamiento y estabilidad de las conformaciones alcanzadas en el sistema.

Hipótesis

La inclusión de péptidos tipo colágeno en la formación de hidrogeles basados en biopolímeros (PEG) facilita el auto ensamblaje tridimensional y aumenta la estabilidad estructural de materiales con fines biomédicos.

Objetivo General

Evaluar la estabilidad estructural de hidrogeles conformados por péptidos tipo colágeno y polímeros biodegradables en distintas proporciones, mediante la generación de un protocolo basado en dinámica molecular clásica.

Objetivos Específicos

- Diseñar modelos de hidrogeles compuestos de polietilenglicol (PEG) funcionalizados con péptidos tipo colágeno en distintas proporciones.
- Evaluar estabilidad y conformaciones de equilibrio para péptidos de auto ensamblado utilizando simulaciones de dinámica molecular.
- Estimar estabilidad y conformaciones de equilibrio para macrosistemas replicados en los 3 ejes de coordenadas mediante dinámica molecular clásica.
- Examinar la resistencia mecánica de hidrogeles mediante simulación molecular a distintas presiones.

Materiales y Métodos

Con el fin de poder realizar los objetivos propuestos la presente tesis, se planteó el uso de diferentes métodos computacionales, incluyendo el modelado de moléculas, simulaciones de dinámica molecular sin presencia de solvente, como también simulaciones con solvente explícito. Como último punto, se analizó los resultados de dinámica molecular mediante scripts en lenguaje Tcl, para estudiar los niveles de resistencia mecánica de los hidrogeles sometidos a diferentes valores de presión en las simulaciones ejecutadas. En la figura 10, se pueden observar los 4 hitos planteados para este proyecto de tesis, donde se destaca: 1, el diseño de modelos de hidrogeles compuestos de polietilenglicol (PEG) funcionalizados con péptidos tipo colágeno en distintas proporciones. 2, evaluación de estabilidad y conformaciones de equilibrio para péptidos de auto ensamblado utilizando simulaciones de dinámica molecular. 3, repetir el hito 2 pero para sistemas replicados en los 3 ejes de coordenadas, con la finalidad de estudiar de mejor manera las estructuras encontradas en el hito anterior. Y finalmente 4, el análisis a la resistencia mecánica de hidrogeles simulados en el punto 3.

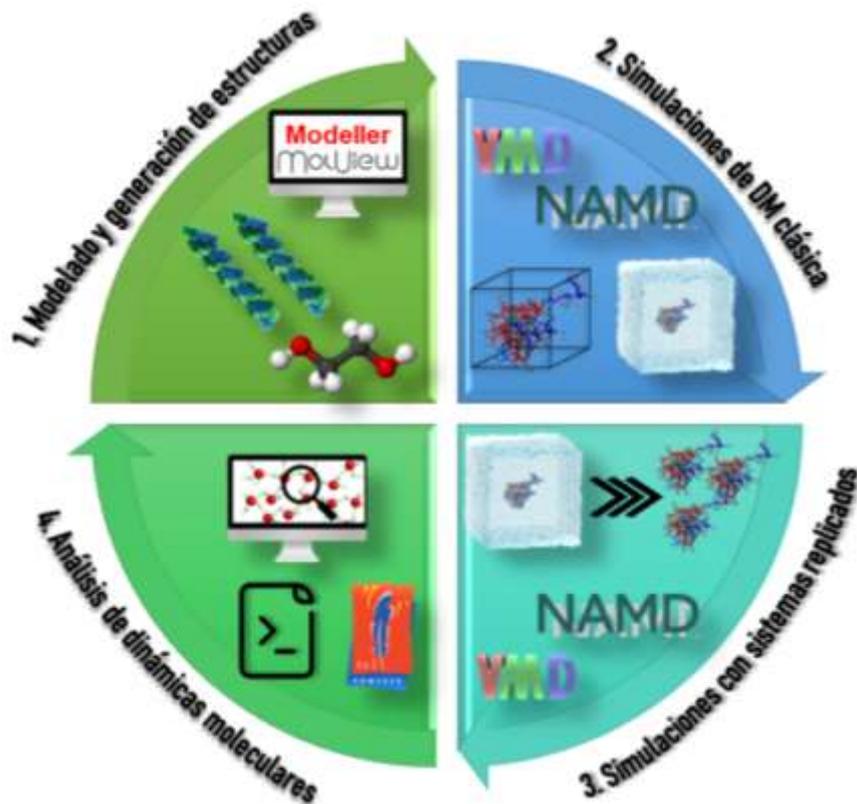


Figura 10. Resumen de metodología a seguir en este trabajo.

4. Modelado y generación de estructuras

4.1 Modelado tridimensional de estructuras tipo colágeno.

Con el objetivo de estudiar las estructuras tridimensionales de matrices extracelulares sintéticas, conformadas por péptidos y polímeros, en un inicio es importante modelar y obtener las estructuras moleculares de cada especie. En primer lugar, es necesario obtener la estructura tridimensional del péptido tipo colágeno a utilizar. Para esto, se realizó un modelado de su estructura, en base al péptido conocido como CLP1, el cual ha sido modelado previamente y aprobado a nivel experimental y computacional. Más en detalle, McTiernan y colaboradores en el año 2019 (McTiernan *et al.*, 2019) diseñaron los péptidos CLP1 y CLP2 para producir materiales biomiméticos con variada viscosidad, con el fin de utilizarlos en el cierre de heridas sin sutura.

Para cumplir con este punto, asociado al primer objetivo específico, se utilizó la estructura de CLP1 modelado previamente por Alarcón y cols. (2017) como templado de nuestro péptido. CLP1 fue modelado con el servidor “Swiss-model” (Biasini *et al.*, 2014), obteniendo así un modelo de homología del péptido CLP1, a partir de la secuencia CG(PKG)4(POG)4(DOG)4. En esta secuencia, “O” corresponde al aminoácido hidroxiprolina. La identidad de la secuencia entre el colágeno y el péptido modelado es de un 81,48% y se ha utilizado una estructura de colágeno derivada de manera experimental como templado, cuyo PDB ID es 1NAY (Stetefeld *et al.*, 2003). Al tener un porcentaje de identidad de secuencia de alto valor, la estructura generada para la secuencia DOG se replicó de forma manual, construyendo así el modelo final de CLP1 que, basado en el templado, el modelo por homología fue generado en la estructura de triple hélice multimérica (Figura 11). Con esta estructura, y utilizando la secuencia del péptido de interés, se modeló su estructura tridimensional utilizando el mismo servidor, para así obtener el archivo de coordenadas (PDB) correspondiente.

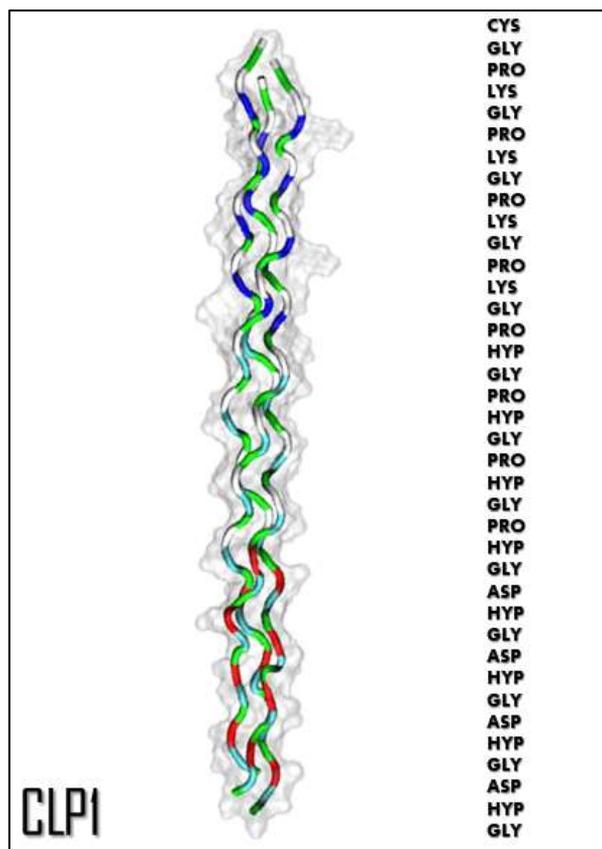


Figura 11. Estructura tridimensional de CLP1.

4.2 Modelamiento de cadenas de PEG

A nivel experimental se ha postulado que la presencia de polímeros tales como polietilenglicol (PEG), ayudan a estabilizar y ordenar las estructuras de matrices extracelulares. De esta forma, para evaluar el poliéter utilizado en este estudio y aportando al primer objetivo específico, se generaron estructuras moleculares de PEG (siendo la base de estas lo que se observa en la Figura 12), con una extensión específica en su cadena, utilizando la plataforma web Molview (Bergwerf, 2015). Esta plataforma permite el dibujo de estructuras tridimensionales de manera gratuita, como también fácil y eficiente. En concreto, las cadenas de PEG se prepararon de un largo aproximado de 800-1000Da para evaluar la posterior estabilidad del polímero al funcionalizarlo en conjunto con los péptidos de tipo colágeno. Adicionalmente, se utilizó el software OpenBabel (O'Boyle *et al.*, 2011), para convertir los archivos generados por Molview a formatos de archivos de coordenadas.

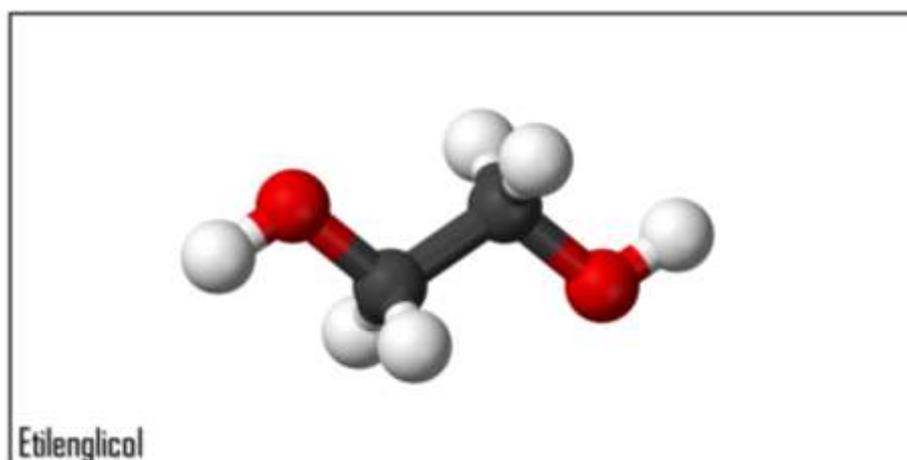


Figura 12. Representación 3D de una molécula de etilenglicol.

4.3 Generación de modelos conjugados de Péptido-PEG

Con el objetivo de evaluar la estabilidad estructural de matrices sintéticas, se estudió la dinámica y ensamble molecular de sistemas péptido-polímero. Para esto, se ensamblaron distintas cantidades de péptido y polímero (2:1, 4:1, 8:2, 10:3, Péptido:8-arm PEG-Mal), se representa la lógica de construcción en la Figura 13.

Para el caso de la simulación, el PEG utilizado está compuesto de 22 monómeros, dicha concentración fue igual para los 8 brazos a modelar. Estos valores referenciales corresponden a unidades de PEG con polímeros de peso molecular de ~ 1000 Da. Si bien, en el artículo de referencia (McTiernan *et al.*, 2019) se utilizan polímeros PEG de 10.000 y 20.000 Da de peso molecular, su modelamiento computacional sería muy costoso y requeriría de trayectorias de dinámica molecular extensas (orden de microsegundos) para obtener conformaciones representativas y estables.

En este punto es importante parametrizar, según el campo de fuerza CHARMM y/o CGenff, las moléculas de PEG y maleimida para que sea compatible la evaluación de la interacción con el péptido. La maleimida, según bibliografía tendrá un rol que permita la unión covalente de un enlace tioéter estable con la cisteína del péptido (McTiernan *et al.*, 2019). Adicionalmente, fue necesario construir la topología de dicho enlace covalente entre el péptido (cisteína) y el grupo maleimida, el cual permita de forma automática la identificación de átomos que participan en el “*patch*”, eliminación de

átomos, asignación de cargas, y ángulos de la estructura final. Un “patch” se define como un tipo de entrada de residuo el cual representa la modificación de un residuo existente (Brooks *et al.*, 2009). Los “patches” son utilizados para unir dos residuos o para modificarlos, en el caso de este estudio, se utilizarán ambos casos ya que la modificación de los residuos permitirán realizar la unión de las moléculas tanto de PEG-Mal con hexaglicerol, como también la unión del péptido a los brazos de PEG-Mal. Posteriormente, se realizará una minimización de energía utilizando el software NAMD (Phillips *et al.*, 2005) para evaluar la estabilidad de las estructuras conjugadas de Péptido-PEG en distintas proporciones.

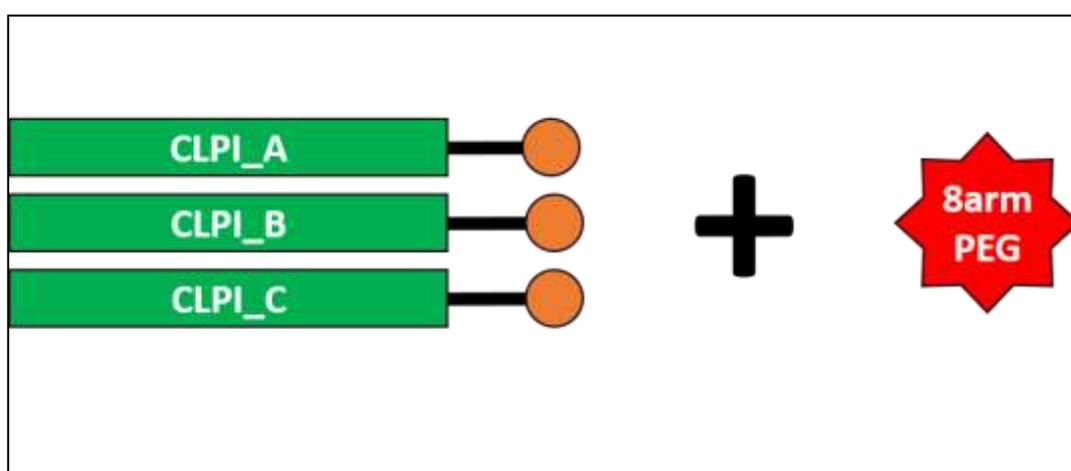


Figura 13. Representación del sistema Péptido:8-arm PEG-Mal a ejecutar en las simulaciones de dinámica molecular. Se considera esta lógica para armar la matriz. El color verde corresponde al péptido y las copias necesarias de éste según las concentraciones; el naranja representa la unión mediante el residuo de cisteína, por otro lado, el color rojo representa al polímero 8-arm PEG-Mal.

5. Dinámica Molecular

Con el objetivo de estudiar la dinámica de ordenamiento tridimensional de los complejos Péptido-PEG en sus diferentes concentraciones, se utilizaron dinámicas moleculares clásica a largos periodos de tiempo. En detalle, la simulación de dinámica molecular (DM) corresponde a un método computacional ampliamente utilizado para estudiar el comportamiento de sistemas biológicos en función del tiempo, y así evaluar procesos tales como difusión, que pueden verse afectadas por el tamaño del sistema o por la posición de los grupos radicales de las moléculas, como también el “binding”, para evaluar el coste energético que está asociado a otro proceso a analizar, correspondiente a los cambios conformacionales. Estos datos estructurales se estudiaron analizando las

trayectorias de cada simulación, como también con los antecedentes experimentales de las moléculas a simular, justificando el uso de esta metodología y así dar respuesta al segundo y tercer objetivo específico de este trabajo.

La DM se identifica como un método el cual está basado en cálculos teórico-computacionales que, a través del uso de aproximaciones simples, basadas en la física Newtoniana, buscan imitar los movimientos atómicos de las moléculas.

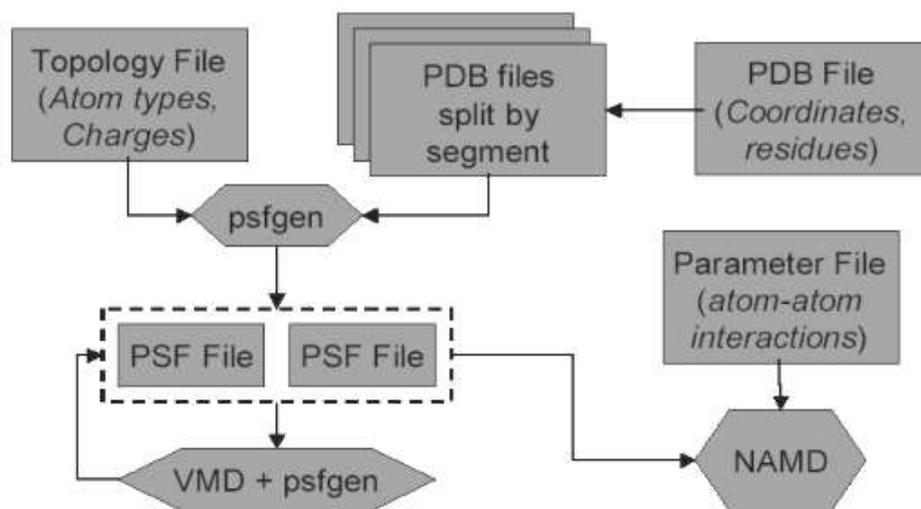


Figura 14. Diagrama de flujo que indica el rol de cada archivo y su utilización en VMD, NAMD y psfgen (plugin de VMD).

El proceso general de una simulación molecular se describe en la Figura 14, mientras que la función de energía del campo de fuerza, la cual describe cada uno de los movimientos del sistema, tales como estiramiento de enlaces, flexión de ángulos, rotación de ángulo diedro, flexiones fuera del plano del enlace (ángulos impropios), e interacciones electrostáticas se presentan en la Figura 15.

$$E_{\text{total}} = \underbrace{\sum_{\text{Enlaces}} K_r (r - r_{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{Ángulos}} K_\theta (\theta - \theta_{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{Diedros}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\theta - \gamma)]}_{\text{Enlazante}} + \underbrace{\sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]}_{\text{No Enlazante}}$$

Figura 15. Ecuación de la función de energía potencial para un campo de fuerza, utilizada para aproximar las fuerzas atómicas que gobiernan el movimiento molecular.

En resumen, la ecuación (Figura 15) calcula la energía potencial proveniente de las interacciones entre los átomos enlazados y los no enlazados. Por su parte, los enlaces químicos y los ángulos atómicos son modelados utilizando resortes virtuales simples, y los ángulos diedros, vale decir, las rotaciones sobre un enlace se modelan utilizando una función sinusoidal que se aproxima a las diferencias de energía entre las conformaciones eclipsadas y escalonadas. Las fuerzas no enlazantes surgen debido a las interacciones del tipo Van der Waals, modeladas a través del potencial de Lennard-Jones (Lennard-Jones, 1931), como también a las interacciones electrostáticas, modeladas usando la ley de Coulomb (Wilson, 1924). Una vez calculadas las fuerzas que actúan sobre cada uno de los átomos del sistema, las posiciones de estos átomos se mueven de acuerdo con las leyes de movimiento de Newton a lo largo de la simulación (Roy *et al.*, 2015).

5.0.1 Sistemas de estudio

En un primer paso, se ejecutaron simulaciones de DM con distintas concentraciones de péptido y PEG-Mal. Así, se simularon concentraciones de 2:1, 4:1, 8:2, 10:3, Péptido:8-arm PEG-Mal. En base a lo anterior y utilizando DM con distintas concentraciones de PEG en los modelos a simular, se logró estimar el efecto en la organización de la matriz sintética en función del incremento en la cantidad de PEG y la efectividad que ésta tiene al ser funcionalizada con los péptidos de tipo colágeno. Con lo anterior, también se logró proponer la mejor proporción de las moléculas del sistema, lo que puede dar datos concretos a utilizar en futuros estudios experimentales. Por otro lado, para ensamblar, preparar y posteriormente visualizar los sistemas, se utilizó el software VMD (Humphrey

et al., 1996), mientras que el software para ejecutar las dinámicas moleculares fue NAMD en su implementación GPU.

En particular para este proyecto de tesis, y justificado por el gran tamaño de los sistemas a simular, se realizaron simulaciones de dinámica molecular en vacío para evaluar compactaciones alternativas de los sistemas y así reducir la cantidad de átomos de agua que se generarán al utilizar solvente explícito.

5.1 Dinámica molecular sin presencia de solvente

Debido al gran tamaño de los sistemas a simular, en una primera instancia se propuso el uso de DM sin presencia de solvente, para evaluar el comportamiento de los sistemas, principalmente de los 8 brazos de PEG, que, en base a su extensión, se originaron grandes estructuras que debían ser solvatada, por lo que este acercamiento buscaba compactarlas. Por lo anterior, este tipo de DM sin presencia de solvente redujo el número de átomos de todos los sistemas, logrando así alcanzar tiempos de simulación mucho mayores.

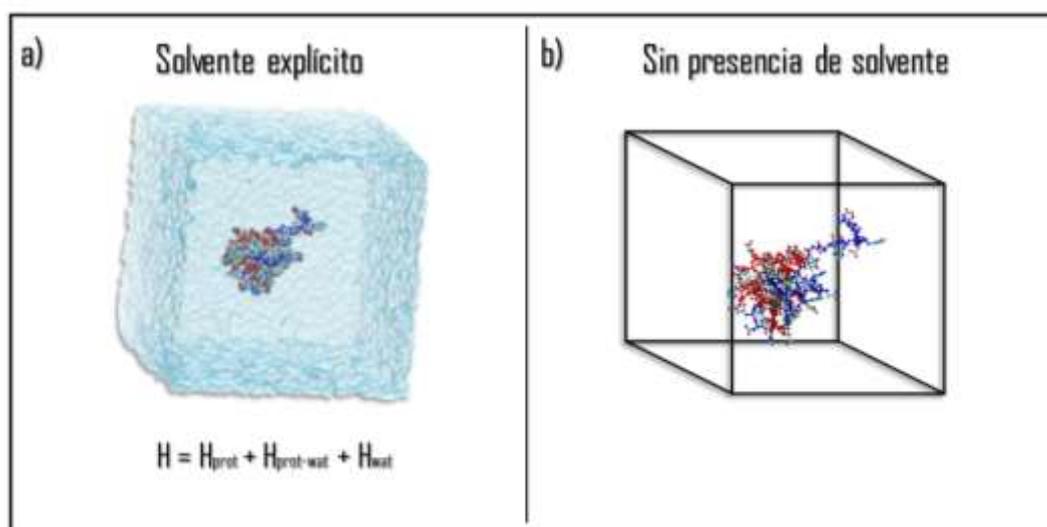


Figura 16. Representación de un sistema con solvente explícito (a) y sistema sin presencia de solvente (b).

En términos prácticos, se utilizó la herramienta CHARMM-GUI, en la cual es posible preparar sistemas biomoleculares complejos para simulaciones moleculares (Jo *et al.*, 2017). CHARMM-GUI permite crear archivos de entrada para programas como CHARMM, NAMD, GROMACS, AMBER, etc.

La implementación en CHARMM del modelo de solvatación contiene algunos parámetros claves en la función de energía potencial. Por su parte, parámetros termodinámicos y de solvatación se pueden encontrar en detalle en el estudio de referencia de Lazaridis y colaboradores en el año 1999 (Lazaridis & Karplus, 1999).

Finalmente, los sistemas se minimizaron por 20000 pasos, cantidad suficiente para alcanzar un mínimo energético conformacional adecuado en el sistema y generar conformaciones iniciales adecuadas para la posterior simulación molecular. Esta minimización se realizó utilizando el algoritmo Adopted Basis Newton-Raphson (ABNR), equilibrados por un periodo de 1 ns utilizando ensamble canónico (NVT) de 0 a 300K, y la producción de datos de interés se llevó a cabo por aproximadamente 10 ns, usando ensamble isotérmico-isobárico.

5.2 Dinámica molecular con solvente explícito

Una vez ejecutadas las simulaciones en vacío, se extrajeron conformaciones representativas de cada simulación (2:1, 4:1, 8:2, 10:3, Péptido:8-arm PEG-Mal) se solvató con moléculas de agua tipo TIP3P (Boonstra *et al.*, 2016) y neutralizó con iones de NaCl imitando así las condiciones experimentales (McTiernan *et al.*, 2019). Con ello, se evaluó la estabilidad de las conformaciones encontradas con solvente explícito.

Los sistemas se minimizaron por 20000 pasos, al igual que en el punto 5.1, con el algoritmo steepest descent, con 10 ns de equilibrado utilizando ensamble canónico (NVT) desde 0 a 300K, por su parte, posteriormente se simuló por 500 ns para la producción de datos en ensamble isotérmico-isobárico (NPT) a 300K y 1 bar, utilizando el campo de fuerza charmm36. Estas simulaciones permitieron obtener una mayor información acerca de la conformación, ordenamiento y estabilidad de las matrices que forman la funcionalización de Péptido-PEG.

5.3 Dinámica molecular con sistemas replicados tridimensionalmente y a diferentes valores de presión

Finalizadas las DM anteriores, se escogieron 2 proporciones adecuadas y se sumó un sistema adicional, sin presencia de péptidos, para poder analizar el comportamiento mecánico con presencia de diferentes cantidades tanto de péptido como de polímero.

En este punto se trabajó el nuevo sistema, junto a las proporciones 2:1 y 4:1, que, con ayuda de un script, fueron replicadas en los 3 ejes geométricos para construir y simular de mejor manera una red entrecruzada que represente a un hidrogel. A su vez, las simulaciones para estos 3 tipos de sistemas fueron ejecutadas a diferentes valores de presión inicial, 0.2, 1, 5 y 10 atmósfera, para poder evaluar el comportamiento como también los valores de energía de los sistemas en estudio.

Se utilizó la misma lógica para preparar los sistemas, como también los tipos de ensambles, se minimizó por 20.000 pasos, pero debido al tamaño de los sistemas en este punto, se simularon 50 ns.

6. Análisis de conformaciones de PEG-CLP mediante script en TCL

Finalmente, las trayectorias obtenidas desde dinámica molecular fueron procesadas con el software de visualización VMD. En una primera etapa, se analizaron las interacciones que se mantienen entre los mismos sistemas que han sido replicados en los distintos ejes, para evaluar la formación de la red entrecruzada que imita al hidrogel. Por otro lado, se evaluó el impacto de los diferentes valores de presiones utilizados, midiendo su impacto en valores como la energía total, o las diferencias de energías entre un sistema y otro. Posteriormente se realizaron análisis de RMSD, para ver diferencias de estabilidad entre un sistema y otro, esperando observar la estabilidad de las conformaciones alcanzadas y que tengan el equilibrio adecuado entre rigidez y flexibilidad que aporta el 8arm-PEG según lo que menciona el estudio de Islam y cols. (2017). Sumado a lo anterior, se realizaron análisis de radio de giro para estudiar la compactación de los sistemas y cómo afecta en ello la presión ejercida.

Estos y otros análisis necesarios para explicar la formación estable de matrices sintéticas extracelulares de péptidos-PEG y el comportamiento mecánico de éste, como la flexibilidad y resistencia al estrés, mediados por los pistones de presión, se ejecutaron mediante la programación de scripts en el lenguaje Tcl, el cual corresponde a un lenguaje de scripting integrado en VMD con características y comandos tales como los bucles y las expresiones condicionales. Su extensión Tk permite ejecutar los comandos mediante la “TkConsole” integrada en VMD. Según la necesidad del estudio, se pueden crear secuencias de comandos específicas que permitan realizar el análisis que se requiere como por ejemplo el cálculo de distancia entre dos átomos a través del tiempo y su distribución de las distancias, o incluso para colorear de manera automática aminoácidos específicos (Hsin *et al.*, 2008).

7. Resultados

7.1 Modelado de núcleo y estructura de PEG ramificado

Los modelos de polietilenglicol (PEG) de 8 brazos se obtuvieron posterior a la investigación de su estructura, ya que esta contempla una estructura inicial o “core” distinto de PEG. En base a artículos y laboratorios que producen este material, se confirmó que el núcleo del PEG de 8 brazos corresponde a una molécula de hexaglicerol, este “core” le otorga los 8 puntos de enlaces disponibles para que se unan las diferentes cadenas del polímero (PEG) y formen la estructura de 8 brazos.

Existen otros tipos de “core” como el pentaeritritol y tripentaeritritol que, gracias a la incorporación de fracciones reactivas, como la maleimida, se entrecruzan fácilmente en hidrogeles tridimensionales (Hutanu, 2014). Con esta información, se utilizó la herramienta Molview (Bergwerf, 2015) para dibujar la molécula de hexaglicerol en base a su estructura en dos dimensiones, para luego transformar con el mismo software a su estructura 3D, la que finalmente fue procesada con Openbabel (O’Boyle *et al.*, 2011) y Paramchem (Vanommeslaeghe *et al.*, 2010), consiguiendo así el archivo de coordenadas y de parámetros, respectivamente, los cuales son de importancia para generar el archivo de conectividad.

Por su parte, la estructura de PEG ramificada fue obtenida utilizando el mismo procedimiento anterior, dibujando 13 monómeros de la molécula, lo que corresponde a un PEG ~800Da. Cabe destacar que este polímero fue modelado junto a las puntas de maleimida para obtener directamente los parámetros del enlace que se forma con este reactivo.

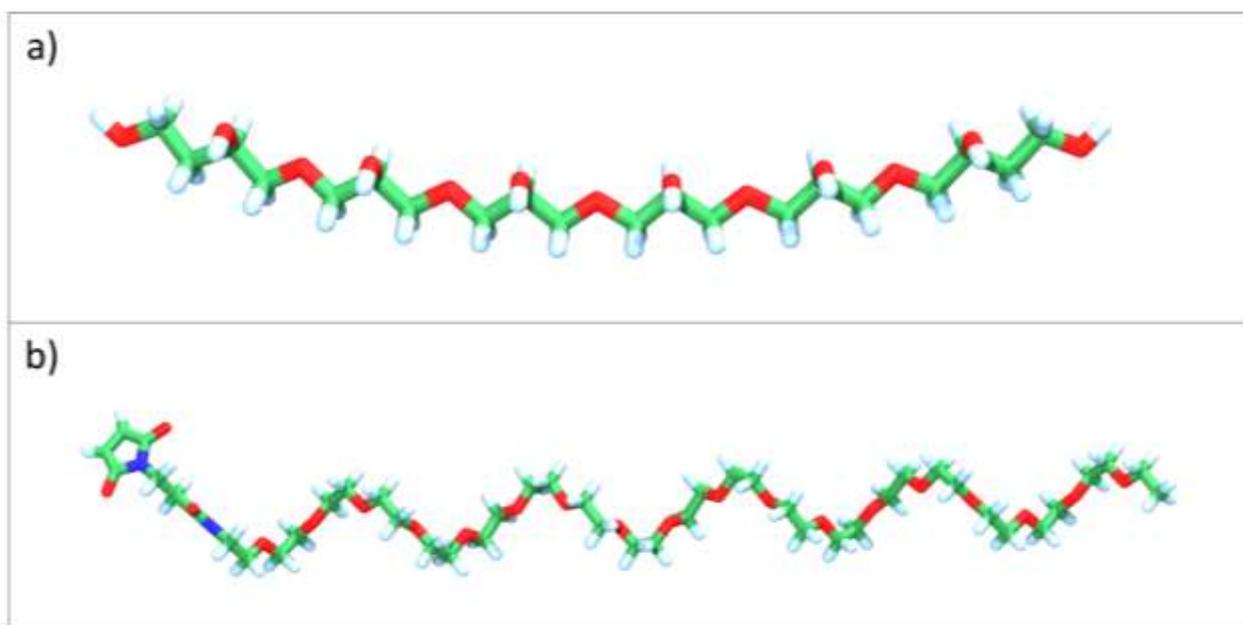


Figura 17. Representación en 3D de moléculas generadas. a) Molécula de Hexaglicerol. B) Cadena de polietilenglicol con un extremo (izquierdo) unido a la molécula de maleimida.

7.2 Modelado de péptido tipo colágeno

Para generar el modelo del péptido a utilizar, se realizó un modelado por homología, utilizando el péptido CLP1 como templado. Lo anterior se realizó con el software SWISS-MODEL el cual se especializa en realizar modelos de estructura por homología, mediante un procesamiento automatizado a través de su servidor online.

Dentro de las opciones que dispone esta herramienta, se utilizó la que permite realizar el modelo con un templado que el usuario puede subir a la plataforma, además de la secuencia del péptido de interés (NH₂-GC(GPP)₈GGCG-OH). Se utilizó el tripéptido GPP ya que muchos algoritmos para modelado por homología no cuentan con los parámetros para realizar un modelo que contenga hidroxiprolina.

Los resultados arrojaron una estructura muy similar a CLP1 a nivel estructural, mientras que la identidad de secuencia del modelo fue de un 79.31%, mediante una cobertura de 0.97.

Cabe destacar que la prolina fue posteriormente reemplazada por hidroxiprolina utilizando los archivos de parámetros para este aminoácido en particular, así, se pudo obtener el archivo de conectividad, que contempla la estructura del péptido de interés, y logrando obtener los archivos necesarios para la ejecución de las dinámicas moleculares.

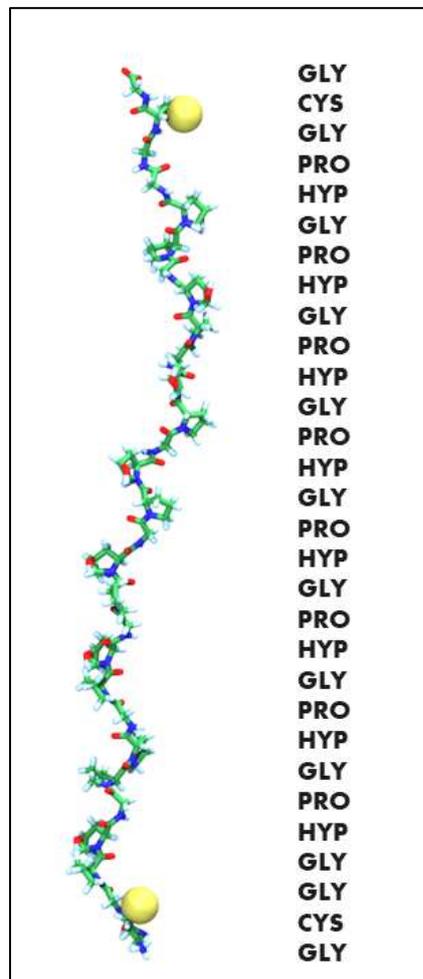


Figura 18. Representación 3D y secuencia del péptido a utilizar. Se destacan los residuos de cisteína en amarillo.

7.3 Generación de modelos conjugados péptido-polímero

Con la obtención individual de las estructuras de hexaglicerol, PEG-Mal y el péptido, es posible ensamblar y construir los sistemas de interés en sus distintas concentraciones. No obstante, anterior a lo mencionado, se debe conectar el “core” a los 8 brazos de PEG-Mal. Para esto, en primer lugar se dispusieron 8 copias del polímero PEG-Mal utilizando el software Packmol (Martínez *et al.*, 2009) y ubicándolos cercano a los enlaces correspondiente de la molécula de hexaglicerol, todo esto generando un único archivo de coordenadas.

Posteriormente, se trabajó en un archivo de coordenadas, creando los “patches” que unen los 8 brazos a cada uno de los enlaces que otorga el hexaglicerol, químicamente se produce un proceso de etoxilación, se libera un oxígeno en los diferentes grupos -OH de la cadena de hexaglicerol, para unirse a la cadena hidratada del polietilenglicol. Lo anterior, se realizó traspasando las cargas correspondientes a los nuevos átomos que se forman, para mantener el sistema a generar con carga neta cero.

Finalmente, en el script para generar el archivo de conectividad, se crearon los segmentos correspondientes, diferenciados por una letra, para cada una de las cadenas de PEG-Mal, y otro adicional para el “core” de hexaglicerol. Estos segmentos son posteriormente llamados en el mismo script y sirven para diferenciar una conexión de otra, evitando que una misma molécula se una a un enlace que ya está conectado a una cadena de polímero. Como se observa en el apartado c de la figura 19, se le ordena al script que se genere la unión entre cada segmento, generando así la conectividad entre estas moléculas, donde el segmento A correspondiente a la molécula de Hexaglicerol, se conecta con cada uno de los otros segmentos.

```

a) PRES PEG1      0.00 ! linkage for IMAGES or for joining segments
      ! 1 refers to previous molecule
      ! 2 refers to next molecule
      ! use in a patch statement
      ! follow with AUTOgenerate ANGLES DIHEdralS command

BOND 101 2C45
GROUP
ATOM 101 OG301  -0.232 !
GROUP
ATOM 2C45 CG321  -0.179 !
ATOM 2H83 HGA2   0.09 !
ATOM 2H84 HGA2   0.09 !
DELETE ATOM 1H1
DELETE ATOM 2H82
AUTO ANGLES DIHE

b) set A [atomselect top "chain A"]
    ${A} writepdb tmp1A.pdb
    segment A {first NONE; last NONE; pdb tmp1A.pdb;}
    coordpdb tmp1A.pdb A
    guesscoord
    set B [atomselect top "chain B"]
    ${B} writepdb tmp1B.pdb
    segment B {first NONE; last NONE; pdb tmp1B.pdb;}
    coordpdb tmp1B.pdb B
    guesscoord
    set C [atomselect top "chain C"]
    ${C} writepdb tmp1C.pdb
    segment C {first NONE; last NONE; pdb tmp1C.pdb;}
    coordpdb tmp1C.pdb C
    guesscoord

c) patch PEG1 A:1 B:1
    patch PEG2 A:1 C:2
    patch PEG3 A:1 D:3
    patch PEG4 A:1 E:4
    patch PEG5 A:1 F:5
    patch PEG6 A:1 G:6
    patch PEG7 A:1 H:7
    patch PEG8 A:1 I:8

```

Figura 19. Proceso de “patch” de moléculas. a) Generación del “patch” en archivo de parámetros, donde se conectan y eliminan los átomos involucrados. b) Ejemplo de generación de segmentos a unir. c) Unión de segmentos que involucran los átomos a conectar según a).

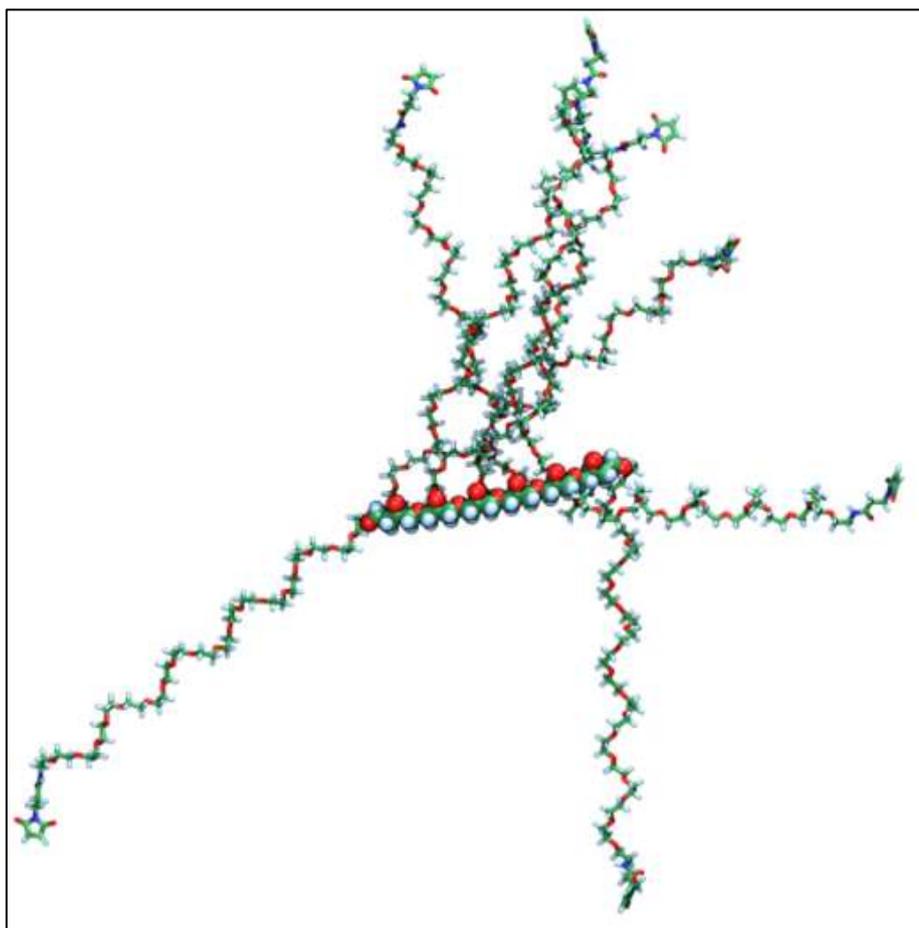


Figura 20. Estructura ensamblada de 8PEG-Mal. Se representa el “core” correspondiente a la molécula de hexaglicérol en VDW.

En la Figura 20, se muestra una conformación representativa del sistema ya conectado y es la base para construir las distintas concentraciones del hidrogel funcionalizados con péptidos. Para unir el péptido a la maleimida se siguió la misma lógica anterior, en este caso mediante la formación de un enlace tioéter (ver figura 21) entre el azufre de la cisteína del péptido y uno de los oxígenos provenientes de la maleimida. Se liberó uno de los hidrógenos del azufre, mientras que el Oxígeno del agente reactivo deja de poseer un doble enlace para poder otorgarle uno de ellos a la unión del péptido. A su vez, se deben controlar las cargas de los nuevos átomos, como de aquellos que se perdieron o cambiaron, comprobando posterior al ensamble del sistema, mediante la tkconsole de VMD, que mantuvieran una carga neta 0.

Finalmente, se prepararon los sistemas según las concentraciones presentadas en 5.0.1, replicándolos con Packmol cuando fuese necesario y generando los parches correspondientes.

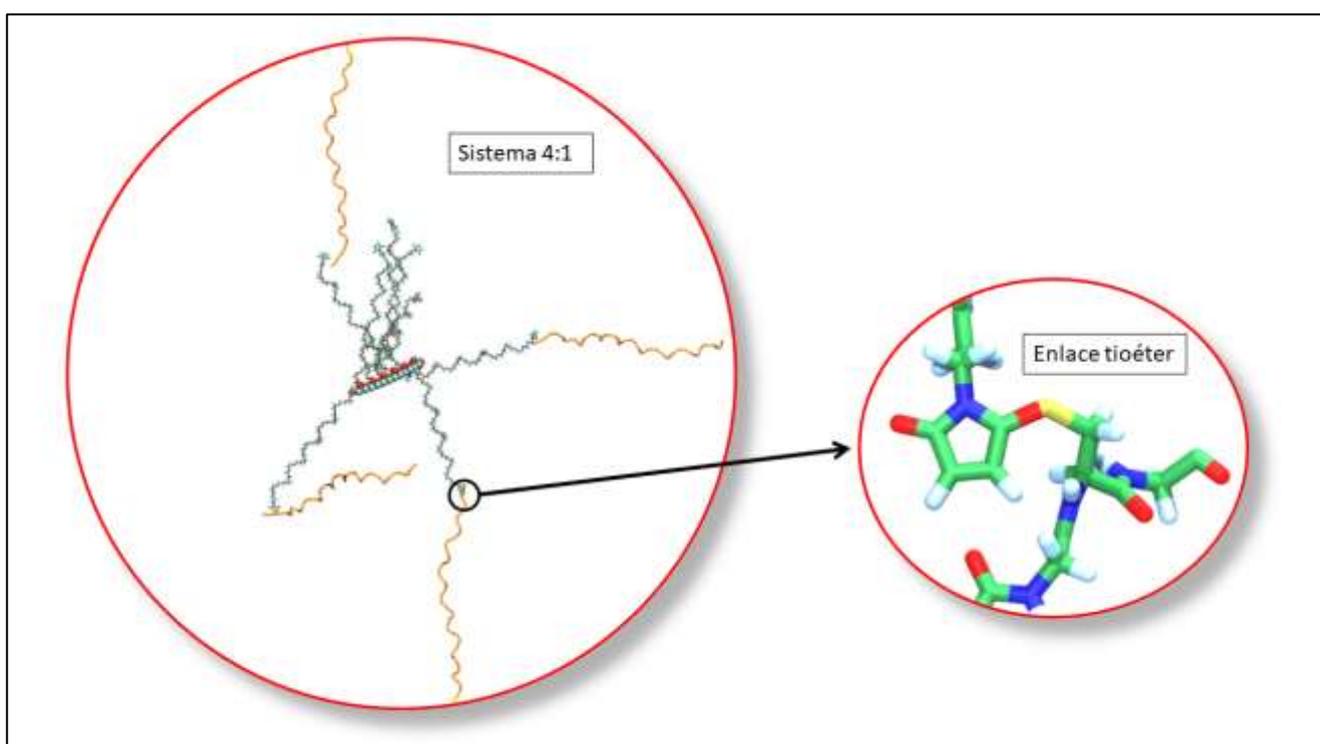


Figura 21. Sistema ensamblado en la razón 4:1 (Péptido:8PEG-Mal). Se destaca un acercamiento a la unión entre el residuo de cisteína del péptido y el Oxígeno del anillo de la molécula de maleimida (enlace tioéter).

8. Dinámica molecular con solvente explícito

8.1 Ejecución de dinámica molecular a gran escala de tiempo.

Como se observa en la Figura 21 los sistemas tienen una extensión que supera los 100 Å, lo que haría que, solvatados, generen una caja de agua con una gran cantidad de moléculas y por ende simulaciones moleculares más costosas a nivel computacional, que extendería los cálculos por semanas. Para amortiguar los tamaños del sistema, en primer lugar, se realizaron DM sin presencia de ningún solvente, para compactar los brazos de PEG-Mal. Como se observa en la figura 22, con poco tiempo de simulación los sistemas se compactaron. Mas en detalle, el sistema de proporciones 4:1, redujo su tamaño posterior a su compactación, en aproximadamente 150 Å, lo que, para los sistemas 8:2 y 10:3, contempla una reducción aún más relevante, permitiendo optimizar las cajas de solvatación a realizar posteriormente.

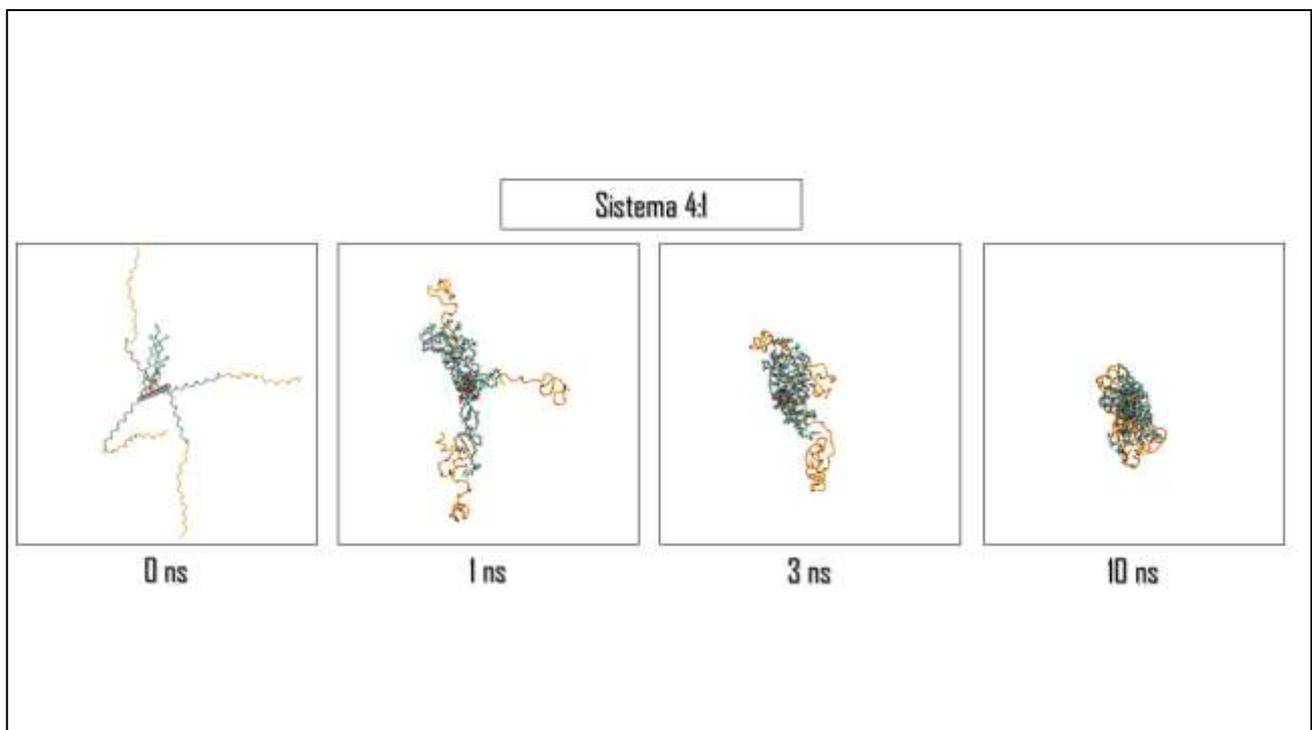


Figura 22. Cambio conformacional durante la trayectoria sin presencia de solvente en sistema con proporciones 4:1. De izquierda a derecha, se observa como a través del tiempo el sistema se va compactando.

La conformación final de la DM en vacío fue rescatada y con ello los sistemas fueron solvatados, para el caso del sistema 2:1 en una caja de agua de 60x60x60 Å, en el caso de 4:1, de 74x74x74 Å, 8:2 con un tamaño de 92x92x92 Å (ver Figura 23) y el sistema 10:3 siendo de 102x102x102 Å, la cantidad de átomos en estos cuatro sistemas varía de los 20.000 hasta los 80.000 aproximadamente, valores que permiten obtener grandes escalas de tiempo con los recursos computacionales disponibles. La totalidad de los sistemas, posterior a ser neutralizados con iones de NaCl, fueron minimizados por 20.000 pasos, y la producción de datos se realizó durante 500 ns usando el software NAMD2.

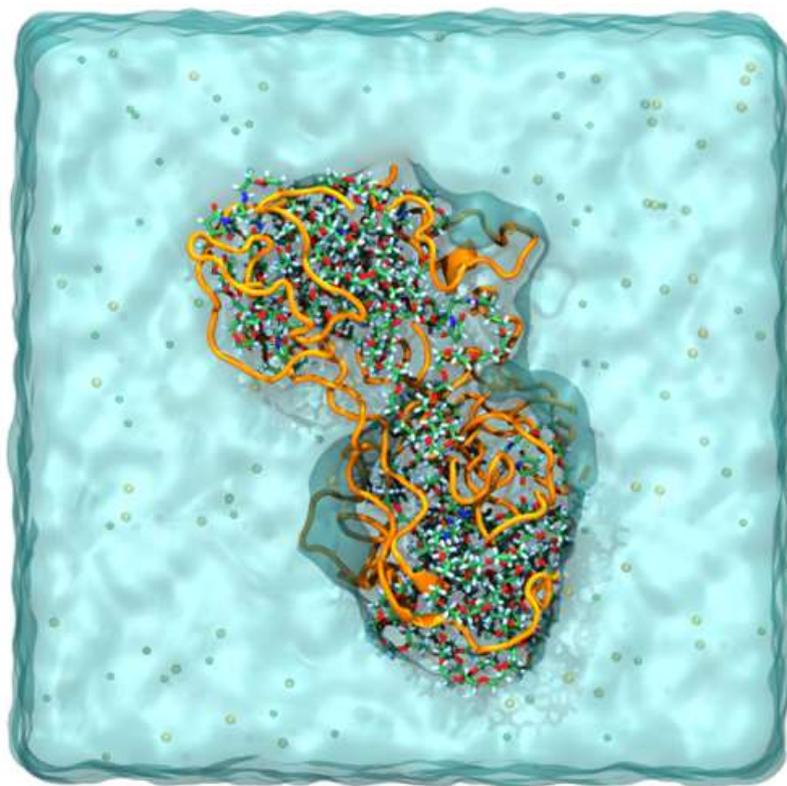


Figura 23. Sistema en la razón 8:2 (Péptido:8PEG-Mal), solvatado y neutralizado con iones de NaCl. En naranja se destacan mediante la representación NewCartoon, los péptidos del sistema.

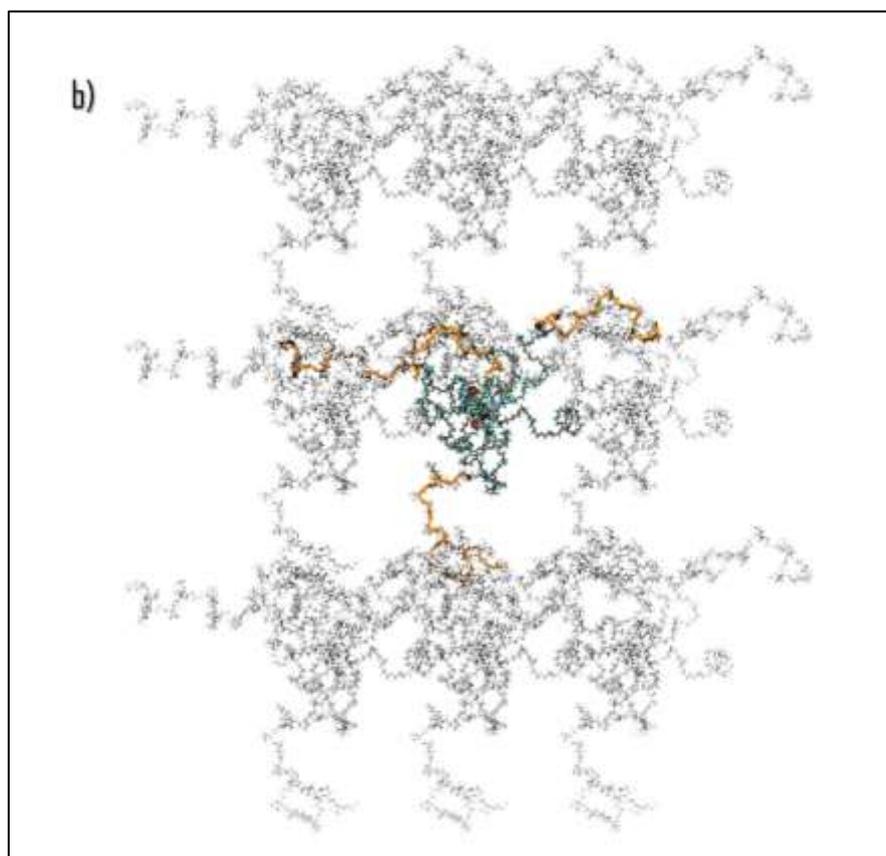
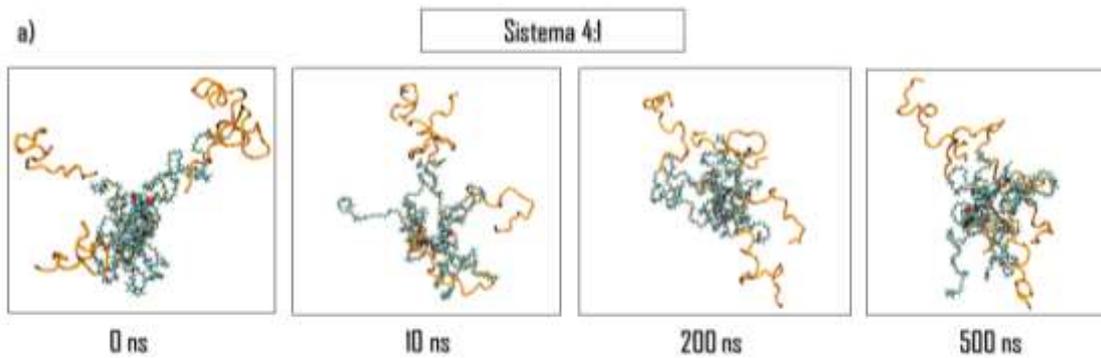


Figura 24. Análisis conformacional de sistema 4:1. a) Cambio conformacional a través del tiempo en sistema 4:1. b) Conformación final del sistema en a) e imágenes periódicas de éste en difuminado blanco que demuestra la interacción entre un sistema y otro.

8.2 Análisis conformacional de las estructuras obtenidas.

En la figura 24 se observa la “descompactación” del sistema de razón 4:1. En este sistema en particular se tomaron dos conformaciones en vacío, siendo la que se muestra en la figura a los 0 ns la adoptada para solvatar el sistema y luego ejecutar la DM a gran escala de tiempo. Esto permitió que, como se observa en el apartado b de esta misma figura, se dé una interacción que se observa durante gran parte de la trayectoria, gracias a la libertad que toman los diferentes brazos de PEG-Mal y principalmente aquellos unidos al péptido, entre sus cajas periódicas. La existencia de las condiciones periódicas de borde significa que cualquier átomo que sale de su cuadro de simulación a través de alguno de los límites del mismo, reaparecerá del lado opuesto (Yu & Dalby, 2020). Lo anterior, ocurre en los diferentes sistemas ejecutados, y visualmente representa una red de hidrogel ordenada. Cabe destacar que las imágenes periódicas son netamente a nivel de visualización mediante VMD, lo que nos llevó a preparar y realizar los cálculos de los sistemas en el siguiente punto.

9. Dinámica molecular con sistemas replicados tridimensionalmente y a diferentes valores de presión.

9.1 Generación de sistemas replicados en los 3 ejes.

Luego de observar el contacto que existe entre los sistemas con sus imágenes periódicas (en sus diferentes concentraciones) y para obtener una mejor visualización de dicha interacción, se utilizó un script en TCL que permite replicar cada sistema en cada uno de los ejes geométricos. Para estos efectos se utilizaron solo los sistemas con la razón 2:1 y 4:1, además de un sistema sin presencia de péptidos. Los sistemas anteriores se decidieron considerando los tiempos de simulación que se pueden ejecutar, en base a que la cantidad de átomos va a aumentar aproximadamente 9 veces.

Para el caso del sistema sin péptidos, como para el sistema con 2 péptidos, se replicaron a una razón de 3:3:3, correspondiente a los ejes x:y:z. Para reducir la cantidad de átomos de agua, la solvatación de estos sistemas fue con una caja no cúbica, utilizando el plugin Solvate de VMD, el cual permite rotar la molécula a una conformación en la cual el número de moléculas de agua finales sea menor.

Para el sistema sin presencia de péptido, el número total de átomos fue de ~264.000, mientras que para el sistema con 2 péptidos fue de ~647.000. Por otro lado, el sistema 4:1 se replicó solamente en la razón 3:3, siguiendo la misma lógica para la solvatación, resultando en una totalidad de ~693.000 átomos para este sistema. En la figura 25 se muestra un ejemplo de cómo se visualizan los sistemas posteriores a la ejecución del script.

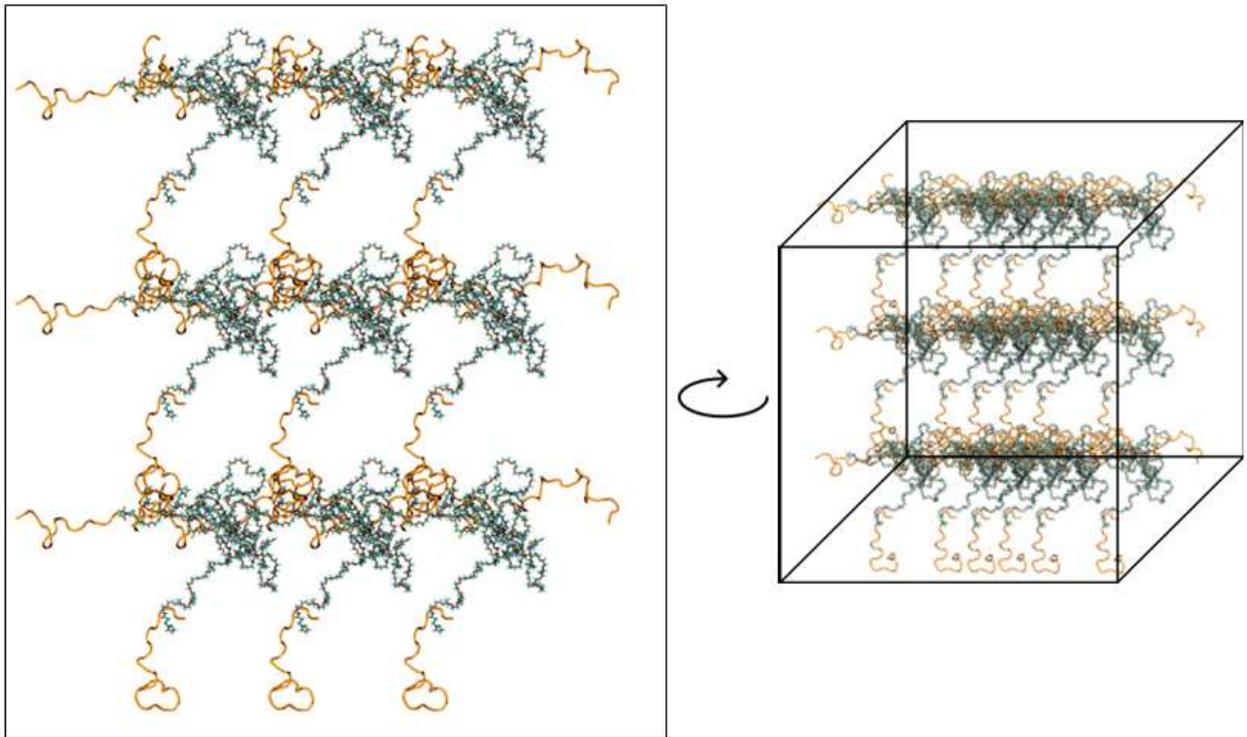


Figura 25. Representación 3D del sistema 4:1 replicado en dos ejes.

9.2 Ejecución de dinámica molecular a 0.2, 1, 5 y 10 atmósfera.

Con los sistemas armados se escogieron 4 diferentes valores de presión inicial para las dinámicas moleculares, lo anterior tomando en cuenta que los hidrogeles regularmente son sometidos a niveles de estrés o tensión (medido en Pascales o atmósfera), para así poder estudiar el comportamiento de estos. Según Vedadghavami y cols. la ECM, y componentes de ella, como el colágeno, están diseñados para soportar una rigidez que abarca entre los 1 y 100 kPa (siendo 100 kPa equivalente a 0,98 atm), por lo que un rango entre los 0.2 y 10 atmósfera resultan ser suficientes para poder analizar el comportamiento que pueden tomar y el impacto que tienen las concentraciones de los diferentes sistemas. Los 3 tipos de sistemas, a los 4 valores de presión se minimizaron por 20.000 pasos y se ejecutaron 50 ns de producción de datos utilizando NAMD3 (Phillips *et al.*, 2005).

9.3 Análisis conformacional de PEG-Péptido en valores de energía a diferente presión inicial.

Con el objetivo de observar el comportamiento mecánico de los sistemas en sus diferentes concentraciones y valores de presión, se realizó un análisis a sus peaks de energía libre durante toda la trayectoria. Para ello se filtró el archivo de salida de NAMD que contiene los valores de energía, el cual es guardado cada 10.000 pasos, de un total de 12.500.000, correspondientes a los 50 ns de producción de datos.

Estos valores de energía fueron graficados mediante un histograma para observar los valores más frecuentes, lo anterior para cada uno de los 3 sistemas, a los 4 valores de presión distinto. Obteniendo el peak energético en cada caso, se obtuvieron gráficos de presión vs energía, los cuales se observan en la figura 26.

Peaks de energía a diferente presión

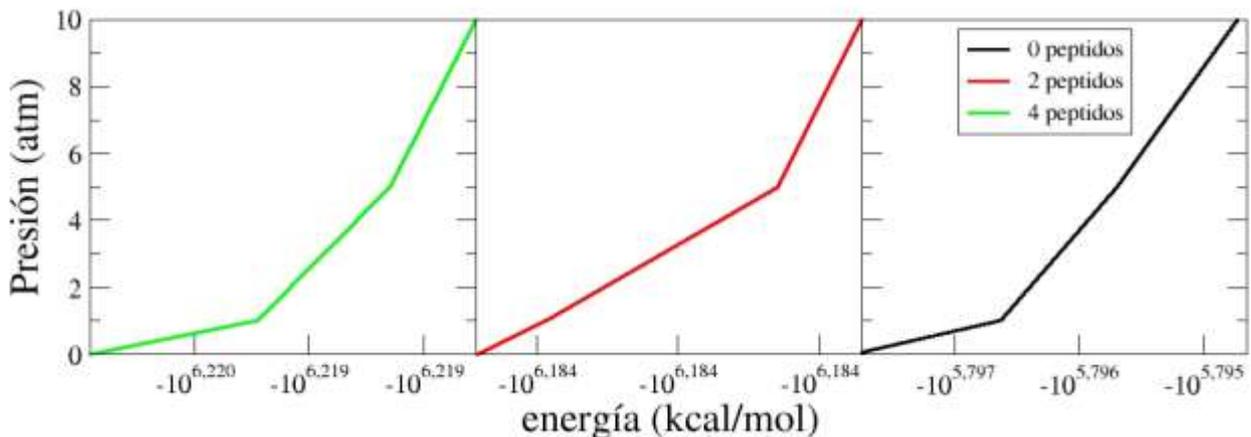


Figura 26. Gráfico de presión vs energía para los sistemas replicados, de izquierda a derecha, sistema 4:1, 2:1 y sistema sin péptidos.

En detalle, la figura 26 muestra que, a presiones menores, todos los sistemas muestran una menor energía interna, lo cual se puede interpretar como un sistema “más estable” estructuralmente, pero sin embargo se muestra como un punto de referencia energético. Por otro lado, también en la figura 26 se puede observar que a medida que la presión es aumentada, la energía interna de cada sistema tiende a aumentar o en términos de estabilidad, la energía tiende a ser menos negativa, lo que podría interpretarse como un sistema “menos estable”. Sin embargo, los rangos energéticos observados son distintos para cada sistema en estudio, mostrando que la presencia de mayor cantidad o proporción de péptidos aumenta la estabilidad del sistema en estudio, lo que da indicios de que el péptido cumple un rol de estabilización al interactuar de manera más eficiente con otros péptidos presentes en el entorno que conforman la red o matriz extracelular.

Adicionalmente y en términos mecánicos, los resultados anteriormente expuestos, proponen que la presencia de péptidos como componentes de hidrogeles aumentan la capacidad de soportar tensión de estos materiales, otorgando una alta capacidad elástica al biomaterial sintético.

9.4 Desviación cuadrática media (RMSD) y análisis conformacional.

Para interpretar correctamente los valores de energía interna previamente descritos, se realizaron análisis estructurales de todos los sistemas simulados. En la figura 27 se muestran los valores de RMSD de los 3 sistemas estudiados en este punto (sistema replicado sin péptidos y sistemas en la razón 2:1 y 4:1 replicados), tomando los dos valores extremos de presión utilizado, 0.2 y 10 atm.

Los cálculos de RMSD se realizaron con la herramienta de VMD "RMSD Trajectory Tool", en ella se alineó la estructura de PEG y/o péptidos, dependiendo el caso, respecto a su posición inicial, para posteriormente realizar el cálculo de RMSD correspondiente.

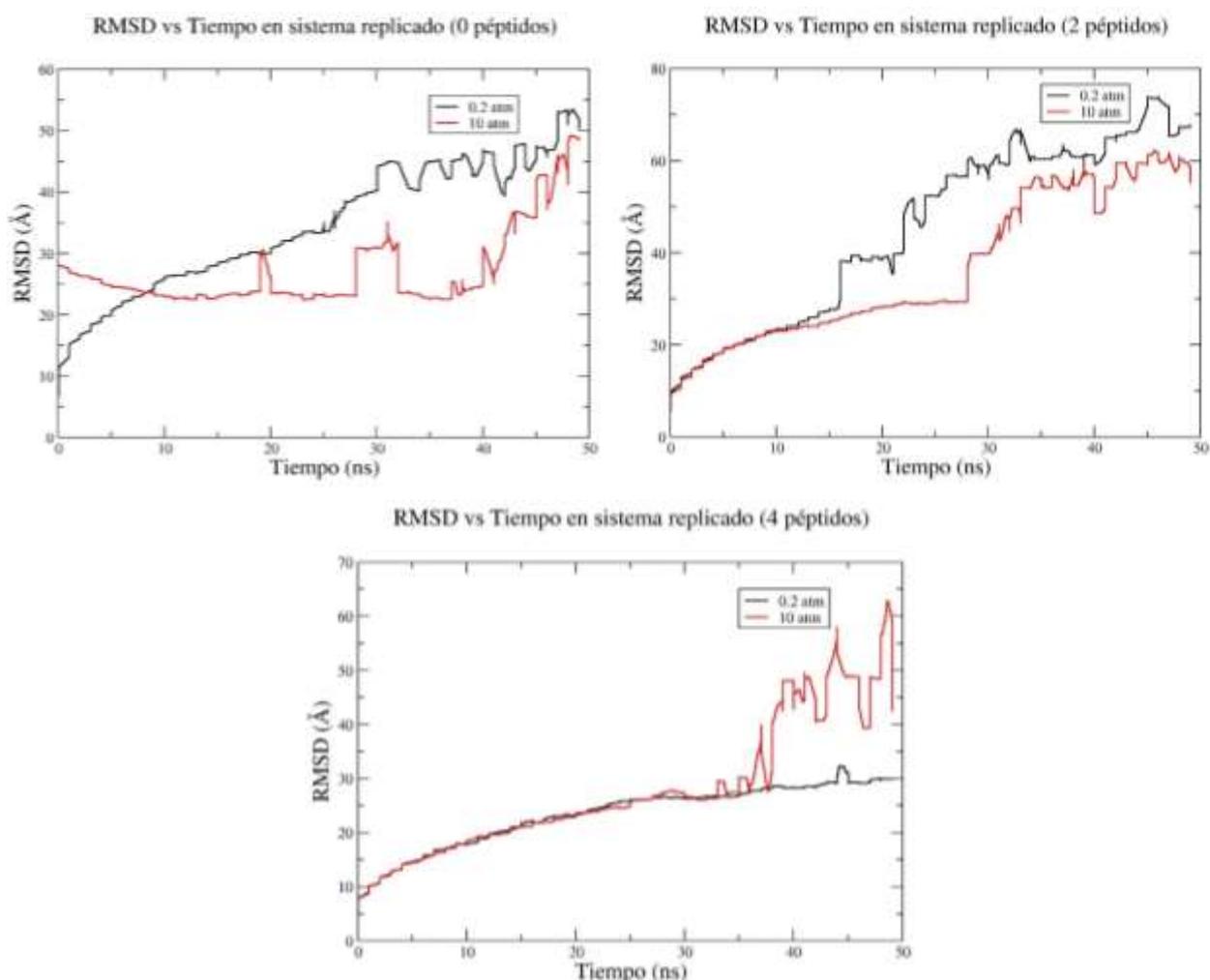


Figura 27. Gráficos de RMSD para el sistema sin péptido, 2:1 y 4:1 replicados, a valores de presión de 0.2 atm (línea negra) y 10 atm (línea roja), las curvas son un promedio de 1250 frames, representado en nanosegundos.

En base a lo anterior, es posible identificar una alta fluctuación en las curvas de RMSD para los sistemas con 0 y 2 péptidos, para ambos valores de presión. Mientras que existe una diferencia cuando aumenta la presencia de péptidos. Lo anterior se puede identificar en el gráfico correspondiente al sistema 4:1 replicado (figura 27). La estabilidad de la curva de RMSD es mucho más notoria, mostrando solo un leve peak a los 45 ns de la DM para las 0.2 atm de presión, mientras que la curva roja, a 10 atm de presión, presenta una mayor inestabilidad desde los 30 ns de la DM.

En conjunto a lo mencionado, y si bien existen valores altos de RMSD a través de la trayectoria (promediando variaciones de aproximadamente 30 Å entre todos los gráficos), el RMSD es menor para ambos valores de presión cuando la cantidad de péptidos en el sistema aumenta, lo que puede indicar que tanto la presencia de péptidos, y en particular el tripéptido GPO aporta un mayor ordenamiento y estabilidad estructural al hidrogel que se forma.

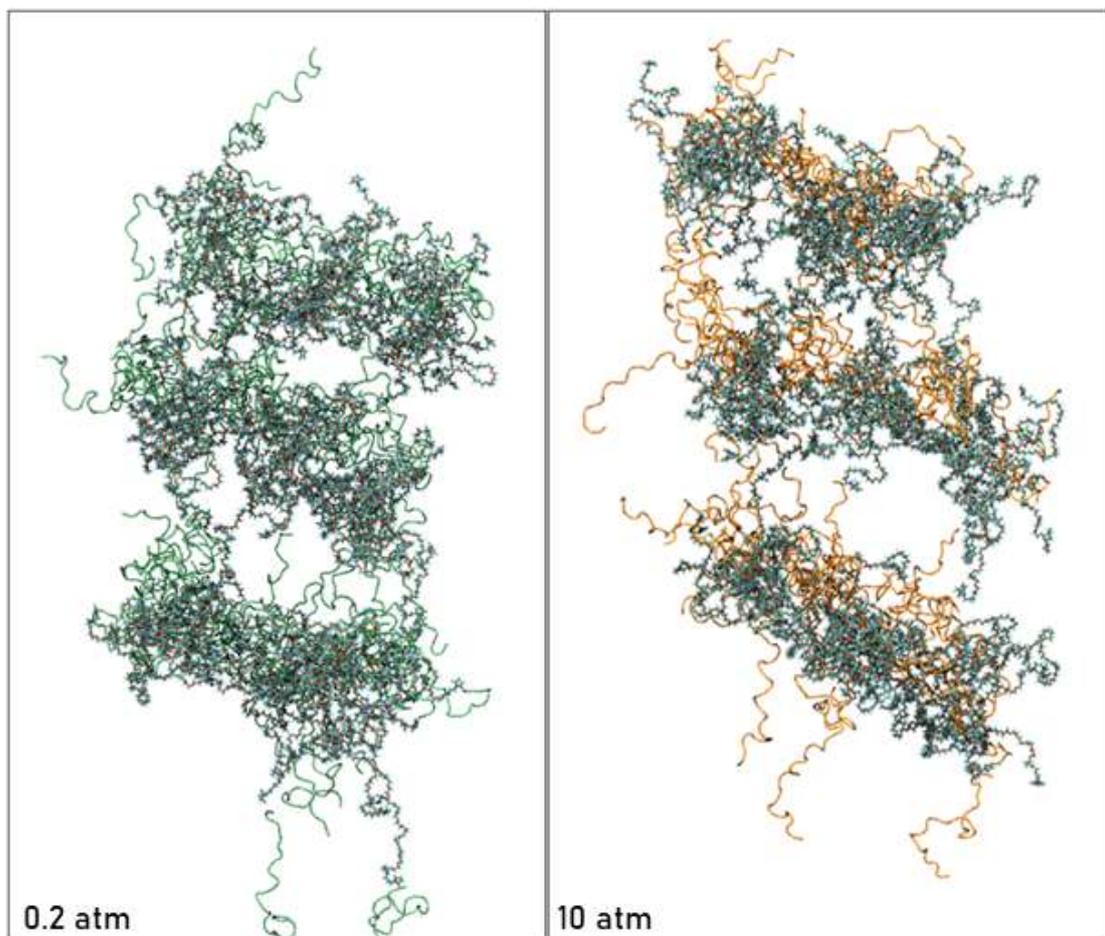


Figura 28. Estado conformacional a los 45ns de DM para el sistema 4:1 replicado a 0.2 y 10 atm.

A nivel estructural, se observa en la figura 28 una conformación representativa del sistema de razón 4:1 replicado, a los 45 ns de la DM. Se observa un sistema ligeramente más ordenado y matricial a una presión de 0.2 atm, mientras que, se observa un sistema poco estructurado y con un grado de compactación mayor cuando la presión es 10 atm.

9.5 Radio de giro

Con la finalidad de corroborar la resistencia de estos materiales al aumento de presión y tensión, se realizaron análisis de radio de giro a la trayectoria de dinámica molecular. Para los 3 casos de la figura 29 se calculó el radio de giro considerando todo el sistema, incluyendo las réplicas correspondientes generadas en el punto 9.

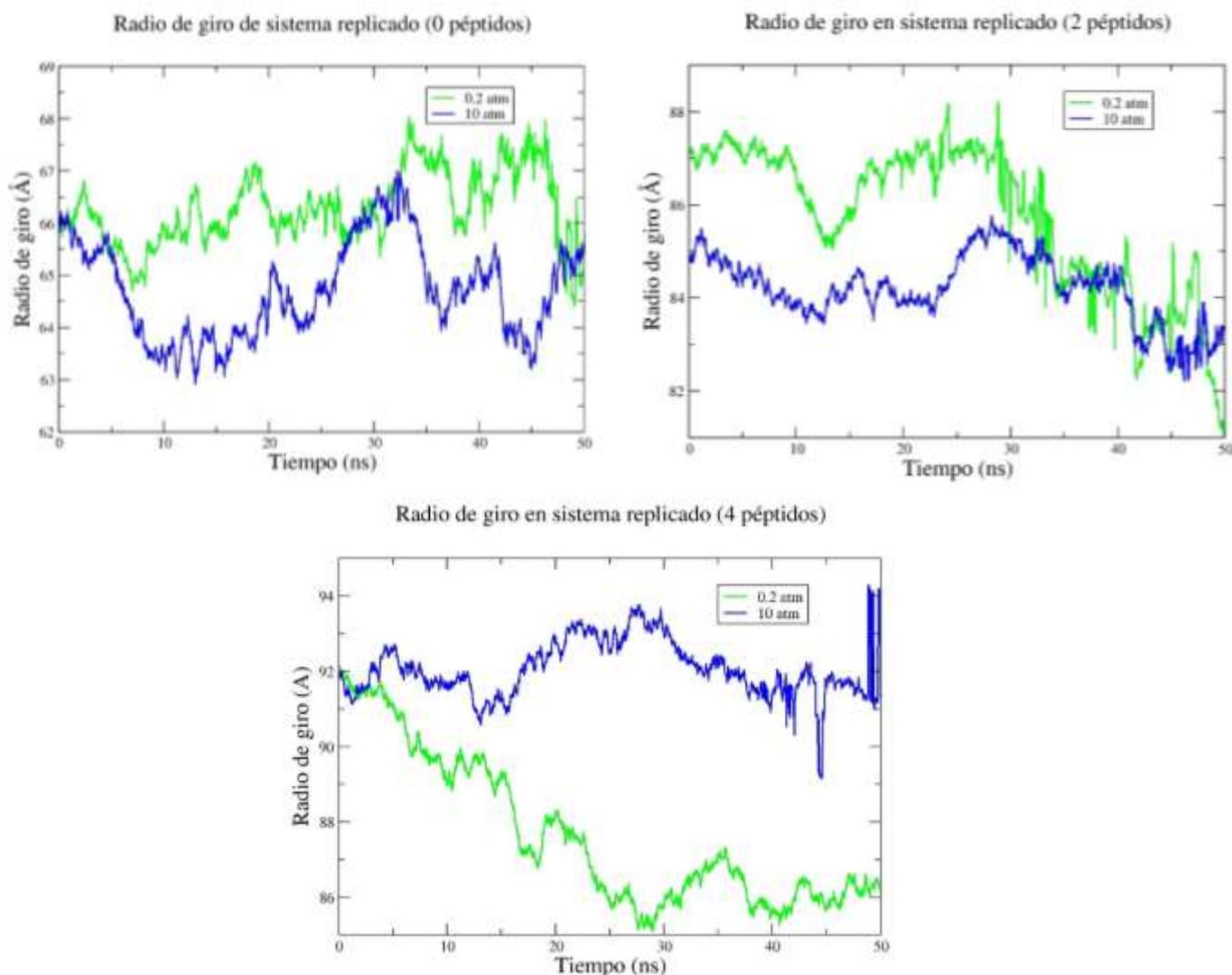


Figura 29. Radio de giro para el sistema sin péptidos, 2:1 y 4:1 replicados. En verde la curva para la DM a 0.2 atm y en azul para las 10 atm.

Considerando que el radio de giro nos indica el nivel de compactación que experimenta un sistema, se observa una mayor compactación en los sistemas a 10 atm (curva azul en los gráficos de la figura 29), por ende, una tendencia más esférica en los sistemas, mientras que aquellos a menor presión, tienen un radio de giro superior, 1 Å para el sistema sin péptidos, 6 Å para el sistema 2:1 y 6 Å para el sistema 4:1.

Lo anterior, nos lleva a concluir que el estado menos compacto que arrojan los cálculos indica que los sistemas a menor presión tienden mantener una conformación más matricial que esférica.

9.6 Análisis de función de distribución radial para sistemas con presencia de péptidos

Con el objetivo de observar la dispersión y distribución de los distintos componentes de estos hidrogeles, específicamente de los sistemas en razón 2:1 y 4:1, replicados, se realizó un análisis utilizando la función de distribución radial para 3 estados de la DM, tanto a los 0 ns, 25 ns y 50 ns de simulación. Para estos cálculos, las curvas fueron obtenidas utilizando dos selecciones. La primera corresponde al sistema central y la segunda corresponde a los PEG o Péptidos de las réplicas restantes en cada sistema, para así medir la distribución de átomos cercanos al sistema central (primera selección).

En la figura 30 se observan las diferencias en las curvas de RDF a los diferentes tiempos de simulación para la comparación entre el sistema central y los PEG de las réplicas (gráficos a la izquierda), como también la comparación contra los péptidos de las réplicas (gráficos centrales y a la derecha). Se muestra como ejemplo el gráfico de la razón 2:1 con su sistema central frente a los polímeros de sus réplicas y se repite la misma tendencia para la razón 4:1 (gráfico no se presenta), en donde los valores más altos de $g(r)$, por ende, de observar una distribución cercana de cadenas de PEG al sistema central, se encuentran a distancias que rodean los 40 y 60 Å.

Interpretando los gráficos centrales y de la derecha (figura 30), se observa que la distribución de péptidos cercana al sistema central cuando la presión ejercida es de 0.2 atm tiene un valor de 0.025 $g(r)$ a los 50 ns de la DM (gráfico central superior en razón

2:1), siendo esta superior al valor de presión mayor (grafico central inferior) mientras que, para ambos valores de presión en el sistema 4:1, al final de la trayectoria, el valor de $g(r)$ es prácticamente igual, alcanzando los 0.05 $g(r)$ (gráficos a la derecha). La similitud en los valores para el sistema 4:1 puede deberse a que, para este tipo de análisis en particular, la cantidad de péptidos influye más que la presión ejercida entre un sistema u otro.

No obstante, los gráficos nos dicen que las distancias interatómicas tienen una mayor probabilidad de encontrarse cercanas cuando evaluamos el sistema central frente a los péptidos del resto del sistema, teniendo máximos de $g(r)$ entre los 4 y 5 Å para los gráficos centrales y a la derecha de la siguiente figura, a diferencia de la evaluación de los polímeros frente al sistema central, donde los máximos de $g(r)$ se dan a distancias que como mínimo superan los 15 Å.

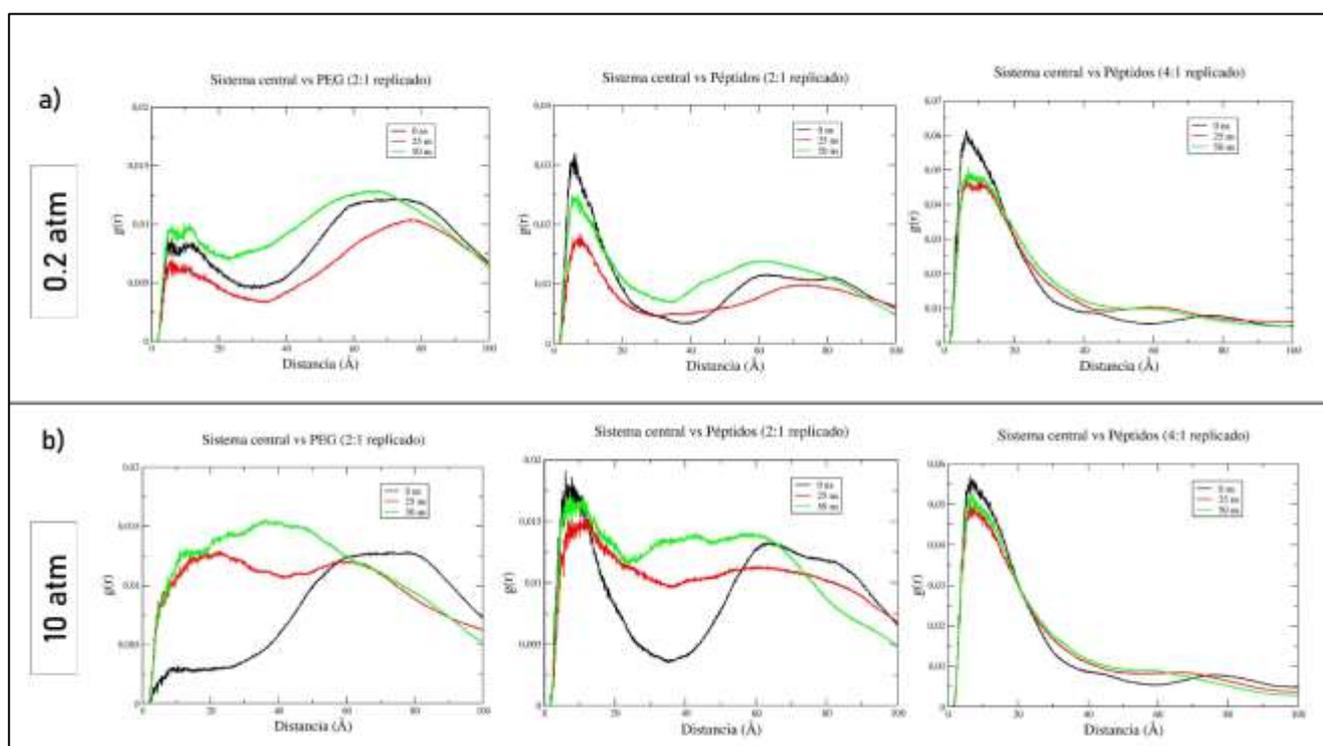


Figura 30. Análisis de RDF para sistemas 2:1 y 4:1 replicados a 0.2 atm (a) y 10 atm (b). Líneas negras indican la curva a 0 ns, línea roja a 25 ns y línea verde a 50 ns.

9.7 Propuesta de protocolo para el estudio de sistemas poliméricos funcionalizados con péptidos.

Como resultado final de este proyecto de tesis, se presenta por primera vez un protocolo que resume los principales y más relevantes hitos utilizados para estudiar matrices basadas en hidrogeles. Utilizando este protocolo fue posible generar, ensamblar, simular y analizar los sistemas propuestos. Con miras al estudio de otros sistemas, es posible utilizar el protocolo de la figura 31 para obtener estructuras tridimensionales y parámetros mecánicos de biomateriales basados en polímeros y péptidos.

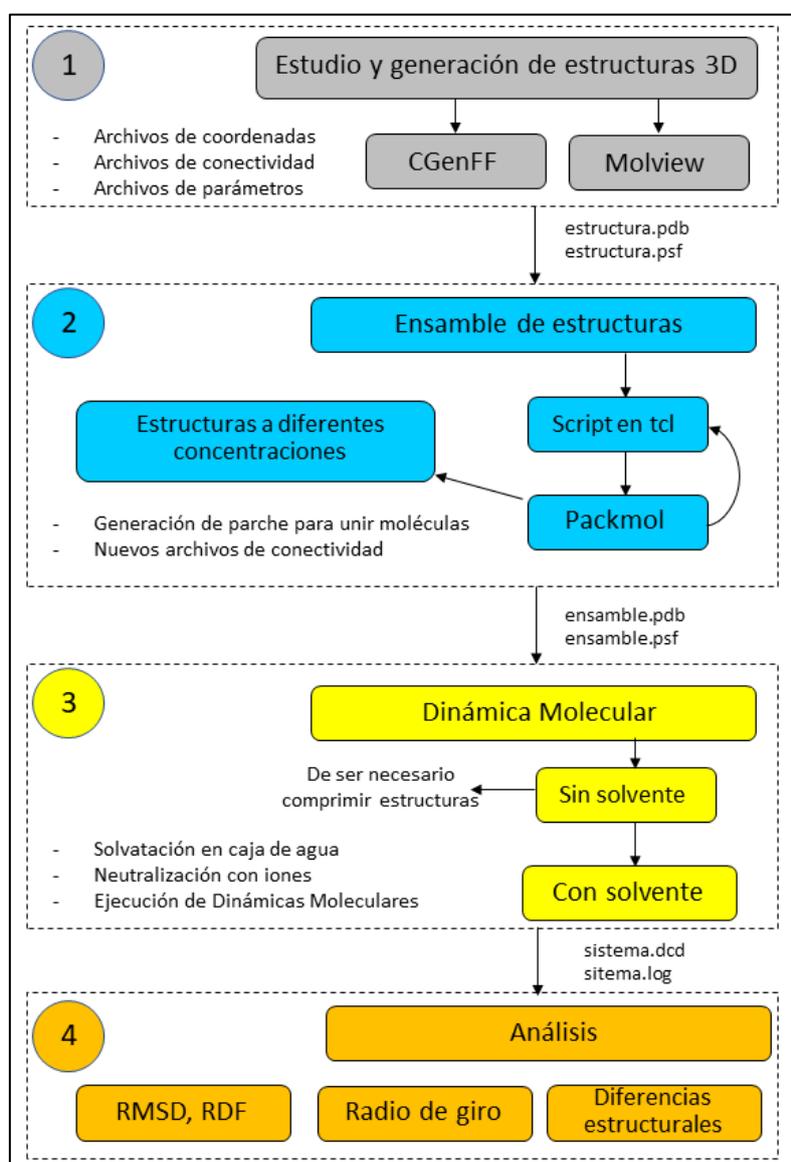


Figura 31. Propuesta de protocolo para el estudio de sistemas poliméricos funcionalizados con péptido.

10. Conclusiones

Los avances en el modelamiento de péptidos y la obtención de estructuras tridimensionales mediante herramientas computacionales son alternativas viables que permiten evaluar diferentes estructuras. Si bien no existían modelos *in silico* para los tipos de hidrogeles presentados en este trabajo, se creó un protocolo computacional ocupando herramientas actualmente disponibles para construir y simular el comportamiento dinámico de biomateriales. Así fue posible elucidar el comportamiento de matrices de hidrogeles y el entrecruzamiento que existe a nivel molecular cuando la proporción de estas aumenta.

En concreto, apuntando a los resultados obtenidos en esta investigación, es posible argumentar que las diferencias en factores mecánicos de todas las estructuras simuladas están directamente relacionadas con la composición del material y la cantidad de péptidos y/o polímeros en su estructura. Dicha composición será crucial para obtener un material que posea una característica más elástica y/o que resista una mayor tensión, según sea necesario. Rangos de presión entre los 0.2 y 10 atmósfera fueron probados para los sistemas sin péptidos, tanto como para los que tienen 2 y 4 péptidos, en donde el menor valor de presión refleja un menor estrés que experimenta el hidrogel, por lo que su conformación resulta ser más cómoda a nivel energético. Sin embargo, hay que destacar que, centrándonos en el mayor valor de presión utilizado, el sistema que mostró mejor tolerancia a este estrés fue el que poseía la mayor cantidad de péptidos.

Sumado a lo anterior, el empaquetamiento característico del tripéptido GPO presente en los péptidos de tipo colágeno, como aquel utilizado en este estudio, aportan a la formación y estabilidad de la matriz de hidrogel a medida que aumenta la concentración de péptido, sin embargo, las interacciones puntuales como también el plegamiento que podrían alcanzar múltiples péptidos aún deben ser exploradas en profundidad.

A su vez, los análisis de radio de giro dan luces de la compactación que tienen los diferentes sistemas, siendo esta menor cuando la presión a la que se someten los hidrogeles también es menor, lo que indica que la matriz se mantiene a través del tiempo de mejor manera, lo cual está de acuerdo con los análisis energéticos y de RMSD.

Finalmente, el protocolo creado para este trabajo de tesis es posible de replicar para otros sistemas que no han sido explorados a nivel estructural o para aquellos de los que no existe mucha información disponible, sin embargo, los softwares y repositorios de la actualidad, mediante los diferentes pasos implementados en este trabajo, pueden llevar a resultados y análisis concretos de estructuras complejas con miras en el modelado computacional de biomateriales morfológicamente racionales, con aplicaciones médicas.

Referencias

- Ahmed EM (2015) Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* 6:105–121.
- Alarcon EI & Ahumada M eds. (2019) *Nanoengineering Materials for Biomedical Uses*. Springer International Publishing.
- Alarcon EI, Pobleto H, Roh H, Couture J-F, Comer J & Kochevar IE (2017) Rose Bengal Binding to Collagen and Tissue Photobonding. *ACS Omega* 2:6646–6657.
- Anseth KS, Bowman CN & Brannon-Peppas L (1996) Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials* 17:1647–1657.
- Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M & Rizzolio F (2019) The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Mol Basel Switz* 25.
- Bergwerf H (2015) MolView: an attempt to get the cloud into chemistry classrooms.
- Berrier AL & Yamada KM (2007) Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213:565–573.
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Gallo Cassarino T, Bertoni M, Bordoli L & Schwede T (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 42:W252–258.
- Birch HL (2018) Extracellular Matrix and Ageing. *Subcell Biochem* 90:169–190.
- Boffito M, Sartori S & Ciardelli G (2014) Polymeric scaffolds for cardiac tissue engineering: requirements and fabrication technologies. *Polymer International* 63:2–11.
- Boonstra S, Onck PR & van der Giessen E (2016) CHARMM TIP3P Water Model Suppresses Peptide Folding by Solvating the Unfolded State. *J Phys Chem B* 120:3692–3698.
- Brooks BR, Brooks CL, MacKerell AD, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, Won Y, Archontis G, Bartels C, Boresch S, Caflisch A, Caves L, Cui Q, Dinner AR, Feig M, Fischer S, Gao J, Hodoscek M, Im W, Kuczera K, Lazaridis T, Ma J, Ovchinnikov V, Paci E, Pastor RW, Post CB, Pu JZ, Schaefer M, Tidor B, Venable RM, Woodcock HL, Wu X, Yang W, York DM & Karplus M (2009) CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J Comput Chem* 30:1545–1614.
- Bumbaca B, Li Z & Shah DK (2019) Pharmacokinetics of protein and peptide conjugates. *Drug Metab Pharmacokinet* 34:42–54.
- Chen J & Zou X (2019) Self-assemble peptide biomaterials and their biomedical applications. *Bioact Mater* 4:120–131.
- Collier TA, Piggot TJ & Allison JR (2020) Molecular Dynamics Simulation of Proteins. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2073:311–327.
- Corbo C, Molinaro R, Tabatabaei M, Farokhzad O & Mahmoudi M (2017) Personalized protein corona on nanoparticles and its clinical implications. *Biomater Sci* 5:378–387.
- Digiacoimo L, Pozzi D, Palchetti S, Zingoni A & Caracciolo G (2020) Impact of the protein corona on nanomaterial immune response and targeting ability. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology* 12:e1615.
- Dong Y, Hong M, Dai R, Wu H & Zhu P (2020) Engineered bioactive nanoparticles incorporated biofunctionalized ECM/silk proteins based cardiac patches combined

- with MSCs for the repair of myocardial infarction: In vitro and in vivo evaluations. *Sci Total Environ* 707:135976.
- Greenwald RB, Choe YH, McGuire J & Conover CD (2003) Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv Drug Deliv Rev* 55:217–250.
- Gullberg DE & Lundgren-Akerlund E (2002) Collagen-binding I domain integrins--what do they do? *Prog Histochem Cytochem* 37:3–54.
- Herzberger J, Niederer K, Pohlit H, Seiwert J, Worm M, Wurm FR & Frey H (2016) Polymerization of Ethylene Oxide, Propylene Oxide, and Other Alkylene Oxides: Synthesis, Novel Polymer Architectures, and Bioconjugation. *Chem Rev* 116:2170–2243.
- Holzappel BM, Reichert JC, Schantz J-T, Gbureck U, Rackwitz L, Nöth U, Jakob F, Rudert M, Groll J & Hutmacher DW (2013) How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv Drug Deliv Rev* 65:581–603.
- Hsin J, Arkhipov A, Yin Y, Stone JE & Schulten K (2008) Using VMD - An Introductory Tutorial. *Curr Protoc Bioinformatics* CHAPTER:Unit-5.7.
- Humphrey W, Dalke A & Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14:33–38, 27–28.
- Hutanu D (2014) Recent Applications of Polyethylene Glycols (PEGs) and PEG Derivatives. *Modern Chemistry & Applications* 02:undefined-undefined.
- Hynes RO (2004) The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol* 23:333–340.
- Islam MM, Ravichandran R, Olsen D, Ljunggren MK, Fagerholm P, Lee CJ, Griffith M & Phopase J (2016) Self-assembled collagen-like-peptide implants as alternatives to human donor corneal transplantation. *RSC Adv* 6:55745–55749.
- Jo S, Cheng X, Lee J, Kim S, Park S-J, Patel DS, Beaven AH, Lee KI, Rui H, Roux B, MacKerell AD, Klauda JB, Qi Y & Im W (2017) CHARMM-GUI 10 Years for Biomolecular Modeling and Simulation. *J Comput Chem* 38:1114–1124.
- Knight CG, Morton LF, Peachey AR, Tuckwell DS, Farndale RW & Barnes MJ (2000) The Collagen-binding A-domains of Integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ Recognize the Same Specific Amino Acid Sequence, GFOGER, in Native (Triple-helical) Collagens *. *J Biol Chem* 275:35–40.
- Landgraf L, Christner C, Storck W, Schick I, Krumbein I, Dähring H, Haedicke K, Heinz-Herrmann K, Teichgräber U, Reichenbach JR, Tremel W, Tenzer S & Hilger I (2015) A plasma protein corona enhances the biocompatibility of Au@Fe₃O₄ Janus particles. *Biomaterials* 68:77–88.
- Lazaridis T (1998a) Inhomogeneous Fluid Approach to Solvation Thermodynamics. 1. Theory. *J Phys Chem B* 102:3531–3541.
- Lazaridis T (1998b) Inhomogeneous Fluid Approach to Solvation Thermodynamics. 2. Applications to Simple Fluids. *J Phys Chem B* 102:3542–3550.
- Lazaridis T & Karplus M (1999) Effective energy function for proteins in solution. *Proteins* 35:133–152.
- Lennard-Jones JE (1931) Cohesion. *Proc Phys Soc* 43:461–482.
- Lin C-C & Anseth KS (2009) PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine. *Pharm Res* 26:631–643.
- Luo T & Kiick KL (2013) Collagen-like peptides and peptide–polymer conjugates in the design of assembled materials. *Eur Polym J* 49:2998–3009.
- Martínez L, Andrade R, Birgin EG & Martínez JM (2009) PACKMOL: a package for building

- initial configurations for molecular dynamics simulations. *J Comput Chem* 30:2157–2164.
- McTiernan CD, Cortes DC, Lazurko C, Amrani S, Rosales-Rojas R, Zuñiga-Bustos M, Sedlakova V, Poblete H, Stampelcoskie K, Suuronen EJ & Alarcon EI (2019) Light-Activated Peptide-Based Materials for Sutureless Wound Closure. *ACS Appl Mater Interfaces* 11:45007–45015.
- Monopoli MP, Aberg C, Salvati A & Dawson KA (2012) Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol* 7:779–786.
- Mostafavi-Pour Z, Askari JA, Whittard JD & Humphries MJ (2001) Identification of a novel heparin-binding site in the alternatively spliced III₁CS region of fibronectin: roles of integrins and proteoglycans in cell adhesion to fibronectin splice variants. *J Biol Chem* 276:63–73.
- Müller LK, Simon J, Rosenauer C, Mailänder V, Morsbach S & Landfester K (2018) The Transferability from Animal Models to Humans: Challenges Regarding Aggregation and Protein Corona Formation of Nanoparticles. *Biomacromolecules* 19:374–385.
- O’Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T & Hutchison GR (2011) Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform* 3:33.
- O’Leary LER, Fallas JA, Bakota EL, Kang MK & Hartgerink JD (2011) Multi-hierarchical self-assembly of a collagen mimetic peptide from triple helix to nanofibre and hydrogel. *Nat Chem* 3:821–828.
- Othman Z, Cillero Pastor B, van Rijt S & Habibovic P (2018) Understanding interactions between biomaterials and biological systems using proteomics. *Biomaterials* 167:191–204.
- Oyen ML (2014) Mechanical characterisation of hydrogel materials. *International Materials Reviews* 59:44–59.
- Papavasiliou G, Sokic S & Turturro M (2012) Synthetic PEG Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for Tissue Engineering Applications. *Biotechnol - Mol Stud Nov Appl Improv Qual Hum Life*.
- Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kalé L & Schulten K (2005) Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26:1781–1802.
- Pareek V, Bhargava A, Bhanot V, Gupta R, Jain N & Panwar J (2018) Formation and Characterization of Protein Corona Around Nanoparticles: A Review. *J Nanosci Nanotechnol* 18:6653–6670.
- Ramachandran GN & Kartha G (1954) Structure of collagen. *Nature* 174:269–270.
- Roy K, Kar S & Das RN (2015) Chapter 5 - Computational Chemistry. In: *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*. K. Roy, S. Kar & R.N. Das (eds). Academic Press: Boston. pp. 151–189.
- Shabbir M, Nagra U, Zaman M, Mahmood A & Barkat K (2020) Lipid Vesicles and Nanoparticles for Non-invasive Topical and Transdermal Drug Delivery. *Curr Pharm Des* 26:2149–2166.
- Siljander PR-M, Hamaia S, Peachey AR, Slatter DA, Smethurst PA, Ouwehand WH, Knight CG & Farndale RW (2004) Integrin Activation State Determines Selectivity for Novel Recognition Sites in Fibrillar Collagens *. *J Biol Chem* 279:47763–47772.

- Stetefeld J, Frank S, Jenny M, Schulthess T, Kammerer RA, Boudko S, Landwehr R, Okuyama K & Engel J (2003) Collagen Stabilization at Atomic Level: Crystal Structure of Designed (GlyProPro)₁₀foldon. *Structure* 11:339–346.
- Stultz CM (2006) The folding mechanism of collagen-like model peptides explored through detailed molecular simulations. *Protein Sci* 15:2166–2177.
- Tanner DE, Chan K-Y, Phillips JC & Schulten K (2011) Parallel Generalized Born Implicit Solvent Calculations with NAMD. *J Chem Theory Comput* 7:3635–3642.
- Thakur VK & Thakur MK (2015) Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. *Int J Biol Macromol* 72:834–847.
- Theocharis AD, Manou D & Karamanos NK (2019) The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J* 286:2830–2869.
- Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C & Karamanos NK (2016) Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 97:4–27.
- Tulla M, Pentikäinen OT, Viitasalo T, Kämpylä J, Impola U, Nykvist P, Nissinen L, Johnson MS & Heino J (2001) Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 11, alpha 21, and alpha 101 domains. *J Biol Chem* 276:48206–48212.
- Vedadghavami A, Minooei F, Mohammadi MH, Khetani S, Rezaei Kollahchi A, Mashayekhan S & Sanati-Nezhad A (2017) Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications. *Acta Biomater* 62:42–63.
- Walczyk D, Bombelli FB, Monopoli MP, Lynch I & Dawson KA (2010) What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *J Am Chem Soc* 132:5761–5768.
- Wilson EB (1924) Coulomb’s Law and the Hydrogen Spectrum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 10:346–348.
- Yu H & Dalby PA (2020) Chapter Two - A beginner’s guide to molecular dynamics simulations and the identification of cross-correlation networks for enzyme engineering. In: *Methods in Enzymology. Enzyme Engineering and Evolution: General Methods*, D.S. Tawfik (ed). Academic Press. pp. 15–49.
- Zamir E, Katz BZ, Aota S, Yamada KM, Geiger B & Kam Z (1999) Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 112 (Pt 11):1655–1669.
- Zhang C, Hekmatfar S, Ramanathan A & Karuri NW (2013) PEGylated human plasma fibronectin is proteolytically stable, supports cell adhesion, cell migration, focal adhesion assembly, and fibronectin fibrillogenesis. *Biotechnol Prog* 29:493–504.
- Zhang C, Desai R, Perez-Luna V & Karuri N (2014) PEGylation of lysine residues improves the proteolytic stability of fibronectin while retaining biological activity. *Biotechnol J* 9:1033–1043.
- Zhang Y, Zhu D, Wei Y, Wu Y, Cui W, Liuqin L, Fan G, Yang Q, Wang Z, Xu Z, Kong D, Zeng L & Zhao Q (2019) A collagen hydrogel loaded with HDAC7-derived peptide promotes the regeneration of infarcted myocardium with functional improvement in a rodent model. *Acta Biomater* 86:223–234.
- Zhu S, Jiang X, Boudreau MD, Feng G, Miao Y, Dong S, Wu H, Zeng M & Yin J-J (2018) Orally administered gold nanoparticles protect against colitis by attenuating Toll-like receptor 4- and reactive oxygen/nitrogen species-mediated inflammatory responses but could induce gut dysbiosis in mice. *J Nanobiotechnology* 16.
- Zollinger AJ & Smith ML (2017) Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol* 60–61:27–37.