



Facultad de Ingeniería

Escuela de Ingeniería Civil en Bioinformática

Nanotransportadores de agentes terapéuticos para tratamiento de cáncer colorrectal: diseño racional de nanopartículas para la encapsulación, transporte y liberación de fármacos.

Matías Ignacio Rojas Tapia

Profesor Tutor: Dr. Horacio Poblete Vilches

Co-tutor: Dr. Cristian Vilos Ortiz

Profesor Informante: Dr. Julio Caballero Ruiz

Proyecto de Memoria de Título

26 de septiembre de 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

Índice

Abstract	3
Resumen.....	4
1. Introducción	5
1.1. Cáncer.....	5
1.2. El Cáncer Colorrectal (CCR).	7
1.3. Tratamientos frente al cáncer a nivel general.	7
1.4. Nanotecnología y Nanomedicina.	10
1.5. Simulaciones de dinámica molecular.....	15
2. Hipótesis.....	20
3. Objetivos.	20
3.1. Objetivo general.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. Materiales y métodos	21
4.1 Modelar polímeros representativos de PLA/PLGA, DSPE-PEG ₂₀₀₀ y moléculas farmacológicas.	22
4.1.1. Modelado y preparación de estructuras tridimensionales de polímeros y fármacos. 22	
4.1.2. Parametrización de las estructuras generadas.	23
4.1.3. Estados de protonación de fármacos y biopolímeros.....	24
4.2. Generar modelos estructurales de nano-superficies poliméricas compuestas por PLGA/PLA: PEG, fármaco y/o biomarcador, incorporando DSPE-PEG conjugado con terminales COO, NH ₂ y OCH ₃ como primera capa.....	24
4.2.1. Crear configuraciones de estructuras iniciales para los sistemas a simular.	24
4.3 A Evaluar la estabilidad estructural de los complejos nano-superficie: droga previamente diseñados.	29
4.4. Estimar perfiles de fuerza asociados a la liberación de drogas anticancerígenas desde nanotransportadores poliméricos mediante cálculos de simulación molecular dirigida.	29
4.4.1. Extracción de drogas desde el interior de nanopartículas poliméricas a través de SMD 29	
5. Resultados	32
5.1 Estados de protonación de fármacos y biopolímeros.....	32
5.2 Análisis de estabilidad estructural y compactación, para cada sistema generado.....	33
5.3 Extracción de drogas desde el interior de nanopartículas poliméricas a través de SMD. 37	
5.4 Análisis de los efectos provocados por el paso de las drogas a través de los sistemas generados.....	42
6. Conclusiones.....	44
7. Bibliografía	46

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the second most frequent type of cancer in women and the third in men. Currently, the treatment of this condition is focused on the use of cytotoxic agents that inhibit the proliferation of cancer cells. However, at the same time, they induce cell death in healthy tissue due to their lack of specificity. In recent years, several treatments based on drug delivery systems using polymeric nanoparticles have been described, due to their high biocompatibility, their usefulness for the encapsulation of hydrophobic and hydrophilic drugs, and because they are approved by the Food and Drug Administration (FDA). On the other hand, it has been described that the addition of polyethylene glycol (PEG) improves drug transport capacity. To date, not many works analyze the release processes of chemotherapeutic agents, considering conformational and chemical characteristics of polymeric nanotransporters, from the point of view of computational chemistry.

Therefore, in the present project, we studied employing advanced molecular dynamics techniques, computational modeling, and force calculations, the factors that affect the drug release process through PLA/PLGA: DSPE-PEG₂₀₀₀ nano-polymeric systems conjugated with COO⁻, NH₂, and OCH₃ terminals. Thus, understanding that the nature of the core of the nanosurfaces would play a fundamental role in the release of the drugs under study, where nanoparticles with PLGA-based core would present a higher affinity for drugs compared to systems with PLA-based core. On the other hand, there were indications that the aggregation of NH₂ and OCH₃ terminals would generate more compact systems compared to those with COO⁻, which could affect the release kinetics. The understanding of the structural and energetic factors that dominate the interaction and release of anticancer drugs from nanocarriers provides information to improve the rational design of smart polymeric nanoparticles in the transport and release of drugs against colorectal cancer.

Resumen

El cáncer colorrectal (CCR), se ubica como el segundo tipo de cáncer más frecuente en mujeres y el tercero en hombres. Actualmente, el tratamiento de esta afección se enfoca en el uso de drogas citotóxicas que inhiben la proliferación de células cancerígenas; sin embargo, su acción también afecta a las células sanas debido a su baja especificidad. En los últimos años, se han descrito diversos tratamientos basados en sistemas de administración de fármacos mediante nanopartículas poliméricas, debido a su alta biocompatibilidad, su adecuada utilidad para la encapsulación de fármacos tanto hidrófobos como hidrofílicos y debido a que se encuentran aprobados por la Food and Drug Administration (FDA). Por otra parte, se ha descrito que la adición de polietilenglicol (PEG) otorga una mejora en la capacidad de transporte de fármacos. A la fecha, no existe amplia evidencia científica que estudie los procesos de liberación de agentes quimioterapéuticos, considerando características conformacionales y químicas de nanotransportadores poliméricos, desde el punto de vista de la química computacional.

En el presente proyecto estudiamos mediante técnicas avanzadas de dinámica molecular, modelado computacional y cálculos de fuerza, los factores que afectan el proceso de liberación de fármacos a través de sistemas nano-poliméricos PLA/PLGA: DSPE-PEG₂₀₀₀ conjugados con terminales COO⁻, NH₂ y OCH₃. Logrando así, comprender que la naturaleza del núcleo de las nanosuperficies jugaría un papel fundamental en la liberación de los fármacos de estudio, donde en nanopartículas con centro basado en PLGA se presentaría una mayor afinidad por las drogas en comparación a sistemas con núcleo basado en PLA. Por otra parte, se encontraron indicios de que la agregación de terminales NH₂ y OCH₃ generarían sistemas más compactos en comparación a los que presentan COO⁻, lo que podría incidir en la cinética de liberación. El entendimiento de los factores estructurales y energéticos que dominan la interacción y liberación de fármacos anticancerígenos desde nanotransportadores, proporciona información que permite mejorar el diseño racional de nanopartículas poliméricas inteligentes en el transporte y liberación de fármacos contra el cáncer colorrectal.

1. Introducción

1.1. Cáncer.

El cáncer se encuentra dentro de las principales causas de muerte a nivel mundial, esto considerando países de todos los órdenes económicos.¹ Se espera que la población que padece de cáncer, y las muertes asociadas, incremente drásticamente a medida que el número de personas crece y envejecen a nivel mundial.² Sin ir más lejos, el año 2018 murieron cerca de 9,6 millones de personas a raíz del cáncer, siendo la segunda enfermedad con mayor índice de mortalidad a nivel mundial.³ Los cánceres han causado alteraciones en seres vivos multicelulares durante 200 millones de años; es más, se han encontrado evidencias de incidencia de cánceres en antepasados de los humanos modernos los cuales se remontan a más de un millón de años.⁴ El origen del cáncer como tal se encuentra relacionado a mutaciones en protooncogenes,⁵ genes que una vez transcritos codifican proteínas que participan en procesos de diferenciación y reproducción celular,⁶ como también en la inducción de alteraciones genéticas relacionadas a la producción de señales inhibitorias de la proliferación celular, comúnmente denominadas genes supresores de tumores.⁷ Las mutaciones genéticas, asociadas al inicio y desarrollo de un tumor, en general son mantenidas durante la proliferación, lo que conlleva a un proceso de descontrol en la división celular, y la consiguiente acumulación de mutaciones del material genético afectado.⁸ Si bien se ha determinado que existen factores hereditarios que predisponen a la adquisición de una elevada tasa de mutaciones, la exposición a factores medioambientales tales como el agua contaminada por metales pesados, el humo de tabaco, el asbesto, la radiación solar, son todos factores significativos en la predisposición al cáncer es decir, a una mayor acumulación de alteraciones genéticas.⁹ Desde un punto de vista fisiológico, el cáncer se presenta como una enfermedad que se correlaciona con una división celular descontrolada, de alta eficacia replicativa, y con la activación de mecanismos de resistencia a la muerte celular.¹⁰ En general, el conglomerado de células cancerígenas prolifera aceleradamente hasta convertirse en una masa de células, con morfología y tamaño inusual denominado tumor, ¹¹ tal como se puede evidenciar en la Figura 1. En los casos donde el tumor se presenta en células hematológicas (el cual es el

caso de la leucemia), las células cancerígenas crecen y se distribuyen por los sistemas sanguíneo y linfático hasta llegar inclusive a la médula ósea, residencia de las células hematopoyéticas.¹²

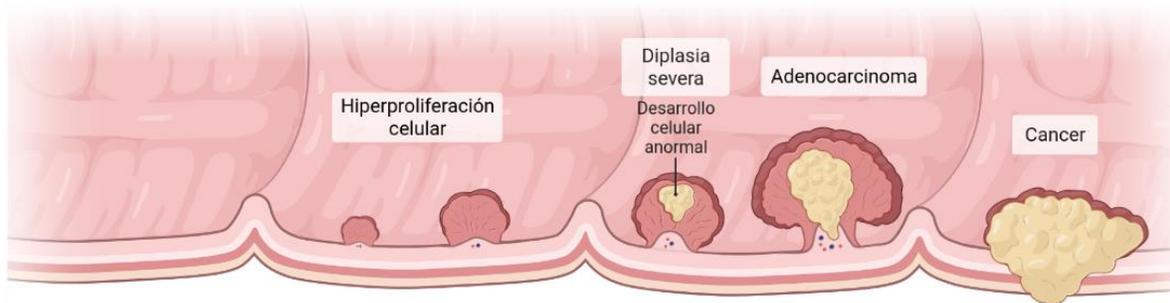


Figura 1. Desarrollo tumoral en células del colon. Representación de proliferación cancerígena en células del colon. De izquierda a derecha, se representan etapas de aumentada división celular (Hiperproliferación celular), con el consecuente crecimiento anormal del tejido subyacente (displasia severa), y la formación de la masa tumoral (adenocarcinoma), para finalmente dar origen a un cáncer “expuesto”, ya desarrollado, y maligno.

El tejido tumoral se expande rápidamente debido en parte al metabolismo acelerado de sus células.¹³ Estas células consumen grandes cantidades de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos por lo que el entorno fisiológico que “rodea” a las células tumorales carece de nutrientes. La escasez nutricional debida al crecimiento tumoral provoca que el órgano afectado altere su funcionamiento normal, pudiendo inclusive desencadenar fallas a nivel sistémico.¹⁴ Por otro lado, el metabolismo acelerado de las células tumorales produce un elevado nivel de metabolitos de desecho, principalmente dióxido de carbono y ácido láctico. El exceso de estas sustancias químicas en el medio ambiente celular provoca una disminución del \sim pH incrementando la acidez alrededor del tumor; esto propicia las condiciones metabólicas para que el tumor continúe su crecimiento.¹⁵ En conjunto, estos mecanismos favorecen el escape/diseminación de células cancerígenas al torrente sanguíneo. En este escenario, es muy probable que se produzca el crecimiento de un tumor secundario en otros tejidos, continuando con la expansión

del cáncer; fenómeno fisiopatológico conocido como metástasis,¹⁶ el cual suele presentarse en fases avanzadas de la enfermedad, usualmente conducente a la muerte de quien lo padece.¹⁷

1.2. El Cáncer Colorrectal (CCR).

A nivel mundial el cáncer colorrectal (CCR), es el segundo tipo de cáncer más frecuente en mujeres y el tercero en hombres, con 1,2 millones de casos diagnosticados anualmente, y más de 600 mil muertes asociadas (data disponible en el año 2008).¹⁸ Por otro lado, a nivel nacional, representa el 10% de las muertes relacionadas a cáncer en mujeres y el 8,3% en hombres, posicionando al CCR como el cuarto en incidencia en Chile.¹⁹ Se ha mostrado que, en comparación a otros cánceres, el área afectada del cuerpo por CCR en etapas previas a la metástasis, es más extensa.²⁰ Aun cuando las causas del CCR son desconocidas, se estima que el ~35% de los CCRs son causados por defectos genéticos,²¹ aunque hasta ahora solo el ~5% de ellos ha sido directamente asociados con un síndrome hereditario dominante o recesivo de alta penetración (que presenta grandes probabilidades de expresarse clínicamente).²² Las causas genéticas del ~30% restante de CCRs son aún desconocidas.²³ Dada la creciente prevalencia de la enfermedad a nivel global, es que se ha fomentado el desarrollo de terapias y/o estrategias innovadoras que permitan enfrentar y/o curar a pacientes con CCR. Lamentablemente, hasta hoy no se conocen estrategias exitosas al 100%.²⁴

1.3. Tratamientos frente al cáncer a nivel general.

Entre las estrategias clínicas utilizadas para enfrentar al cáncer existen tres focos principales: la quimioterapia, radioterapia y la cirugía. El método comúnmente abordado por oncólogos corresponde a la intervención quirúrgica; la cual consiste en la eliminación completa o parcial del tumor a través de la extirpación de la mayor cantidad de células cancerígenas posibles.²⁵ La radioterapia en tanto se basa en la aplicación de rayos-X (fotones de alta energía), en diferentes dosificaciones, sobre la zona tumoral (generalmente se utiliza después de la remoción quirúrgica del tumor, post-operación)

con el objetivo de alterar directamente el DNA de las células cancerosas, e inducir así el proceso de apoptosis tumoral, y a la vez permitir la recuperación del tejido afectado.²⁶ La quimioterapia corresponde a la administración de drogas que inhiben la proliferación de las células cancerígenas (bloqueadores de la replicación del DNA); sin embargo, debido a que estas drogas no pueden diferenciar entre células tumorales y normales, estas terapias también causan daño sobre el tejido sano.²⁷ En general, la cirugía y radioterapia corresponden a los tratamientos más eficientes en el caso de cánceres localizados no metastásicos.²⁸ Sin embargo, son terapias ineficaces cuando la enfermedad se ha diseminado por múltiples órganos.

Así, el uso de drogas quimioterapéuticas es la mejor opción para el tratamiento de cánceres metastásicos, puesto que son capaces de llegar a los órganos afectados mediante el torrente sanguíneo.²⁹ En este contexto, una molécula con propiedades quimioterapéuticas utilizada en el tratamiento contra el CCR es el Irinotecan (IRI) (Figura 2c). Este es un derivado semisintético de la camptotecina, droga citotóxica que une e inhibe a la enzima ADN topoisomerasa I (enzimas que controlan el enrollamiento del DNA), y desencadena el rompimiento del material genético, induciendo la muerte celular.³⁰ Finalmente, una molécula ampliamente utilizada en el marcaje de nanopartículas y su internalización en células cancerígenas en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos basados en nanopartículas poliméricas corresponde a la rodamina B (RHB) (Figura 2a).³¹ Generalmente, las rodaminas se utilizan como tintes láser, debido a su foto estabilidad y propiedades fotofísicas,³² como rendimiento cuántico, polarización y como sondas fluorescentes para la formación de imágenes de una sola molécula y en células vivas.³³

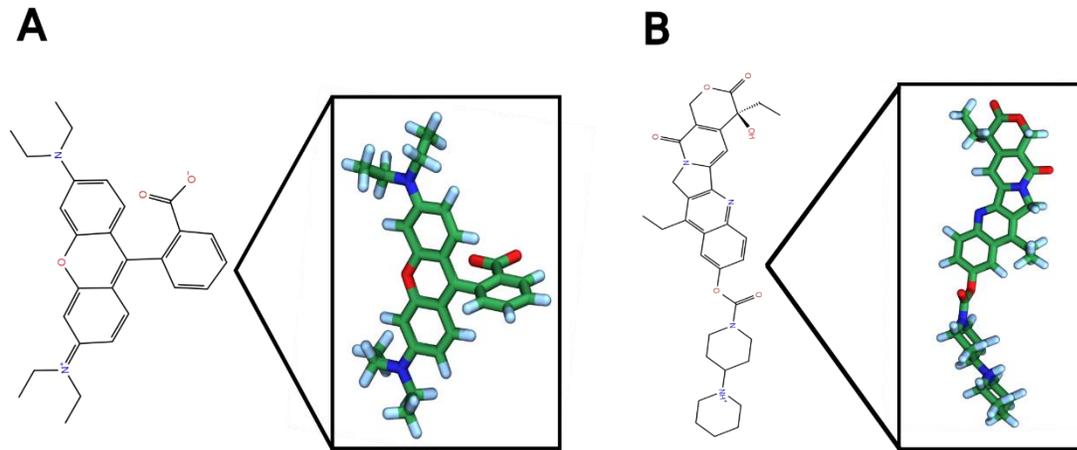


Figura 2. Drogas comúnmente utilizadas en el tratamiento y marcaje del cáncer colorrectal. Se presenta la estructura química de A) RHB, y B) Irinotecan.

Desafortunadamente, los agentes quimioterapéuticos poseen efectos secundarios indeseables y severos. Por ejemplo, afectan el desarrollo de folículos pilosos, provocan la destrucción de células de médula ósea y del tracto gastrointestinal, afectan a las células de los túbulos renales, etc.¹² Dentro de los efectos indeseados observados en pacientes destacan: la reducción del número de diferentes tipos de células sanguíneas (principalmente eritrocitos y glóbulos blancos), problemas gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarreas), enfermedades respiratorias, problemáticas cutáneas, insuficiencia cardíaca (arritmia, taquicardia ventricular), neurotoxicidad y nefrotoxicidad.³⁴ Controversialmente, y a pesar de los diversos efectos secundarios nocivos, y destrucción indiscriminada de células, durante años se ha recomendado a las drogas quimioterapéuticas como el “único” enfoque para tratar la metástasis del cáncer.³⁵ Es por estas razones, junto con el descubrimiento de las redes de señalización celular asociadas al control de la diferenciación y reproducción celular, que se ha iniciado un aumento explosivo en el diseño de tratamientos más específicos, que requieran una menor concentración de droga y que presenten una mayor efectividad.³⁶ En este contexto, la nanomedicina aparece como una herramienta prometedora puesto que puede aportar en el análisis, tratamiento y diagnóstico de enfermedades a través de la entrega inteligente de fármacos y el marcaje de objetivos terapéuticos.³⁷

1.4. Nanotecnología y Nanomedicina.

El desarrollo y estudio de partículas a nivel nanométrico (1×10^{-9} m) ha ganado relevancia en el campo de la ingeniería y medicina, en virtud del desarrollo de aplicaciones tales como: optimización de recursos, tratamientos de desgaste ambiental, recuperación de tejido y tratamiento de patologías.³⁸ De esta manera, los materiales nanométricos han revolucionado diferentes áreas de la investigación científica,³⁹ incluida la biomedicina. Así, la nanomedicina, que se refiere a la aplicación de nanotecnología en medicina,⁴⁰ implica el desarrollo de materiales y métodos nanométricos tanto para el diagnóstico (puede ser in vivo o ex vivo) como la caracterización de la progresión (estadificación) de enfermedades.⁴¹ El término nanomedicina es utilizado tradicionalmente para describir sistemas de administración de fármacos y el marcaje celular del tamaño de 1 a 100 nm que, tras inserción intravenosa, se trasladan por el torrente sanguíneo para ubicarse selectivamente en regiones patológicas.⁴² Los nanomateriales generalmente pueden consistir en fármacos constituidos por átomos metálicos, por moléculas no metálicas, o una mezcla de ambas; los cuales, dependiendo de cómo se encuentren compuestos, pueden denominarse partículas metálicas, orgánicas o semiconductoras.⁴³ La superficie de los nanomateriales generalmente está recubierta o funcionalizada con polímeros o moléculas de bio-reconocimiento que permiten mejorar la biocompatibilidad y la identificación selectiva de moléculas biológicas endógenas.⁴⁴ A diferencia de los átomos y los materiales macroscópicos, los nanomateriales tienen una alta relación entre el área de la superficie y el volumen (A/V), así como propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y biológicas sintonizables, y pueden diseñarse para tener diferentes tamaños, formas, composiciones químicas tanto interna (estructuras huecas, sólidas, etc.) como de superficie.⁴⁵ La Figura 3 muestra algunos de los nanomateriales utilizados en biomedicina, donde se establece una comparación de diámetros de estructuras conocidas. Como se indicó previamente, una de las características esenciales de las nanopartículas es su elevada relación A/V (área de superficie-volumen), la cual puede ser varios órdenes de magnitud mayor que la de materiales macroscópicos (figura 3). A modo de ejemplo, si cortamos un cubo de 1 cm de lado (1 cm^3) en 1021 cubos de 1 nm

de lado (1 nm^3) dará como resultado el mismo volumen y masa general pero ahora su superficie se ve incrementada por un factor de 1000 millones.⁴⁵ Por tanto, la ventaja de utilizar nanomateriales como portadores es que su superficie se puede recubrir con muchas moléculas.

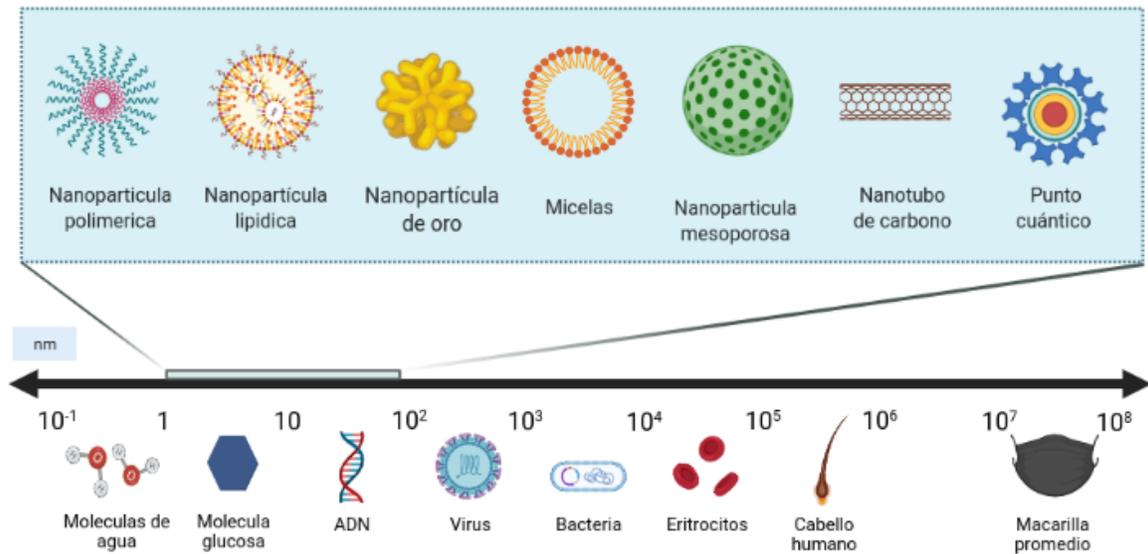


Figura 3. Diámetro de nanopartículas frente a estructuras conocidas. Se muestra una imagen ilustrando, en escala nanométrica, los diámetros de diferentes estructuras biológicas conocidas. Se incluye un ítem de uso común en laboratorios, como lo es una mascarilla quirúrgica, para referencia respecto al rango de diámetros de diferentes nanopartículas.

El creciente interés en el uso de la nanotecnología en el combate frente al cáncer, es debido en gran medida a sus cualidades únicas en los campos de administración y transporte de fármacos, diagnóstico, obtención de imágenes y el desarrollo de vacunas sintéticas.⁴⁶ Las nanopartículas, debido a su tamaño nanométrico, son capaces de superar barreras biológicas, acumularse preferentemente en tumores y reconocer específicamente células cancerosas individuales para su detección y tratamiento.⁴⁷ En este sentido, la nanomedicina aumenta el índice terapéutico de los compuestos al permitir la terapia diana del CCR y/o minimizar la acumulación en tejidos sanos, disminuyendo efectos tóxicos y mejorando la potencia del tratamiento al mismo tiempo

en que se protege a la molécula de la degradación en entornos biológicos no deseados, como sucede con fármacos que presentan baja solubilidad en agua, lo cual afecta enormemente su biodisponibilidad, problema que puede ser solucionado por nanotransportadores hidrófilos que depositen la droga en el sitio de interés.^{48,49} Dentro de este contexto, en el último tiempo se ha aumentado la utilización de sistemas de administración de drogas basados en nanopartículas poliméricas (eje central de este trabajo) generando estrategias terapéuticas innovadoras para las infecciones y las enfermedades inmunitarias, así como la terapia del cáncer. Los nanotransportadores poliméricos han mostrado mejoras significativas en comparación con muchos otros nanosistemas respecto a su biodegradación, biocompatibilidad y propiedades físicas y mecánicas altamente modificables.⁵⁰ De igual manera los materiales poliméricos han demostrado una mayor eficacia al momento de administrar agentes terapéuticos en el sitio de la enfermedad o el área dañada y proteger los medicamentos contra la degradación in vitro e in vivo.⁵¹

Las nanopartículas poliméricas formuladas mediante el método de nano-precipitación, se generan al auto ensamblar cadenas de polímeros en bloque logrando una partícula aglomerada (usualmente con forma pseudo-esférica). Los nanotransportadores poliméricos se componen de un núcleo hidrofóbico el cual es capaz de auto-encapsular distintos fármacos. De este modo, se tiene la libertad de que las drogas transportadas pueden ser tanto hidrofílicas como hidrofóbicas con el objetivo de favorecer el encapsulamiento y de igual manera su liberación, sin el riesgo de la pérdida de droga por condiciones ambiente.⁵² Entre los diversos polímeros utilizados para la generación de nanopartículas poliméricas, el poliéster es el sintético más investigado. Especialmente, el ácido poli (D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA) y el poli (ácido láctico) (PLA) (cuyas estructuras se presentan en la figura 4), ambos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos, se han aplicado con éxito en forma de microesferas / nanopartículas en el laboratorio y en de forma clínica durante décadas.⁵³

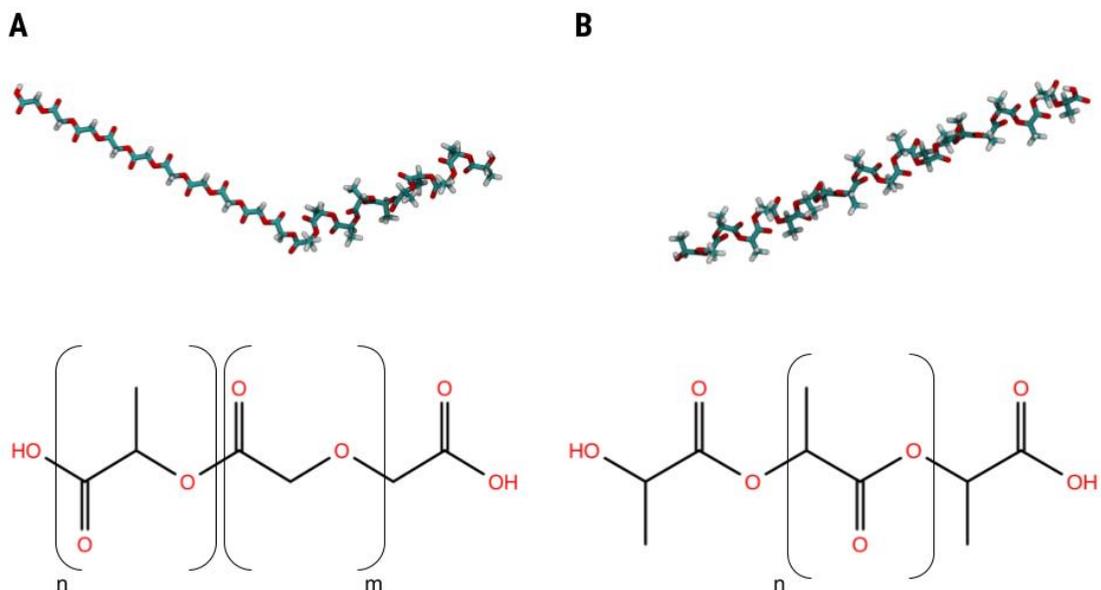


Figura 4: Representación estructural de PLGA y PLA a) Cadena de ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) de 10 monómeros de cada segmento de ácido láctico y glicólico. b) Cadena de ácido poli láctico (PLA) de 20 monómeros.

Tanto PLA como PLGA corresponden a polímeros sintéticos compostables, biodegradables y no tóxicos derivados de recursos renovables.⁵⁴ De esta forma ambos polímeros se encuentran constituidos principalmente por átomos de oxígeno y carbono, los cuales otorgan a estas moléculas una alta compatibilidad con el ambiente fisiológico humano.⁵⁵ Sin embargo, a pesar de sus diferentes implicancias en el campo médico, las aplicaciones de PLA son reducidas, debido a su baja carga de fármacos polares y débil hidrofiliidad.⁵⁶ No obstante, las nanopartículas de PLGA y PLA conjugadas con moléculas hidrófilas como el polietilenglicol (PEG) son un tipo especial de nanopartícula polimérica funcionalizada (co-polímero).⁵⁷ Diferentes investigaciones han demostrado que la “PEGilación” permite mejorar la biocompatibilidad, circulación sanguínea y otorga una menor citotoxicidad.⁵⁶ Las cadenas de PEG recubren la superficie de las nanopartículas y actúan como una suerte de barrera estérica, reduciendo la fagocitosis y la opsonización.⁵⁸ Las características anfífilas del polímero PLGA/PLA-PEG avalan el gran potencial de desarrollo en la administración de drogas farmacéuticas, puesto que el núcleo de PLA/PLGA actúa como depósito de fármacos hidrófobos, mientras que la zona externa

otorga una buena dispersión en la sangre y protección contra ataques biológicos del sistema.⁵⁹ Un valor agregado, se asocia con la facilidad de modificación de los grupos terminales de ambos polímeros. Esta característica permite el control del sistema de liberación de moléculas cargadas, dependiendo de las zonas cancerígenas objetivo. Las cuales son comúnmente ácidas ($\text{pH} < 6$), puede representar un descriptor de la presencia de células cancerígenas. Por otro lado, en regiones lisosomales y endosomales los rangos de pH van desde 5.0 a 5.5.¹⁷ Estas variaciones de pH , actúan como indicadores de interés al momento de diseñar nanopartículas que reconozcan y liberen controladamente drogas bajo condiciones de pH , y no bajo valores de pH neutro como las existentes en el torrente sanguíneo.

Diferentes estudios avalan el uso de estos conglomerados poliméricos,⁶⁰ en conjugación con colorantes celulares como RHB B (ver figura 2A) permitiendo un marcaje óptimo y preciso luego que la mayoría del sustrato fue liberado en la zona de interés.⁶¹ También se han reportado sistemas poliméricos conjugados con PEG, los cuales transportan IRI hacia células tumorales.⁶⁰ Más en detalle, los resultados obtenidos por Valencia indican que además de lograr una liberación controlada y precisa en la región afectada, y de aumentar la apoptosis en células cancerígenas, se observó una disminución de toxicidad residual del proceso de quimioterapia.⁶²⁻⁶⁴ Sin embargo, a pesar de que se han realizado estudios de factibilidad en el transporte de fármacos por parte de nanopartículas poliméricas conjugadas con PEG, el mecanismo estructural y físico-químico aún no es completamente entendido.⁶⁵ Aún existen muy pocos datos que indiquen cómo afecta la variación en las proporciones de PLA/PLGA: PEG en la liberación de droga, desde nanotransportadores poliméricos a nivel molecular. De la misma manera, existe poca información asociada al cómo, la variación de los estados de protonación de cada uno de los polímeros que componen la nanopartícula puede afectar la liberación de fármacos, considerando que la distribución de droga se hace en zonas con pH normalmente ácido.⁶⁶ Dentro de este contexto se hace necesario el estudio de las interacciones polímero-fármaco que gobiernan el proceso de descarga de moléculas, considerando los ejes de liberación y estado de protonación a nivel molecular.

Dado el rápido desarrollo de recursos y algoritmos computacionales disponibles para la investigación científica, y la alta eficacia presentada en análisis interacciones intermoleculares y estimaciones energéticas.⁶⁷ Las simulaciones de dinámica molecular, junto con otros métodos de análisis computacional, pueden convertirse en un agente clave en el estudio de propiedades estructurales y fisicoquímicas de nanotransportadores. Junto al análisis detallado de las interacciones energéticas y estructurales que las nanopartículas pueden generar con su medio circundante mientras desarrollan procesos de liberación controlada.⁶⁸

1.5. Simulaciones de dinámica molecular.

Las estrategias de biología computacional son utilizadas para dar vida a las estructuras biomoleculares, proporcionando información sobre la dinámica natural en diferentes escalas de tiempo de las biomoléculas en solución.⁶⁹ Estas metodologías han permitido esclarecer el comportamiento de diferentes nanosistemas a nivel atómico, logrando, por ejemplo, predecir valores de afinidad hacia diferentes drogas.⁷⁰ Mediante el uso de métodos teóricos-computacionales de dinámica molecular y de estimación de energía libre, se ha logrado indagar acerca de los mecanismos moleculares que gobiernan las interacciones ocurridas en los sistemas de estudio,⁷¹ aportando valiosa información para el estudio de diversos sistemas biológicos, permitiendo así reducir el número de pruebas experimentales, o bien entregando información complementaria al trabajo experimental.⁷² De manera más focalizada, los métodos computacionales de dinámica molecular utilizan las ecuaciones del movimiento Newtoniano como herramienta para simular la evolución en el tiempo de un conjunto de átomos que interactúan entre sí, permitiendo además evaluar el comportamiento de los sistemas a trabajar bajo diferentes condiciones iniciales tales como temperatura, presión, volumen o número de átomos.⁷³ Para simulaciones de dinámica molecular es fundamental determinar la evolución temporal de energía en el sistema en función de sus coordenadas atómicas. En este contexto, el gradiente de la función energética está relacionado con las fuerzas

que actúan sobre cada átomo. El conjunto de funciones de energía potencial de las que se derivan las fuerzas se denomina comúnmente campo de fuerza (ver figura 10), el cual se describe en términos de energía potencial interatómica enlazante (enlaces, ángulos de enlace, ángulos de torsión) y no enlazante (van der Waals y Coulombica).⁷⁴

Una serie de análisis relevantes que se puede extraer al momento de realizar dinámica molecular corresponden a cálculos de energía libre, los cuales, por ejemplo, permiten estimar la energía libre de unión resultante de la interacción de dos o más estructuras biológicas.⁷⁵ La energía libre de transición en un sistema se considera como el valor termodinámico clave que domina la reversibilidad de transición de estado, es decir el valor energético necesario para que el sistema adopte una determinada configuración espacial, mediada por interacciones internas (fuerzas de vdw, electrostáticas, hidrofóbicas).⁷⁶ De esta forma, la energía libre estipula los fundamentos teóricos de una serie de procesos que abarcan el plegamiento de proteínas, cambios conformacionales biológicamente significativos en estructuras moleculares, unión de ligandos a un receptor, o el proceso de liberación de un fármaco desde una nanopartícula.⁷⁷ La energía de un sistema se puede calcular a través de la resolución de ecuaciones termodinámicas implementadas e integradas por distintos métodos de cálculos de energía.⁷⁸

Dentro las metodologías existentes para estudiar procesos de transición en sistemas moleculares, se destaca el método Steered Molecular Dynamics (SMD), el cual corresponde a un método de dinámica molecular en que se aplica una fuerza externa sobre un conjunto de átomos de una estructura biológica en relación a un vector de transición.⁷⁹ Como consecuencia, un complejo que se encuentra en estado de equilibrio es obligado a perder esta condición, siendo forzado a adoptar conformaciones estructurales y posicionales que, en procesos de dinámica molecular clásica, sería imposible alcanzar debido a los tiempos necesarios para que ocurra este proceso. (como también la idea de este tipo de simulaciones es converger a un mínimo energético).⁸⁰ Sin embargo, SMD permite guiar y acelerar la ocurrencia de procesos de estudio, superando las barreras energéticas asociadas a estos eventos.⁸¹ En este caso particular la igualdad

de Jarzynski (ecuación 1) permite establecer una relación entre la energía libre presente en dos estados de pseudo-equilibrio, con el trabajo irreversible requerido para el desplazamiento a lo largo de una serie de estados intermedios.⁸²

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

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

Por lo cual, SMD es capaz de generar un perfil de fuerza que puede representar correctamente la afinidad estructural y energética del sistema de estudio.⁸³ De esta manera la caracterización estructural *in silico* **entrega un entendimiento integral de las características y fenómenos que gobiernan el mecanismo de formación y carga de fármacos en nanopartículas poliméricas**, permitiendo generar diseños mejorados y composiciones prometedoras.³⁵

Considerando los alcances y la robustez otorgada por parte de los métodos computacionales de dinámica molecular, junto con las metodologías implementadas para el cálculo de energía libre como lo es SMD, es que en el presente proyecto de memoria se propone estudiar el proceso de liberación de drogas anticancerígenas contenidas en nanopartículas poliméricas de PLA/PLGA conjugadas con PEG, comparando sistemas que presenten: 1) variación en la naturaleza química del núcleo polimérico (uso de PLA o PLGA), 2) diversas drogas utilizadas en el estudio y tratamiento del cáncer y 3) uso de terminales con diferente naturaleza química unidos a DSPE-PEG₂₀₀₀. Las drogas cargadas al interior de las nanopartículas corresponden a un fármaco anticancerígeno (Irinotecan), más una molécula de marcaje celular como lo es Rhodamina B. Se propone que a través del uso de técnicas computacionales como la dinámica molecular y cálculos de energía libre será posible caracterizar la facilidad de liberación de sustrato, en nanopartículas poliméricas en distintos puntos conformacionales y con diferentes características de composición como las mencionadas con anterioridad (naturaleza del núcleo polimérico y la conjugación de

diferentes terminales en DSPE-PEG). Se buscará la respuesta frente a diferentes interrogantes tales como: **¿Cómo afecta el estado conformacional de la nanopartícula (más abierta o cerrada) a la liberación de sustrato?, ¿Cómo incide la adición de terminales de distinta naturaleza química en la afinidad y en la liberación de fármacos?** La respuesta a estas interrogantes, más la correcta comprensión de cada uno de los ejes abordados dentro del presente proyecto, en adición a la obtención de resultados que avalen y clarifiquen el comportamiento de liberación en nanotransportadores con diferentes características, pueden proporcionar información clave para el diseño racional de prototipos de nanopartículas poliméricas específicas que permitan el tratamiento dirigido y seguro en la lucha contra el cáncer. En la Figura 5, se presenta un esquema general de los tópicos abordados en la presente introducción, indicando el paso a paso a seguir para abordar los distintos objetivos de esta investigación.

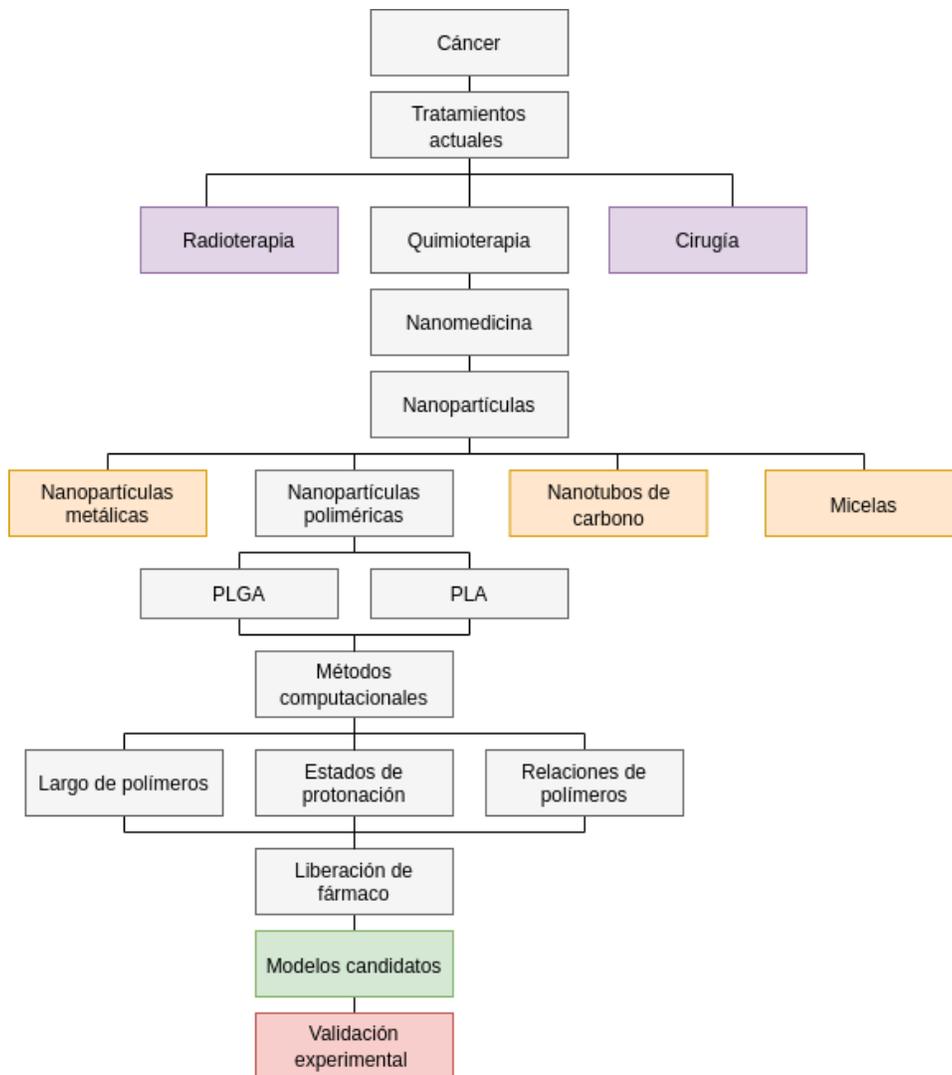


Figura 5. Esquema representativo del esquema de trabajo a abordar. Se muestra la estructura general del proyecto donde, en color gris se denota el desarrollo del presente trabajo investigativo. En verde se muestra la última etapa considerada en el proyecto. En amarillo y lila se muestran respectivamente otras alternativas de nanopartículas y tratamientos abordables. Finalmente, en rojo se muestra una última etapa de validación experimental la cual no será desarrollada dentro del presente proyecto, pero que es necesaria en el desarrollo de prototipos farmacológicos.

2. Hipótesis.

Tomando en cuenta los antecedentes previamente expuestos, nosotros hipotetizamos que **“La adición de grupos terminales COO⁻, NH₂ ó OCH₃ en polímeros de DSPE-PEG₂₀₀₀ presentes en la superficie de nanopartículas poliméricas, gatillan cambios conformacionales en el nanotransportador que inciden directamente en los perfiles de fuerza asociados a la liberación de fármacos cargados en el interior del nanotransportador”**.

3. Objetivos.

3.1. Objetivo general.

Evaluar si la adición de grupos terminales COO⁻, NH₂ ó OCH₃ en polímeros de DSPE-PEG₂₀₀₀ presentes en la superficie de nanopartículas generan cambios estructurales en el nanotransportador que inciden directamente en los perfiles de fuerza asociados a la liberación de agentes citotóxicos, desde el interior de nanopartículas poliméricas basadas en PLA o PLGA y DSPE-PEG₂₀₀₀.

3.2. Objetivos específicos.

- Generar modelos estructurales de polímeros de PLA/PLGA, DSPE-PEG₂₀₀₀ y moléculas farmacológicas para estudios computacionales.
- Conformar y refinar modelos estructurales de nano-superficies poliméricas compuestas por PLGA/PLA: PEG, fármaco y/o biomarcador incorporando DSPE-PEG conjugado con terminales COO, NH₂ y OCH₃ como primera capa.
- Evaluar la estabilidad estructural de los complejos nano-superficie:droga previamente diseñados.
- Estimar perfiles de fuerza asociados a la liberación de drogas anticancerígenas desde nanotransportadores poliméricos.

4. Materiales y métodos

El presente trabajo tiene como finalidad el estudio de los factores estructurales y energéticos asociados a la liberación de fármacos, desde nanotransportadores poliméricos compuestos por PLA: PEG y PLGA: PEG. Así, se utilizaron metodologías de dinámica molecular clásica, con el motivo de minimizar y evaluar la estabilidad estructural en cada uno de los complejos construidos, donde posteriormente se evaluaron las fuerzas involucradas mediante el método de Steered Molecular Dynamics (SMD), tal como se detalla en el diagrama presente en la figura 5.

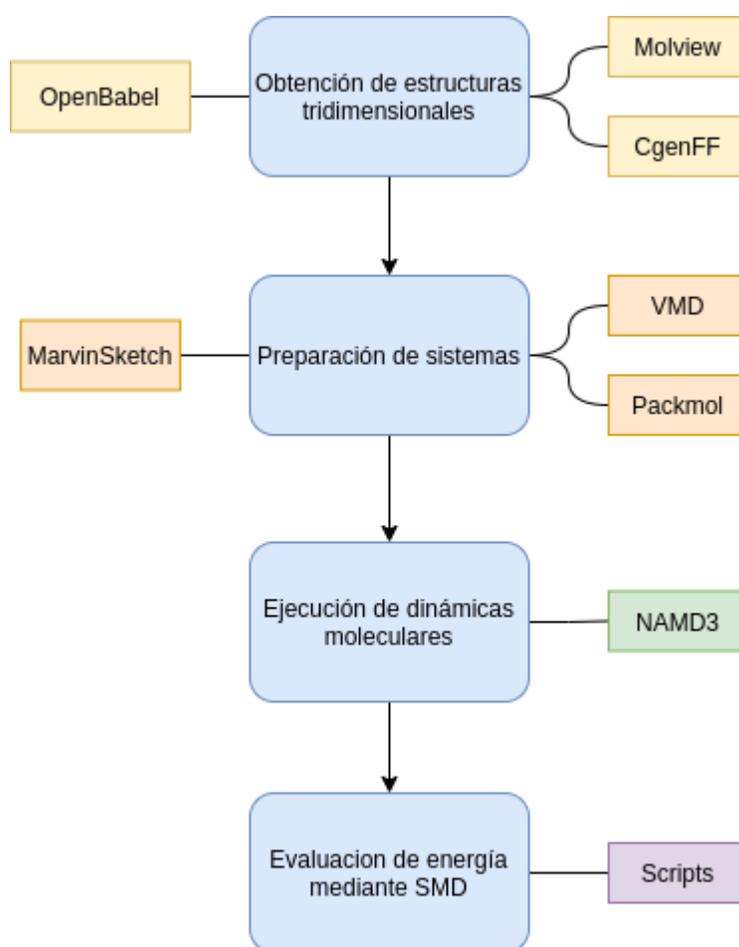


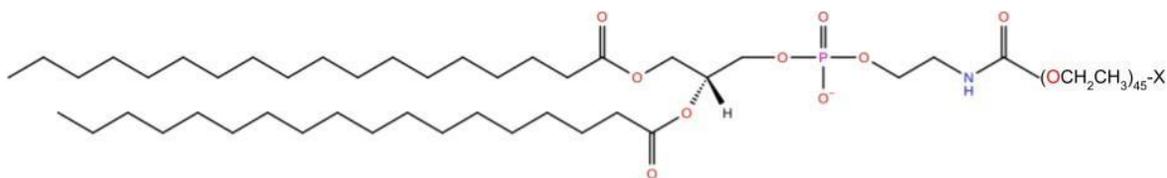
Figura 6: Esquema de las metodologías a abordar. En celeste se presentan los puntos principales a abordar dentro de la presente metodología, mientras que los recuadros laterales corresponden a las herramientas utilizadas para el cumplimiento de cada punto.

4.1 Modelar polímeros representativos de PLA/PLGA, DSPE-PEG₂₀₀₀ y moléculas farmacológicas.

4.1.1. Modelado y preparación de estructuras tridimensionales de polímeros y fármacos.

Para el estudio de los complejos nanotransportador-fármaco se dibujaron las estructuras moleculares representativas para el colorante RHB, y la droga anticancerígena IRI (Figura 2), mediante el uso de la herramienta web Molview.⁸⁴ Este servidor web, permite dibujar y diseñar estructuras moleculares de forma fácil y gratuita. Mientras que, para la obtención de las estructuras representativas de PLA, PLGA y DSPE-PEG₂₀₀₀, se utilizó el servidor CHARMM-GUI, el cual corresponde a una plataforma web que permite la generación de diversos sistemas iniciales para simulación molecular.

Considerando que el uso de mezclas racémicas de PLA mejora la estabilidad de nanopartículas en agua y la capacidad de carga de fármacos,⁸⁵ el polímero de PLA fue conformado por cadenas de 64 monómeros de ácido láctico en forma racémica, mientras que PLGA incluyó una composición de 48 monómeros de ácido láctico y 16 de ácido glicólico ensamblados de forma alternada, siguiendo lo realizado por Stipa y colaboradores.⁸⁶ Así también, la estructura de PEG a utilizar corresponde a una variante denominada DSPE-PEG₂₀₀₀ (Figura 7), el cual se presenta como una estructura pseudo-lipídica que tiene anexada una cadena de PEG de 45 repeticiones en el extremo terminal de la cola hidrofóbica. Esta variante de PEG es utilizada ampliamente como preparación PEGilada para micelas de polímeros, nano-plataformas como liposomas, nanopartículas de lípidos sólidos y micro emulsiones. Se generaron tres variantes de DSPE-PEG₂₀₀₀,^{87,88} las cuales se diferencian mediante por la adición de tres diferentes terminales (X= OCH₂COOH, OCH₃ y NH₂), las cuales se muestran en la Figura 7. Estas moléculas terminadas en grupos ácido carboxílico, metoxi y amino, han mostrado otorgar a la nanopartícula la capacidad de censar el pH fisiológico, permitiendo así identificar zonas ácidas, las cuales se atribuyen a áreas con presencia de células cancerígenas, y finalmente liberar de forma controlada la droga almacenada en el nanotransportador.⁵⁰



1. DSPE-PEG(2000)Carboxi terminado; X = OCH_2COOH
2. DSPE-PEG(2000)Met-oxi terminado; X = OCH_3
3. DSPE-PEG(2000)Amino terminado; X = NH_2

Figura 7: Estructura molecular de DSPE-PEG₂₀₀₀. Estructura bidimensional de DSPE-PEG, donde la X indica el sitio donde cada uno de los residuos funcionales listados (1-3) serán añadidos a la molécula.

4.1.2. Parametrización de las estructuras generadas.

Tras el diseño y modelado de cada una de las estructuras, se continuó con ordenar y ajustar el formato de cada uno de los archivos de coordenadas generados mediante el software OpenBabel, el cual presenta como características principales el manejo, lectura, escritura e interconversión de más de 110 formatos de archivos químicos.⁸⁹ Las estructuras generadas fueron parametrizadas a través del servidor web ParamChem,⁹⁰ el cual permite la parametrización automática de una gran cantidad de grupos químicos moléculas similares a fármacos y biomoléculas, basándose en la aplicación del campo de fuerza general de CHARMM o CGenff (por sus siglas en inglés Charmm general force field).⁹¹ Debido al gran tamaño de los polímeros resultantes (considerando las 45 repeticiones de polietilenglicol), fue necesario seccionar la molécula polimérica en dos diferentes secciones: 1) La región fosfolipídica más el grupo amino hasta 15 repeticiones de PEG y 2) Las 30 repeticiones restantes más cada terminal COO^- , NH_2 y OCH_3 . Por lo cual, se parametrizo cada región por separado, y finalmente se ensambló la molécula mediante un parche diseñado especialmente para cada molécula de PLA-DSPE-PEG y PLGA-DSP-PEG.

4.1.3. Estados de protonación de fármacos y biopolímeros.

Con la finalidad de simular cada estructura según las condiciones fisiológicas y experimentales, se determinó el estado de protonación de los fármacos en estudio (RHB e Irinotecan) y los polímeros asociados (PEG, PLA y PLGA), en todo el rango de pH a través del software MarvinSketch.⁹² Este software utiliza la estructura bidimensional de cada droga para estimar probabilidad de encontrar las moléculas en diferentes estados de protonación (cargadas o neutras) a través del cálculo de pKa. De esta manera, fue posible decidir el estado de protonación de cada estructura según el rango de pH al cual sean ejecutadas las dinámicas moleculares.

4.2. Generar modelos estructurales de nano-superficies poliméricas compuestas por PLGA/PLA: PEG, fármaco y/o biomarcador, incorporando DSPE-PEG conjugado con terminales COO, NH₂ y OCH₃ como primera capa.

4.2.1. Crear configuraciones de estructuras iniciales para los sistemas a simular.

Debido al gran número de átomos asociado a elaborar un modelo estructural de nanoesferas, se decidió la construcción de nanosuperficies inspiradas en una porción de nanopartícula tal como se muestra en la figura 8, lo que permite disminuir el coste computacional asociado al ensamble y análisis de los nanocarriers, sin perder las propiedades fisicoquímicas y conformacionales.

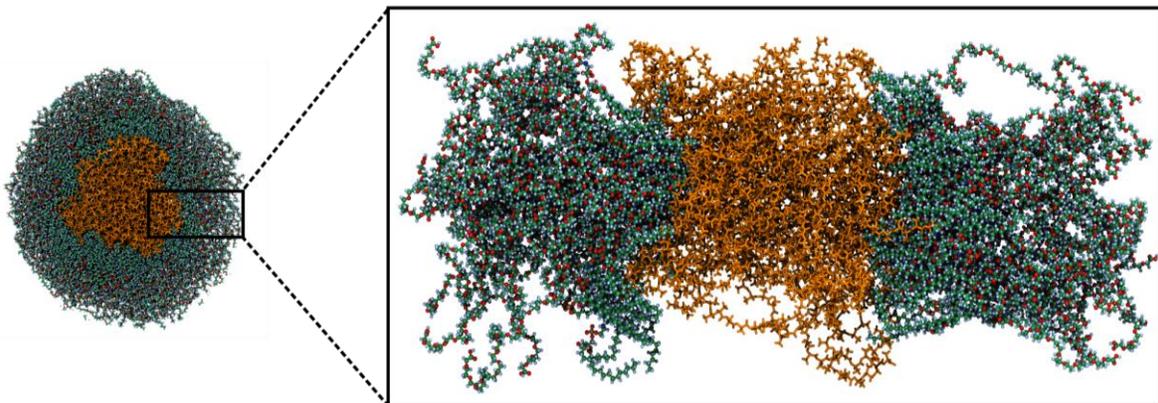


Figura 8: Fundamento de la sección escogida para la elaboración de las superficies nano poliméricas. Se ejemplifica la sección escogida del nanocarriers, para la elaboración de las nanosuperficies, donde en Cian se muestran las cadenas de DSPE-PEG₂₀₀₀ que recubren la

superficie en ambas caras del eje Z, mientras que en mostaza se presenta el núcleo polimérico de las nanopartículas (PLA /PLGA).

En base a lo anterior, se empleó un protocolo para ensamblar los distintos componentes de las nanosuperficies, considerando el uso del software packmol y dinámica molecular clásica. Packmol consiste en un algoritmo capaz de encapsular millones de átomos, agrupándolos en estructuras moleculares arbitrariamente complejas, dentro de una variedad de disposiciones tridimensionales. Las regiones abordadas pueden ser intersecciones de esferas, cilindros, elipses, planos o cajas.⁹³ Las simulaciones de dinámica molecular clásica se realizaron a través del software NAMD, el cual corresponde a un software de dinámica molecular paralelizable, orientado a la simulación de alto rendimiento de sistemas biomoleculares grandes. NAMD es adaptable a cientos de procesadores en plataformas paralelas de alta gama de unidades de procesamiento gráfico (GPUs), así como a decenas de procesadores en clústeres de productos básicos de bajo costo, además de poder ejecutarse en computadoras de escritorio y portátiles individuales.⁹⁴ Específicamente la versión a utilizar corresponderá a NAMD3, la cual presenta un nuevo modo de cálculo de un solo nodo por réplica residente en GPU, lo cual se espera pueda acelerar las simulaciones hasta dos o más veces para arquitecturas GPU modernas.⁹⁵ El uso del software, se detalla en la figura 9. Donde se indican los distintos tipos de archivos clave necesarios, como topologías y parámetros, para llevar a cabo la ejecución de simulaciones de dinámica molecular a través de NAMD.

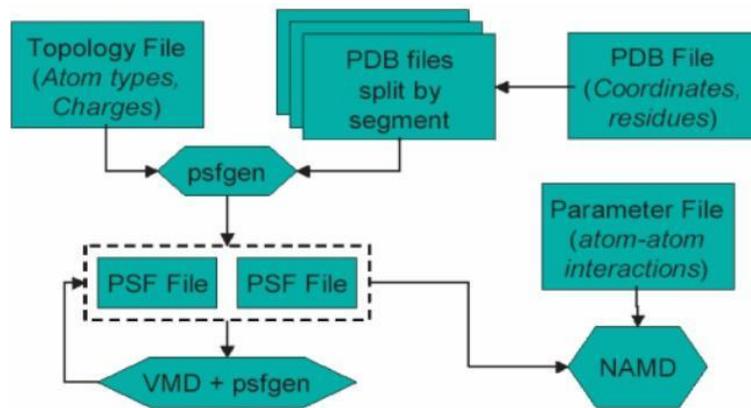


Figura 9: Flujo de trabajo correspondiente al uso básico del software de dinámica molecular NAMD. Este diagrama contiene tanto los parámetros necesarios para cada proceso, como también el flujo que realiza el software para estimar cada cálculo. Figura extraída de referencia.

94

Se utilizará un modelo estándar de aguas explícitas TIP3P⁹⁶ a través del campo de fuerza CHARMM36.^{97,98} Un campo de fuerza consiste en el conjunto de funciones, variables y parámetros que permiten determinar la energía potencial, lo cual va asociado a las coordenadas cartesianas del sistema a estudiar.⁹⁹ La mecánica molecular (regida en base a la mecánica clásica), permitirá realizar una aproximación de las variables, considerando los átomos y enlaces del sistema como esferas y resortes. La aproximación dada por la fórmula ilustrada en la figura 10 permite la descripción de las interacciones enlazantes (enlaces covalentes, ángulos, ángulos diedros, y ángulos impropios) y no enlazantes (interacciones electrostáticas, que se rigen por el potencial de Coulomb, debido a las cargas, y de van der Waals, que se rigen por el potencial de Lennard-Jones).¹⁰⁰

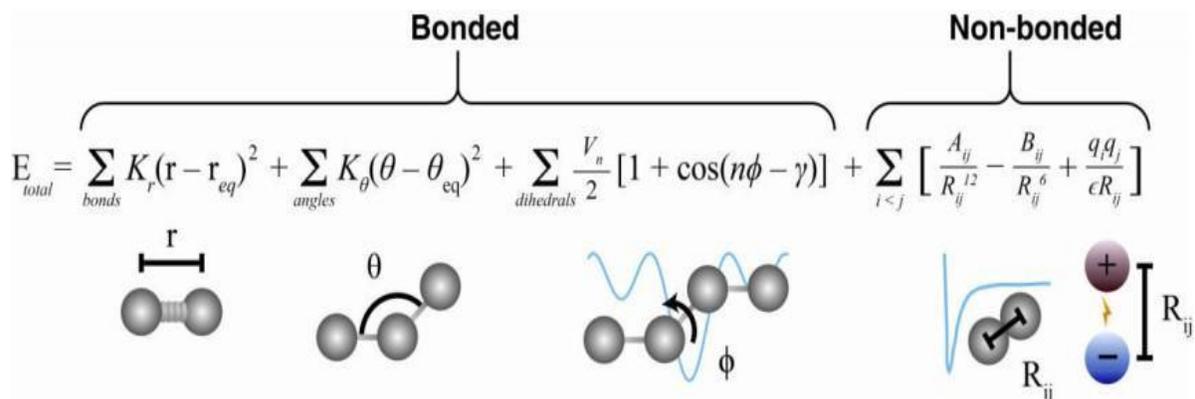


Figura 10: Ecuación de la función de energía potencial para un campo de fuerza, utilizada para aproximar las fuerzas atómicas que gobiernan el movimiento molecular. De manera general las fuerzas atómicas que gobiernan el movimiento molecular se pueden dividir en aquellas causadas por interacciones entre átomos que están unidos químicamente entre sí y aquellas causadas por interacciones entre átomos que no están unidos.¹⁰¹ Figura rescatada de referencia.¹⁰¹

Como primer paso se conformaron los núcleos poliméricos, ubicando dentro de un espacio de 25 \AA^3 un total de 25 cadenas de PLA y 27 cadenas en el caso de PLGA. Con la finalidad de imitar las condiciones experimentales en los sistemas generados, se aplicó una temperatura de 310 K y una presión de 101,325 kPa o 1 atm, mediante los métodos del termostato y pistón de Langevin.¹⁰² Estos algoritmos, disminuyen la frecuencia de colisión debido a los gradientes de presión y temperatura que se podrían llegar a formar, esto debido a que el algoritmo de Langevin es regido bajo el tratamiento de los grados de libertad del modelo. En ambos casos, se aplicó una minimización de 15000 pasos y un equilibrado de 50 ns en vacío, con la finalidad de compactar el núcleo (Figura 11A). Se continuo, con la agregación de 50 cadenas estiradas de DSPE-PEG repartidas equitativamente, en la región superior e inferior del centro hidrofóbico como se ejemplifica en la Figura 11B. Luego, se aplicó dinámica molecular clásica en vacío durante 100 ns, permitiendo acomodar el sistema (Figura 11C). Finalmente, cada modelo fue solvatado con aguas tipo TIP₃P en el eje z considerando desde el ultimo átomo de la superficie hasta 180 Å hacia la dirección opuesta, junto con lo cual, se agregó una concentración total de iones del 0,15 mol/L. El modelo obtenido tras este procedimiento se muestra en la figura 8D. Cabe señalar que, considerando la combinatoria entre cada

uno de los terminales conjugados con PEG (COO, NH₃, OCH₃), junto con las drogas utilizadas (RHB e Irinotecan) y las dos opciones de polímero (PLA/PLGA) usables para la conformación del núcleo, es que se obtiene un total de 12 modelos diferentes.

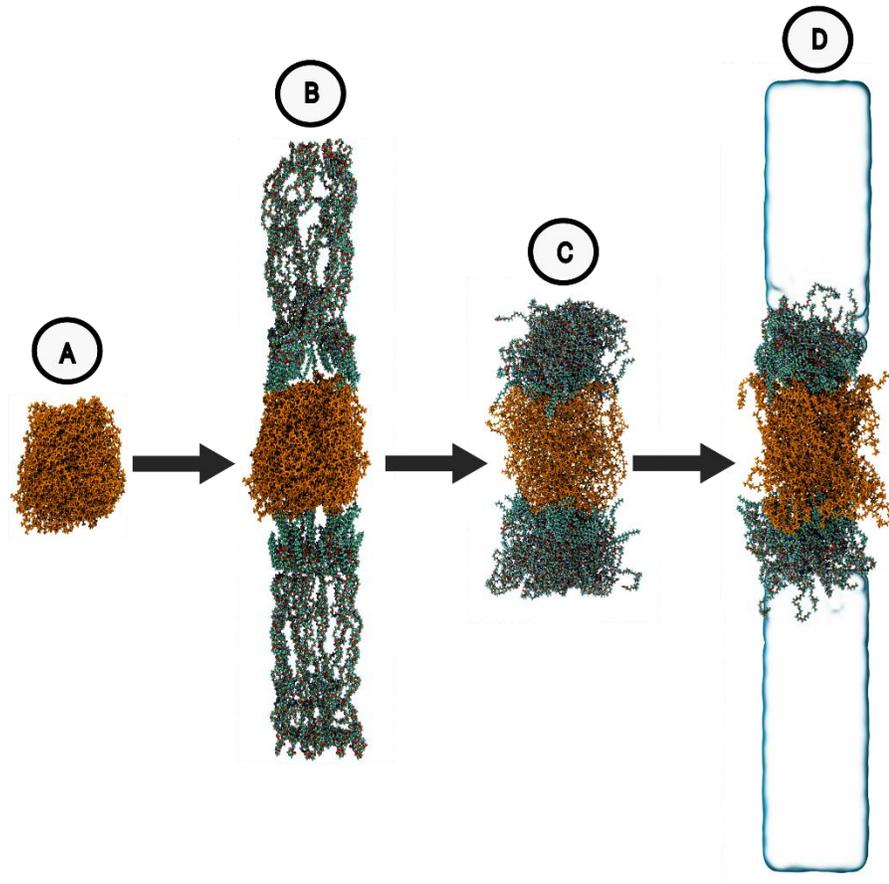


Figura 11: Paso a paso del modelado de sistemas iniciales. **A)** Núcleo hidrofóbico compactado, **B)** Agregación de cadenas de DSPE-PEG₂₀₀₀ de manera equitativa con respecto a lados opuestos del eje z del núcleo, **C)** Nanosuperficie polimérica equilibrada en vacío, **D)** Sistema nano-polimérico solvatado. En mostaza se indica el núcleo hidrofóbico de las nanosuperficies, pudiendo ser constituido por PLA o PLGA, en Cian se muestran las cadenas de DSPE-PEG₂₀₀₀ que recubren la superficie en ambas caras del eje Z.

4.3 A Evaluar la estabilidad estructural de los complejos nano-superficie: droga previamente diseñados.

Con motivo de evaluar la estabilidad de cada sistema, se analizó el grado de compactación en cada uno de los modelos generados mediante dos enfoques principales. En primer lugar, se calculó la distancia promedio, entre cada uno de los terminales conjugados con el DSPE-PEG₂₀₀₀ pudiendo ser estos COO⁻, NH₂ o OCH₃ y el centro de masa del sistema, durante el tiempo de simulación (50 ns). Como segundo método, se midió el número de aguas que entra al núcleo polimérico (PLA o PLGA) a lo largo de la simulación.

4.4. Estimar perfiles de fuerza asociados a la liberación de drogas anticancerígenas desde nanotransportadores poliméricos mediante cálculos de simulación molecular dirigida.

4.4.1. Extracción de drogas desde el interior de nanopartículas poliméricas a través de SMD

Con la finalidad de obtener los perfiles de fuerza asociados a la liberación de fármaco en cada uno de los sistemas generados, se realizarán cálculos fuera del equilibrio a través del método Steered molecular dynamics (SMD). Este protocolo corresponde a un tipo de dinámica molecular particular donde es aplicado un vector direccional a una molécula o proteína con el motivo extraer dicha estructura mediante la aplicación de fuerzas externas.¹⁰³ En una simulación SMD típica, se aplica un vector externo a uno de los extremos de la estructura molecular a analizar el cual permite desplazar a la molécula en la región en la cual se desea explorar, mientras que el extremo opuesto es fijado en el espacio actuando como un punto de referencia para la molécula, permitiendo investigar cómo responde la molécula al estrés mecánico.^{102,104} En un análisis SMD, el vector de fuerza es aplicado a través de un resorte armónico virtual unido a la estructura a extraer,¹⁰⁵ acelerando el proceso de salida del fármaco, proceso el cual no es observable en una dinámica molecular clásica.⁶⁸ En SMD se obliga a una molécula a recorrer una coordenada de reacción determinada, permitiendo que el sistema (nanopartícula-droga) salga de su equilibrio conformacional al explorar nuevos mínimos y máximos de energías.¹⁰⁵ La fuerza leída a lo largo del tiempo es calculada y registrada en forma de diagrama,

el cual muestra la distribución de fuerzas en cada uno de los diferentes estados atómicos de reacción asociados a la molécula de estudio y las interacciones con cada uno de los elementos del sistema.¹⁰⁶ Una vía para aplicar fuerzas externas a un complejo molecular es mediante la restricción armónica del ligando hasta un punto en el espacio a través de una variable colectiva. La región de sujeción se mueve en la dirección electa, logrando que el ligando explore nuevas interacciones a lo largo de la vía de desvinculación. Asumiendo una sola coordenada de reacción x , y un potencial externo, tenemos que:

$$U = \frac{K(x - x_0)^2}{2}$$

Donde K es la rigidez del resorte o constante de fuerza de tiro, x_0 es la posición inicial del punto de restricción que se mueve a una velocidad constante v . De esta manera la fuerza externa ejercida sobre el sistema puede ser expresada como:

$$F = K(x + vt - x_0)$$

Esta fuerza corresponde a la fuerza de tiro aplicada sobre el ligando por un resorte armónico de rigidez K con su extremo moviéndose con velocidad constante v . De manera alternativa, es posible seleccionar un punto de restricción fijo, a una distancia bastante más grande que la longitud de la vía de desacoplamiento. En este caso, el extremo del resorte es estático y su rigidez aumenta linealmente con el tiempo,¹⁰⁷ es decir, $K = at$, y la fuerza es:

$$F = at(x - x_0)$$

Para llevar a cabo las simulaciones SMD en los complejos de nanopartícula-droga, se utilizaron como punto de partida las conformaciones finales del proceso de simulación molecular clásica. Agregando el fármaco en una región distante de los terminales presentes en DSPE-PEG₂₀₀₀, con la finalidad de que no se presentaran interacciones inmediatas.

Como primer paso y a modo de facilitar el análisis se restringió armónicamente el centro de masa de todo el sistema (nanopartícula-fármaco), al centro de coordenadas mediante el uso del módulo colvars.¹⁰⁸ A través el mismo método, se aplicaron restricciones a la droga de estudio, con la finalidad de lograr que esta solo se desplazara a través del eje z correspondiente al sistema. Mediante SMD, se aplicó una velocidad de tiro de 2 Å/ns sobre el centro de masa del ligando, llevándolo hasta un punto donde se tenga certeza de que la estructura molecular no tendrá interacción con la nanopartícula. Para asegurar el correcto muestreo de la coordenada de reacción, se realizarán 3 réplicas para cada cálculo SMD, asegurando con esto condiciones iniciales distintas. En base a los perfiles de fuerza y trabajo obtenidos con SMD, se obtuvieron los perfiles de fuerza media (PMF) asociados a la extracción de la droga desde el interior del núcleo hidrofóbico de nanopartículas poliméricas, y se identificaron conformaciones e interacciones claves que ocurran a lo largo de la vía de salida de cada fármaco. Adicionalmente, se realizó el análisis del número de puentes de hidrogeno generados entre ambos fármacos y el sistema nanopolimérico, y se comparó con los puntos máximos de fuerza obtenidos por SMD.

5. Resultados

5.1 Estructuras de fármacos y biopolímeros, y sus correspondientes estados de protonación.

Las estructuras moleculares de los polímeros (PLA, PLGA y DSPE-PEG₂₀₀₀) y fármacos (RHB e Irinotecan) utilizados en la construcción de los sistemas fueron preparadas considerando pH Fisiológico. Para ello cada molécula fue sometida a un análisis de pKa a través del software MarvinSketch, donde se obtuvieron las conformaciones más probables para cada molécula a lo largo del espectro de pH, donde fueron seleccionados los estados más probables a pH 7. En cuanto a las moléculas farmacológicas, para el caso de RHB (figura 12-A) se presenta la protonación del nitrógeno perteneciente a uno de los grupos etilamina, por otro lado, el grupo carboxilo perteneciente al carboxifenil, pierde su protón concibiendo una región cargada negativamente, lo que permite el establecer interacciones electrostáticas.¹⁰⁹ Por otro lado, IRI en condiciones fisiológicas se encuentra en estado mono catiónico presentando el nitrógeno correspondiente al grupo piperidina más externo, protonado (figura 12B).¹¹⁰ En cuanto a los polímeros, en el caso puntual de PLA (figura 12C) y PLGA (figura 12D) ambos terminales carboxilos (relacionados a ácido láctico) se encuentran deprotonados, dando paso a COO⁻ el cual confiere una carga neta negativa.^{111,112} En el caso de DSPE-PEG₂₀₀₀ (Figura 12E), este presenta tres estados de protonación en razón de las variantes de los terminales conjugados, los cuales corresponden a COO⁻, NH₂ y OCH₃.^{113,114}

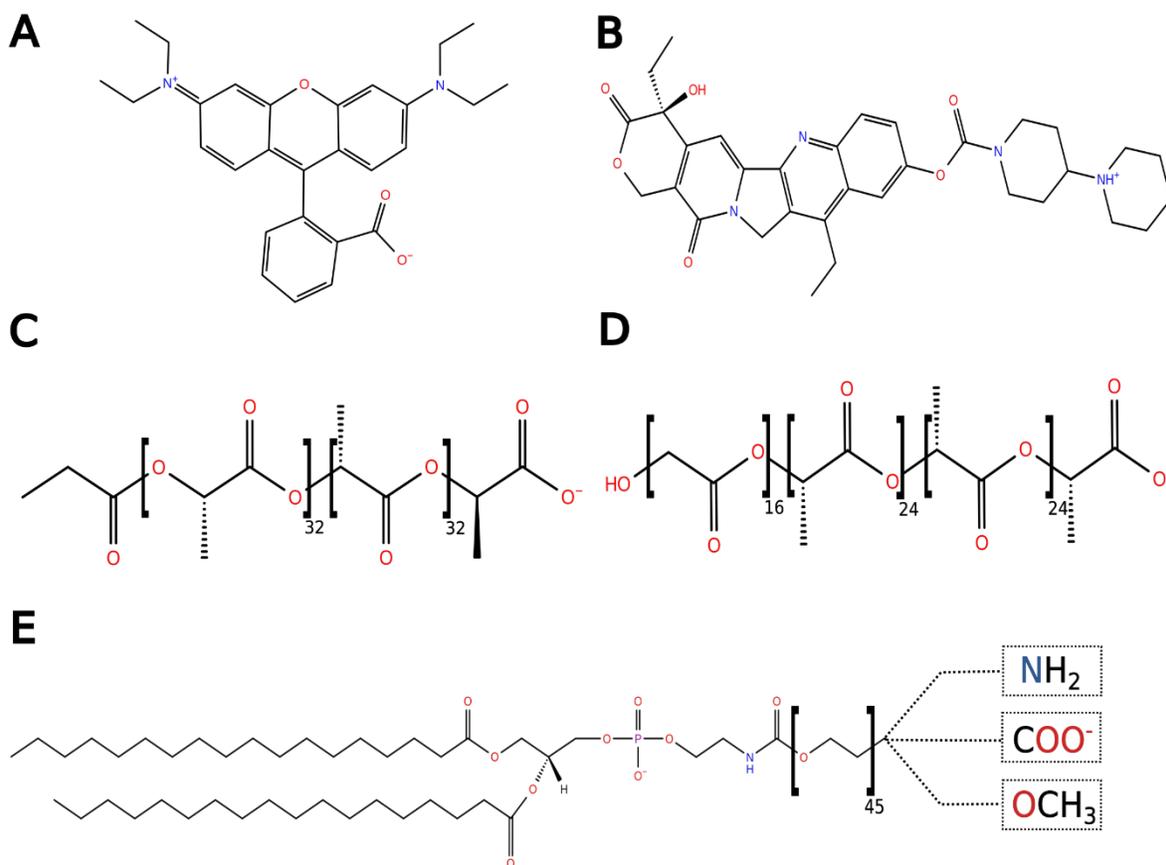


Figura 12: Estructuras moleculares utilizadas en la construcción de los sistemas nano poliméricos, fármaco y marcador, en su correcto estado de protonación. A) RHB, B) Irinotecan, C) PLA, D) PLGA, E) DSPE-PÈG₂₀₀₀.

5.2 Análisis de estabilidad estructural y compactación, para cada sistema generado.

Se estudio el nivel de compactación de cada sistema en el tiempo, durante un periodo de 50 ns de simulación molecular, mediante dos enfoques diferentes. En primer lugar, se midió la distancia promedio de cada terminal de DSPE-PEG₂₀₀₀ al centro de masa de la superficie nanopolimérica en todos los puntos de la dinámica. Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 13, donde a la derecha, se muestran los valores correspondientes a los sistemas con núcleo de PLA, en los cuales se puede observar que, a medida que aumenta el tiempo de simulación las distancias desde los extremos terminales de PEG al centro de la nanosuperficie tiende a crecer, lo cual indica que la interacción con el solvente fuerza la apertura y descompactación de las superficies. Se observa que el terminal COO⁻ presenta

los valores de distancia promedio más altos entre los distintos terminales a lo largo de la simulación molecular, superando los 90 Å de distancia a los 7 ns, mientras que en ningún punto de la dinámica NH₂ y OCH₃ logran alcanzar este umbral. Los valores de distancia finales para los terminales carboxilo, amino y metoxilo son 96.08, 87.86 y 86.28 Å respectivamente.

En cuanto a los resultados obtenidos para los sistemas construidos con núcleo de PLGA (grafico de la derecha en figura 13), es posible evidenciar que los complejos con terminaciones COO⁻ presentan mayores distancias por nanosegundo con respecto a sistemas con terminales NH₂ y OCH₃, llegando inclusive a superar los 10 Å de diferencia en determinados puntos de la dinámica molecular. Por otra parte, las curvas asociadas a los otros dos terminales son similares llegando a superponerse en diferentes puntos posteriores a los 17 ns, sin embargo, a partir del nanosegundo 45, se ve un incremento en la distancia asociada al sistema con terminación metoxilo, superando los valores reportados para el amino terminal. Los valores de distancia promedio a los 50 ns de simulación para COO⁻, NH₂ y OCH₃ son 96.86, 84.36 y 88.76 Å.

Si se comparan ambos tipos de sistemas (núcleos basados en PLA y PLGA), la variación de la distancia hacia el centro de masa, provocada por el cambio en la naturaleza del núcleo del nanotransportador, en los puntos finales de la simulación es de menos de 3.5 Å entre cada tipo de terminal, por otra parte, en ambos casos los sistemas con grupos COO⁻ fueron los que tuvieron distancias mayores al centro de masa, lo cual se encuentra relacionado a la interacción los terminales cargados negativamente, con cationes de sodio presentes en el ambiente,¹¹⁵ una gran concentración de estos atraen a los carboxilatos mediante interacciones electroestáticas, permitiendo el estiramiento de las cadenas de PEG. Del mismo modo, debido a la falta de elementos cargados en los terminales NH₂ y OCH₃, es que no ocurre este tipo de interacciones, por lo cual las curvas asociadas a estos dos terminales siguen tendencias similares.¹¹⁶

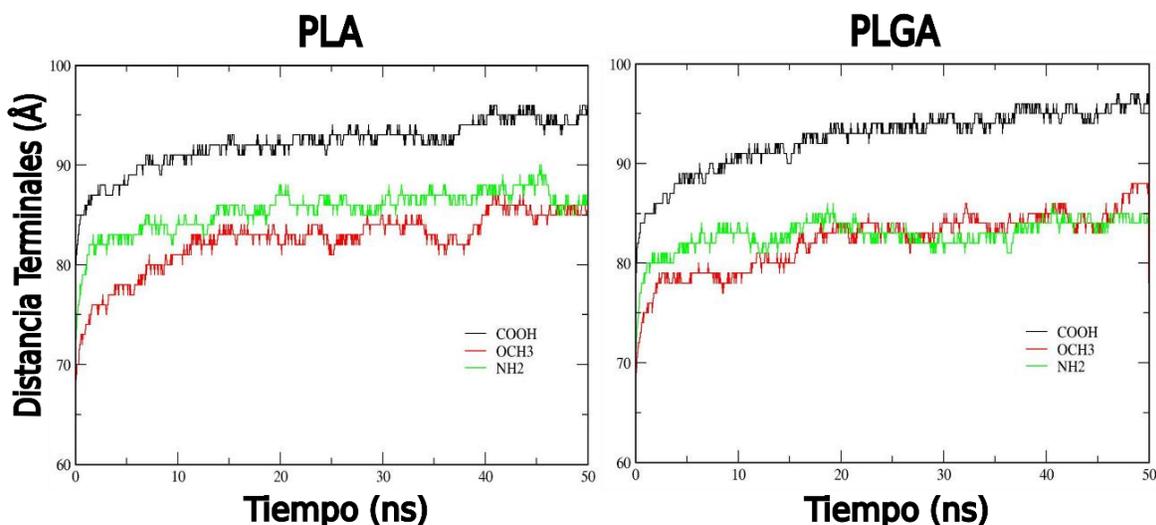


Figura 13: Distancia promedio de cada terminal al centro de masa de la nanosuperficie a lo largo del tiempo de simulación (50 ns). Se indica con colores a que terminal corresponde cada curva, siendo; Negro-COO⁻, Rojo-OCH₃ y Verde-NH₂

Como segundo eje del estudio del nivel de compactación de cada una de las variantes de las nanosuperficies poliméricas, se analizó el número de aguas que ingresaron al núcleo (PLA/PLGA) en cada punto de los 50 ns de simulación molecular. En la figura 14 se muestran los graficas que contienen las curvas obtenidas del análisis mencionado, para cada uno de los sistemas ensamblados. A la izquierda, se indican los resultados obtenidos para los sistemas con núcleo basado en poliácido láctico, en el grafico se puede apreciar que hasta aproximadamente los 11.4 ns los valores entre sistemas son similares, existiendo entre OCH₃ y NH₂ (los valores más altos y bajos respectivamente, en ese punto) una diferencia de 5 moléculas de agua. Posterior a ese instante, la cantidad de aguas presente en el núcleo del sistema con terminales OCH₃, aumenta drásticamente llegando a 131 moléculas al final de la simulación. Mientras que los complejos con terminales NH₂ y COO⁻, que presentan valores de numero de moléculas similares hasta el nanosegundo 36, alcanzan 71 y 52 moléculas de agua dentro del núcleo en el punto final de la simulación. Por otro lado, en el caso de los sistemas ensamblados con PLGA, (grafico de la derecha en la figura 14), es observable que el modelo que presenta terminales amino, cuenta con el menor número de aguas en su núcleo al termino de los 50 nanosegundos, con un total de 38 moléculas, seguido del terminal carboxilo con 69 y nuevamente la terminación metoxilo con 85. Lo cual

indica, que la aplicación de terminales cargados, permite la entrada de un menor número de aguas, respecto a terminales no protonables como OCH_3 .

A diferencia de lo que se podría esperar, complejos poliméricos con terminal COO^- , los cuales presentan una mayor distancia promedio hacia el centro de masa del sistema (tanto en núcleos de PLA como PLGA), cuentan con una concentración de agua en los núcleos menor a la esperada. Fenómeno que puede encontrar su respuesta en la capacidad de formación de puentes de hidrogeno entre los oxígenos presentes en el terminal, y las aguas circundantes en el medio, reteniéndolas y retardando su avance hacia el núcleo. Algo similar ocurre con el terminal NH_2 , donde el nitrógeno puede actuar como donador de enlaces de hidrogeno con las aguas presentes en el sistema. Por otro lado, el terminal OCH_3 al no presentar estructuras que le permitan formar este tipo de interacciones, resulta más fácil que moléculas de agua avancen hacia el núcleo polimérico.

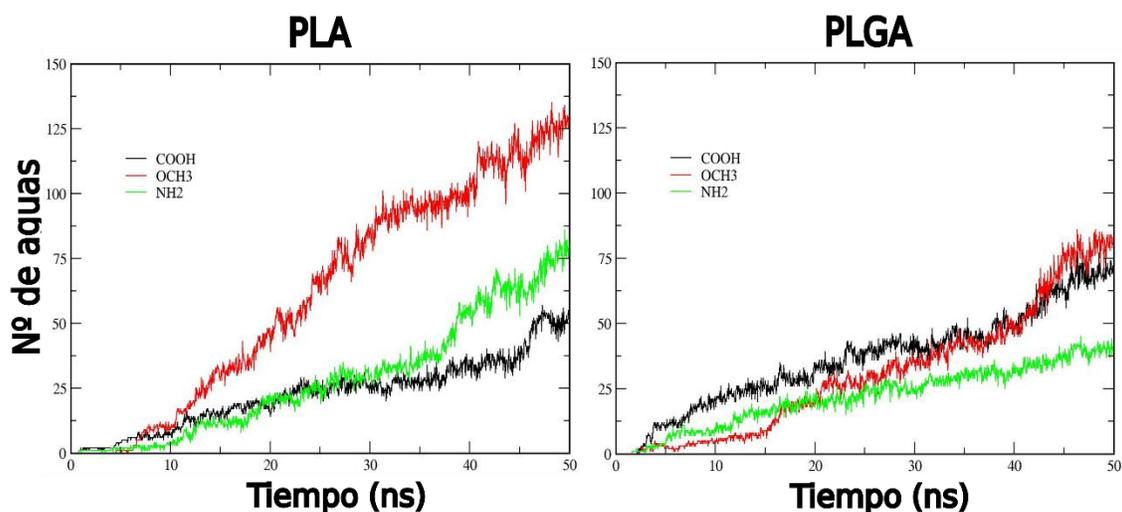


Figura 14: Cantidad de aguas que ingresa al núcleo de las nanosuperficies, a lo largo del tiempo de simulación (50 ns). Se indica con colores a que terminal corresponde cada curva, siendo; Negro- COO^- , Rojo- OCH_3 y Verde- NH_2

5.3 Extracción de drogas desde el interior de nanopartículas poliméricas a través de SMD.

El punto de inflexión en el presente estudio corresponde a la creación de modelos de nanopartículas poliméricas con variaciones en sus propiedades fisicoquímicas, que permitan la liberación controlada de fármaco dependiente de las modificaciones estructurales aplicadas. Es por ello, que cada sistema fue duplicado, para posteriormente agregar una molécula de RHB e IRI (una en cada duplicado). Luego, se realizó la extracción de cada droga a través de la superficie correspondiente mediante SMD, con la finalidad de obtener los perfiles de fuerza asociados al proceso de liberación de fármaco. Los resultados obtenidos para cada molécula farmacológica, considerando cada uno de los diferentes sistemas, se muestran en las figuras 15 para RHB y 17 para Irinotecan. Las cuales contienen las gráficas de fuerza vs posición de la molécula en el eje z, para cada una de las tres réplicas de SMD realizadas, donde además se indican los puntos de fuerza máxima entre cada replica para por sistema, estos puntos se encuentran relacionados a las conformaciones espaciales indicadas en la figura 16 para RHB (ver en material suplementario para Irinotecan). Cada una de las gráficas, se encuentra seccionada a diferentes regiones, las cuales corresponden a los medios que atraviesa la molécula de RHB mientras a lo largo del proceso de dinámica molecular dirigida, siendo estos: agua (azul), DSPE-PEG₂₀₀₀ (celeste) y el núcleo compuesto por PLA/PLGA (amarillo). En la figura 15, se presentan las curvas de fuerza asociadas al paso de RHB a través de los distintos modelos de nanosuperficie polimérica, donde, se puede observar que los valores de fuerza aplicada a la molécula mientras se encuentran en agua, son prácticamente idénticos al cuándo atraviesa PEG, sin superar las 10 kcal/mol/Å en ambos casos. Luego, la fuerza aumenta a medida que el biomarcador se acerca al núcleo, siendo específicamente en esta región donde ocurren los puntos máximos, superando en cada sistema las 30 kcal/mol/Å. Se observa que la cantidad de fuerza aplicada en esta zona varía dependiendo de la naturaleza del núcleo, donde en centros basados PLA, los valores de fuerza para los terminales OCH₃ y NH₂ no superan las 40 kcal/mol/Å, mientras que en el modelo con terminal COO- solo una de sus réplicas supera las 55 kcal/mol/Å, las otras dos se mantienen en el rango de los terminales antes

mencionados. En cuanto a los modelos que presentan PLGA como núcleo, es posible señalar que la fuerza aplicada presenta valores cercanos a las 50 kcal/mol/Å en las superficies con terminales OCH₃ y NH₂ mientras que solamente una de las réplicas de COO⁻ supera ese rango. Lo anterior, podría traducirse en que las interacciones del marcador con este polímero tienden a ser más fuertes, lo que a su vez podría ser interpretado como una liberación más lenta del fluoróforo, con respecto a lo que ocurre en sistemas conjugados con PLA. Un fenómeno a destacar, corresponde a lo que sucede con la nanosuperficie conjugada con terminaciones NH₂ y núcleo basado en PLGA, la cual presenta los valores de fuerza más altos, durante el tracto más largo, superando las 35 kcal/mol/Å desde aproximadamente los -25 hasta los 40 Å en el eje Z. Lo cual podría ser evidencia de que este sistema podría presentar los periodos de liberación más prolongados, entre este grupo de modelos.

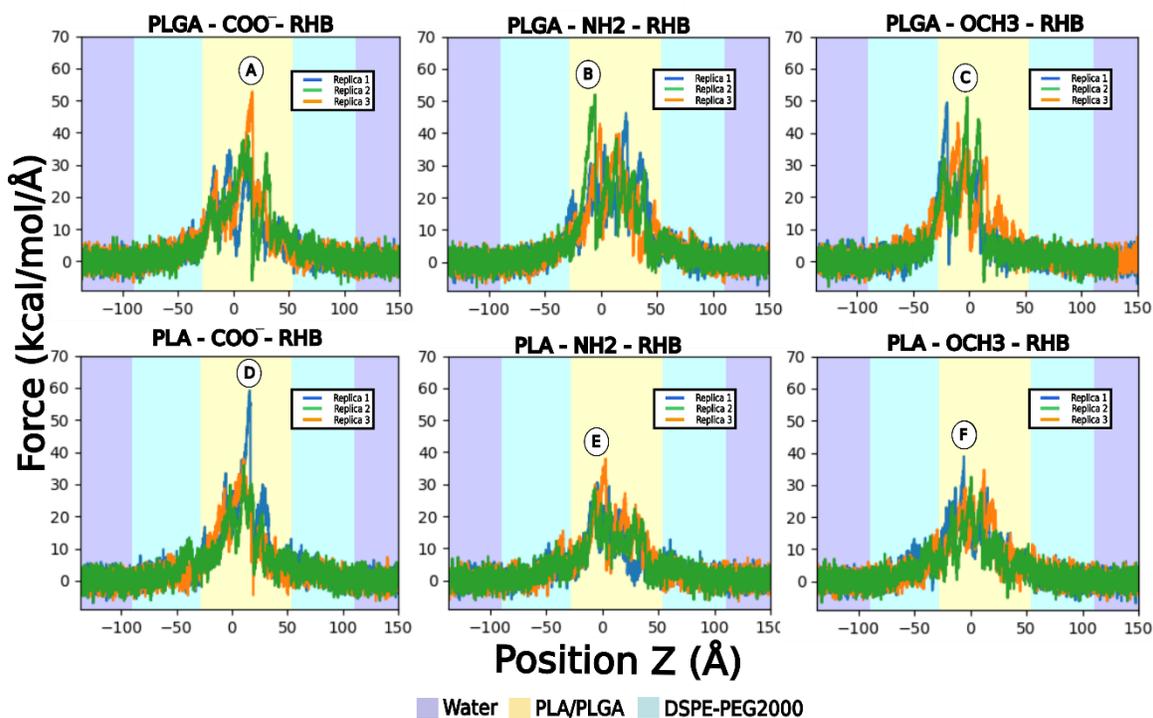


Figura 15: Perfiles de fuerza asociados al paso de RHB a través de cada uno de los sistemas generados (50 ns). Cada una de las tres réplicas se ve representada por un color específico, la primera de azul, la segunda por verde y la tercera por anaranjado. Mientras que las tonalidades del fondo del gráfico representan los medios por los cuales pasa el fármaco a lo largo de la dinámica.

En la figura 16, se ilustran las conformaciones estructurales que adopta RHB y su entorno (moléculas hasta 5 Å de distancia), en cada uno de los puntos máximos de fuerza reportados en los gráficos de la figura 16. En cada imagen se puede apreciar que, las principales regiones de interacción de RHB tanto con PLA y PLGA, se encuentran dadas por la polaridad que otorgan el grupo carboxilo perteneciente al carboxifenil (el cual presenta carga negativa) y los nitrógenos pertenecientes a los grupos etilamina (dentro de los cuales uno se encuentra protonado), permitiendo la generación de interacciones electroestáticas con los átomos de oxígeno presentes en los polímeros que componen al núcleo de las nanosuperficies. Mientras que, los grupos etil unidos a las aminas exteriores dan paso a interacciones hidrofóbicas con los grupos metil presentes en PLA y PLGA. Por otra parte, es necesario indicar que los valores de fuerza mayores en PLGA respecto a PLA fueron dados predominantemente por la complejidad en el empacamiento del polímero alrededor de RHB, ocasionando una mayor cantidad de contactos entre el polímero y el fluoróforo, aumentando la afinidad entre ambas estructuras y dificultando el paso de la molécula hacia el exterior de la nanosuperficie polimérica. Mientras que, en los sistemas constituidos por PLA, la densidad de polímero alrededor de RHB es menor, lo que hace que se presente una menor afinidad respecto a sistemas constituidos por PLGA y facilitando el paso de Rodamina B a través de la región del núcleo y de la nanopartícula en sí.

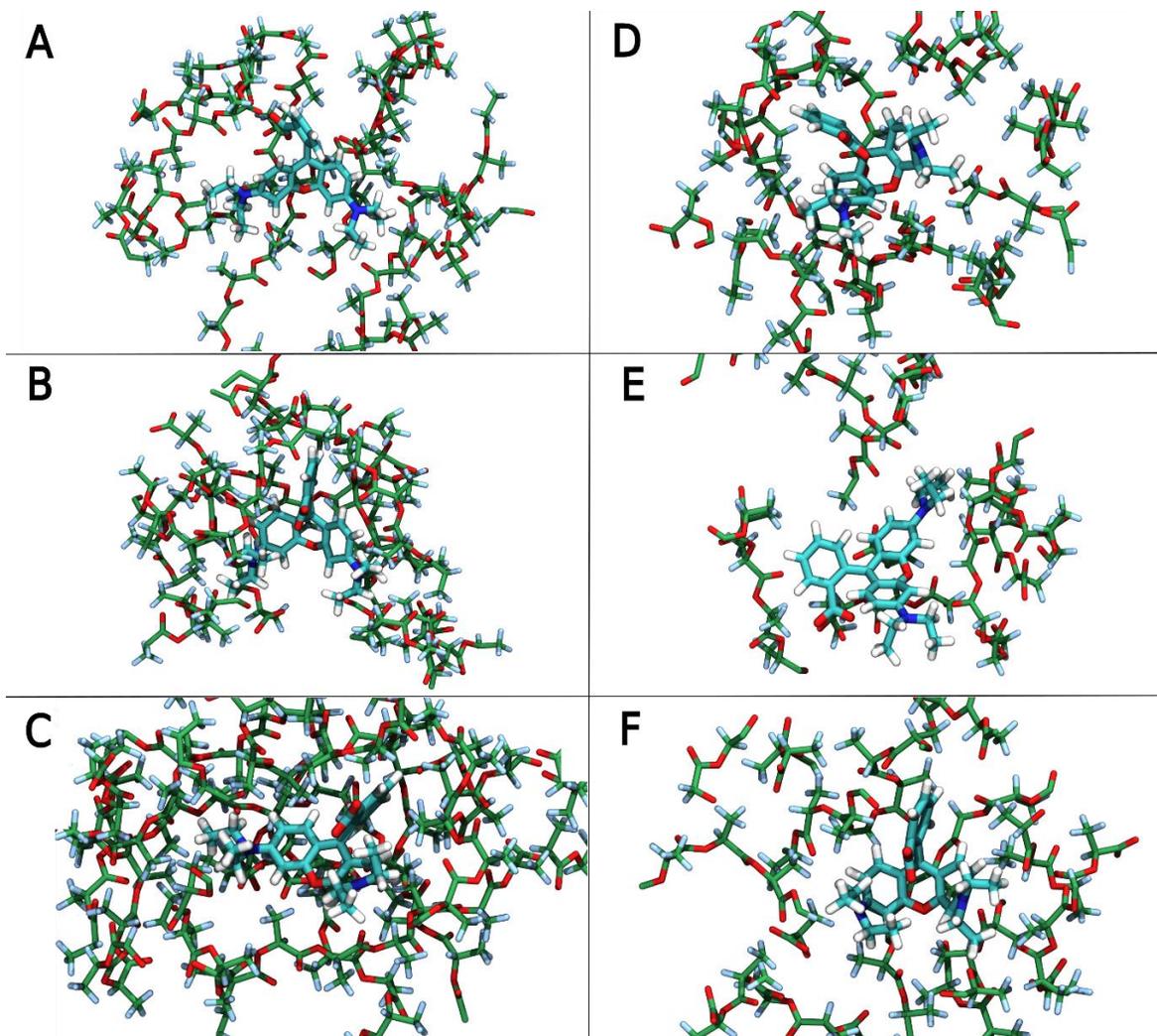


Figura 16: Conformaciones estructurales adoptadas por RHB en los puntos fuerza máxima (50 ns). Cada letra hace alusión a los puntos de máxima fuerza indicados en la figura 15 correspondiendo a: A) PLGA-COO⁻, B) PLGA-NH₂, C) PLGA-OCH₃, D) PLA-COO⁻. E) PLA-NH₂ y F) PLA-OCH₃

Los perfiles asociados al paso de IRI a través de las diferentes variaciones de sistemas se muestran en la figura 17 (para conformaciones correspondientes a los puntos máximos revisar anexos). Donde, de manera similar a lo ocurrido para RHB, la fuerza aplicada para trasladar el fármaco a través del medio acuoso, es prácticamente la misma que la requerida para moverse entre los terminales, lo cual podría tener su causa en las fluctuaciones libres que estos realizan al estar en contacto con el solvente, facilitando el paso del fármaco en esa región.

Mientras que los máximos de fuerza nuevamente se dan en la zona correspondiente al núcleo, siendo mayores en sistemas que presentan PLGA, en los cuales los puntos más altos de fuerza por sistema superan las 45 kcal/mol/Å siendo el sistema conjugado con NH₂ el que presenta el valor de fuerza más alto con 66 kcal/mol/Å. Por el contrario, los modelos con núcleo compuesto por PLA conjugados con terminales COO⁻ y OCH₃ no superan en ninguna de sus réplicas las 40 kcal/mol/Å, mientras que, en el sistema que presenta NH₂, solamente la tercera replica supera esta barrera llegando a las 54 kcal/mol/Å. Lo anterior respalda la proposición de que nanopartículas que se encuentren compuestas por PLGA presentaran tasas de liberación de fármaco más prolongadas con respecto a modelos que utilicen PLA.

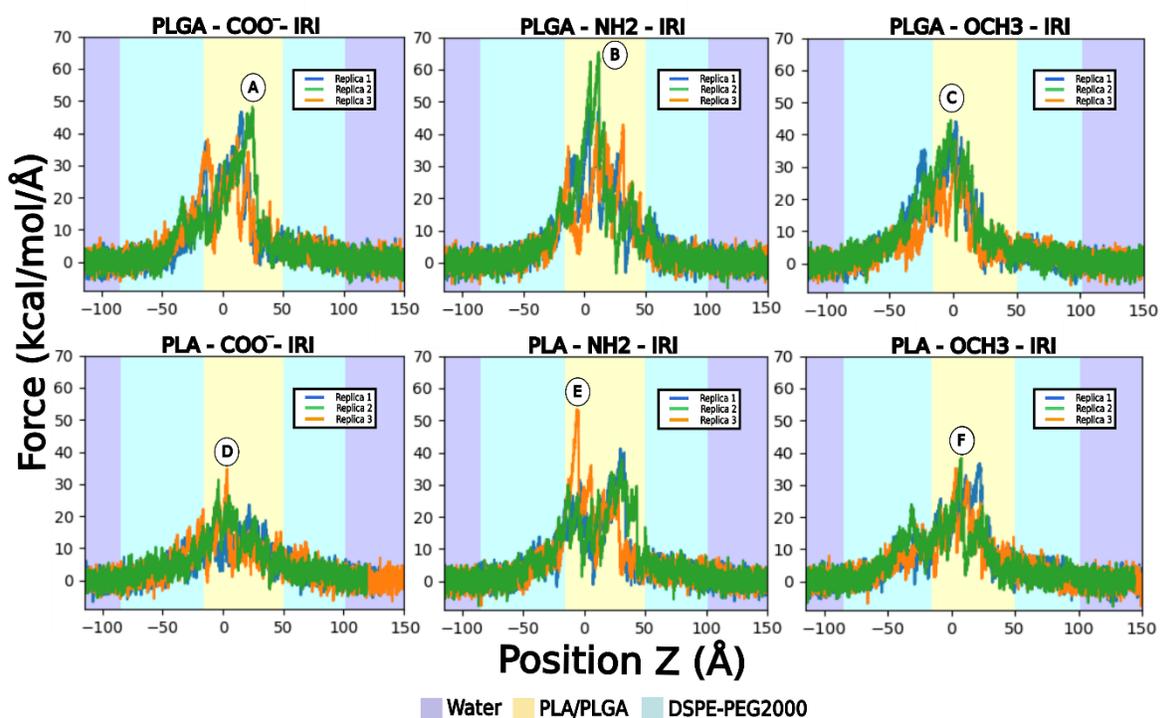


Figura 17: Perfiles de fuerza asociados al paso de IRI a través de cada uno de los sistemas generados (50 ns). Cada una de las tres replicas se ve representada por un color específico, la primera de azul, la segunda por verde y la tercera por anaranjado. Mientras que las tonalidades del fondo del gráfico representan los medios por los cuales pasa el fármaco a lo largo de la dinámica.

5.4 Análisis de los efectos provocados por el paso de las drogas a través de los sistemas generados.

Considerando la capacidad de los polímeros para formar puentes de hidrogeno^{117,118}, y la presencia de grupos polares tanto en IRI como en RHB, los cuales facilitan la generación de este tipo de enlaces,^{119,120} es que se analizó el número promedio de enlaces de hidrogeno generados con cada fase (solvente, PEG y PLA/PLGA) en el transcurso de las molécula farmacológicas, a través de cada modelo de nanopartícula generado, para así, determinar la relevancia de este tipo de interacciones en las curvas de fuerza obtenidas. Por otro lado, nuevamente se analizó el número de aguas que llega hasta el centro del sistema y la distancia promedio de los terminales de DSPE-PEG₂₀₀₀ al centro de masa de cada sistema con la finalidad de comprender y cuantificar los efectos del paso de RHB e IRI a través de cada uno de los modelos generados. En la tabla 1, se indica el promedio de enlaces de hidrogeno entre rodamina y los tres medios que atraviesa el fluoróforo, para cada una de las tres réplicas de SMD ejecutadas. Junto con, el número promedio de moléculas de agua presentes en el núcleo de los sistemas y de distancia entre las terminaciones y el centro de masa de las nanosuperficies, en el último punto del proceso de dinámica molecular dirigida.

Lo primero que se puede observar, es que el número de puentes de hidrogeno generados entre RHB y el solvente, es casi 6 veces mayor respecto a los reportados cuando la molécula atraviesa tanto PLA/PLGA como DSPE-PEG₂₀₀₀. Mientras que, la diferencia en los valores promedio de los puentes de hidrogeno generados entre estos dos últimos, para cada modelo generado, no supera el orden decimal. Lo que no es concordante, con los valores presentados en las gráficas de fuerza obtenidas de SMD. Por lo que si bien, se ratifica la ocurrencia de este tipo de interacciones entre la RHB y los sistemas generados, no se presentaron indicios de que este tipo de interacciones favorezcan y describan la afinidad dada entre los sistemas nanopoliméricos y el biomarcador. Este mismo fenómeno, se repite para IRI (revisar tabla 1 anexo). Respecto al número de aguas presentes en el núcleo y la distancia promedio de los terminales al centro de masa de cada sistema, en los puntos finales de simulación, es posible observar que, los sistemas que tienen núcleo basado en

PLGA, presentan una distancia terminal-centro de masa menor que los compuestos por PLA, lo cual podría asociarse a un menor grado de apertura de las nanopartículas, aumentando el tiempo del proceso de liberación de fármaco. Lo cual se correlaciona, con las diferencias de valores de fuerza obtenidos en el proceso de SMD, entre ambos tipos de sistemas. Por otro lado, nuevamente, al igual que ocurre en los resultados presentados en la figura 13, los sistemas con terminales COO⁻ presentan distancias mayores al centro de masa respecto a los terminales amino y metoxilo, lo cual podría traducirse en que estos se encontrarían más abiertos. Mientras que, el sistema NH₂-PLGA presenta el menor valor de distancia promedio para los modelos asociados con RHB, lo cual podría estar asociado a que este complejo sea el que presenta los valores de fuerza más altos, durante el tracto más largo según los resultados indicados en la figura 15.

Tabla 1: Resumen de propiedades estructurales e interacciones de hidrogeno asociadas al paso de RHB a través de los sistemas generados.

Sistema	Nº prom. de puentes de hidrogeno con acuosa.	Nº prom. de puentes de hidrogeno con núcleo (PLA/PLGA).	Nº prom. de puentes de hidrogeno con DSPE-PEG ₂₀₀₀ .	Nº aguas presentes en el núcleo.	X de distancia de los terminales al centro de masa (Å)
COO ⁻ /PLA	6,94	1,36	1,34	810	95,06
COO ⁻ /PLGA	6,92	1,45	1,32	874	91,02
OCH ₃ /PLA	7,06	1,43	1,27	843	90,40
OCH ₃ /PLGA	5,53	1,52	1,22	1009	89,70
NH ₂ /PLA	6,98	1,39	1,25	776	91,37
NH ₂ /PLGA	6,85	1,56	1,28	719	87,65

6. Conclusiones

El uso de técnicas computacionales en el estudio y caracterización de las propiedades fisicoquímicas de complejos nanopoliméricos, ha demostrado ser un foco necesario y altamente atractivo en etapas previas a pruebas experimentales in-vitro e in-vivo, permitiendo generar información valiosa asociada a los procesos y mecanismos que gobiernan la interacción con el medio en el cual se encuentran las nanopartículas, la afinidad por fármacos antitumorales y la cinética de liberación asociada a estos.

Por lo cual, se hace necesario destacar que la combinación de técnicas computacionales como SMD, junto con modelos que permitan optimizar gastos computacionales, sin perder representatividad de las características físico-químicas del sistema ideal, permite generar una mayor cantidad de información en tiempos de trabajo razonables. Lo cual, fue una de las aristas conseguidas en el trabajo realizado.

Respecto a los resultados obtenidos en la presente memoria de título, es posible establecer que, en primer lugar, se encontró evidencia de que la conjugación de diferentes terminales (COO^- , NH_2 y OCH_3) en DSPE-PEG₂₀₀₀, confiere a la nanopartícula características físico-químicas que se relacionan con su grado de compactación, donde; en el caso de sistemas que poseen terminaciones COO^- , las ramificaciones de DSPE-PEG₂₀₀₀ se encuentran más alejadas del centro de masa del sistema, es decir, se logran sistemas menos compactos. Caso contrario de lo que ocurre al aplicar modelos con terminales NH_2 y OCH_3 , donde se logran sistemas más compactos, lo cual podría afectar la cinética de liberación del fármaco. Sin embargo, más determinante que lo anterior, es la naturaleza del núcleo que compone a estos nanosistemas, donde gracias a los resultados obtenidos en SMD, se obtuvo evidencia que sustenta que la región donde existe la mayor afinidad por drogas terapéuticas como Irinotecan y rodamina B es el “core” polimérico de la nanopartícula. Además, la preferencia de las drogas por PLGA sobre PLA, podría estar asociada a procesos de liberación de fármaco en periodos de tiempo más prolongados respecto a sistemas basados en PLA. La conjugación de los distintos terminales en combinación con la variación en la

naturaleza del núcleo hidrofóbico de los nanocarriers modelados en este trabajo, otorga información valiosa para el desarrollo de nuevos modelos de nanopartículas aplicables en nanomedicina, y con especial énfasis en estrategias terapéuticas que requieran tasas de liberación específicas en el combate con el cáncer colorrectal. Sin embargo, aún es necesario comprender, otras interrogantes, como ¿el cómo afecta la variación en la proporción de cada elemento en la capacidad de carga y descarga del nanocarrier?, ¿Cuáles son las consecuencias de modificar los largos de los polímeros utilizados?, ¿Qué implicancias tiene aplicar más de un tipo de terminal en la estructura de la nanopartícula? Todas estas preguntas son necesarias de responder, para generar modelos cada vez más fiables y efectivos.

7. Bibliografía

1. Hegde, P. S. & Chen, D. S. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. *Immunity* **52**, 17–35 (2020).
2. Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. & Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **25**, 16–27 (2016).
3. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
4. What Is Cancer? - NCI. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (2007).
5. Cline, M. J. Keynote address: The role of proto-oncogenes in human cancer: Implications for diagnosis and treatment. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **13**, 1297–1301 (1987).
6. Vogelstein, B. *et al.* Cancer Genome Landscapes. *Science* **339**, 1546–1558 (2013).
7. Pelham, C. J., Nagane, M. & Madan, E. Cell competition in tumor evolution and heterogeneity: Merging past and present. *Semin. Cancer Biol.* **63**, 11–18 (2020).
8. Jordan, C. T. Cancer stem cell biology: from leukemia to solid tumors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 708–712 (2004).
9. Saturnus, R., Vogt, T. & Reichrath, J. Update: Solar UV Radiation, Vitamin D, and Skin Cancer Surveillance in Organ Transplant Recipients (OTRs). *Adv. Exp. Med. Biol.* **1268**, 335–353 (2020).
10. Morrison, A. H., Byrne, K. T. & Vonderheide, R. H. Immunotherapy and Prevention of Pancreatic Cancer. *Trends Cancer* **4**, 418–428 (2018).
11. Woertler, K. Tumors and Tumor-Like Lesions of Peripheral Nerves. *Semin. Musculoskelet. Radiol.* **14**, 547–558 (2010).
12. Pérez-Herrero, E. & Fernández-Medarde, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **93**, 52–79 (2015).
13. Li, T. *et al.* TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Nucleic Acids Res.* **48**, W509–W514 (2020).
14. Lytle, N. K., Barber, A. G. & Reya, T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 669–680 (2018).
15. Swietach, P., Vaughan-Jones, R. D., Harris, A. L. & Hulikova, A. The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **369**, 20130099 (2014).
16. Markowitz, S. D. & Bertagnolli, M. M. Molecular Origins of Cancer. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2449–2460 (2009).
17. You, X. *et al.* Polymeric nanoparticles for colon cancer therapy: overview and perspectives. *J. Mater. Chem. B* **4**, 7779–7792 (2016).
18. Argilés, J. M. & Azcón-Bieto, J. The metabolic environment of cancer. *Mol. Cell. Biochem.* **81**, 3–17 (1988).
19. Donoso D, A., Villarroel del P, L. & Pinedo M, G. Aumento de la mortalidad por cáncer de colon en Chile, 1990-2003. *Rev. Médica Chile* **134**, 152–158 (2006).
20. Laura Itriago, G., Nicolas Silva, I. & Giovanna Cortes, F. Cancer en Chile y el mundo: Una mirada epidemiológica, presente y futuro. *Rev. Médica Clínica Las Condes* **24**, 531–552 (2013).
21. Rodríguez-Fraile, M. *et al.* FDG PET/TC en el cáncer colorrectal. *Rev. Esp. Med. Nucl. E*

- Imagen Mol.* **39**, 57–66 (2020).
22. Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W. & Burt, R. W. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* **138**, 2044–2058 (2010).
 23. Gajardo-González, D. A. *et al.* Factores asociados al estilo de vida en pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal en un Hospital de Chile. *Perspect. En Nutr. Humana* **20**, 39–48 (2018).
 24. Wolpin, B. M. & Mayer, R. J. Systemic Treatment of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **134**, 1296–1310 (2008).
 25. Sullivan, R. *et al.* Global cancer surgery: delivering safe, affordable, and timely cancer surgery. *Lancet Oncol.* **16**, 1193–1224 (2015).
 26. Holsti, L. R. Development Of Clinical Radiotherapy Since 1896. *Acta Oncol.* **34**, 995–1003 (1995).
 27. Hwang, J. J., Eisenberg, S. G. & Marshall, J. L. Improving the toxicity of irinotecan/5-FU/leucovorin: a 21-day schedule. *Oncol. Williston Park N* **17**, 37–43 (2003).
 28. Häfner, M. F. & Debus, J. Radiotherapy for Colorectal Cancer: Current Standards and Future Perspectives. *Visc. Med.* **32**, 172–177 (2016).
 29. Ahles, T. A. & Root, J. C. Cognitive Effects of Cancer and Cancer Treatments. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* **14**, 425–451 (2018).
 30. Xu, Y. & Villalona-Calero, M. A. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann. Oncol.* **13**, 1841–1851 (2002).
 31. Battula, H. *et al.* Distinct rhodamine B derivatives exhibiting dual effect of anticancer activity and fluorescence property. *J. Photochem. Photobiol.* **6**, 100026 (2021).
 32. Crosby, G. A. & Demas, J. N. Measurement of photoluminescence quantum yields. Review. *J. Phys. Chem.* **75**, 991–1024 (1971).
 33. Gutiérrez, M. C., Hortigüela, M. J., Ferrer, M. L. & del Monte, F. Highly Fluorescent Rhodamine B Nanoparticles Entrapped in Hybrid Glasses. *Langmuir* **23**, 2175–2179 (2007).
 34. Miller, A. B., Hoogstraten, B., Staquet, M. & Winkler, A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* **47**, 207–214 (1981).
 35. Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E. & Rodríguez Yoldi, M. J. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 197 (2017).
 36. Chabner, B. A. & Roberts, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 65–72 (2005).
 37. Avitabile, E., Bedognetti, D., Ciofani, G., Bianco, A. & Delogu, L. G. How can nanotechnology help the fight against breast cancer? *Nanoscale* **10**, 11719–11731 (2018).
 38. Mohanraj, V. J. & Chen, Y. Nanoparticles - A review. *Trop. J. Pharm. Res.* **5**, 561–573 (2006).
 39. Capaldi Arruda, S. C., Diniz Silva, A. L., Moretto Galazzi, R., Antunes Azevedo, R. & Zezzi Arruda, M. A. Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta* **131**, 693–705 (2015).
 40. Riehemann, K. *et al.* Nanomedicine – challenge and perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **48**, 872–897 (2009).
 41. Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.-K. & Zweck, A. The emerging nanomedicine landscape. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1211–1217 (2006).

42. Yu, H. & De Geest, B. G. Nanomedicine and cancer immunotherapy. *Acta Pharmacol. Sin.* **41**, 879–880 (2020).
43. Buzea, C., Pacheco, I. I. & Robbie, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* **2**, MR17-71 (2007).
44. Xia, Y., Xiong, Y., Lim, B. & Skrabalak, S. E. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics? *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 60–103 (2009).
45. Kim, B. Y. S., Rutka, J. T. & Chan, W. C. W. Nanomedicine. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2434–2443 (2010).
46. Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R. & Farokhzad, O. C. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 20–37 (2017).
47. Zhang, L. *et al.* Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 761–769 (2008).
48. Garbayo, E. *et al.* Nanomedicine and drug delivery systems in cancer and regenerative medicine. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology* **12**, e1637 (2020).
49. Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V. & Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J. Controlled Release* **200**, 138–157 (2015).
50. Matus, M. F., Ludueña, M., Vilos, C., Palomo, I. & Mariscal, M. M. Atomic-level characterization and cilostazol affinity of poly(lactic acid) nanoparticles conjugated with differentially charged hydrophilic molecules. *Beilstein J. Nanotechnol.* **9**, 1328–1338 (2018).
51. Gonda, A. *et al.* Engineering Tumor-Targeting Nanoparticles as Vehicles for Precision Nanomedicine. *Med One* **4**, e190021 (2019).
52. Ahlawat, J., Henriquez, G. & Narayan, M. Enhancing the Delivery of Chemotherapeutics: Role of Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **23**, 2157 (2018).
53. Qi, F., Wu, J., Li, H. & Ma, G. Recent research and development of PLGA/PLA microspheres/nanoparticles: A review in scientific and industrial aspects. *Front. Chem. Sci. Eng.* **13**, 14–27 (2019).
54. Tsuji, H. Poly(lactide) Stereocomplexes: Formation, Structure, Properties, Degradation, and Applications. *Macromol. Biosci.* **5**, 569–597 (2005).
55. Matsumoto, A., Matsukawa, Y., Suzuki, T., Yoshino, H. & Kobayashi, M. The polymer-alloys method as a new preparation method of biodegradable microspheres: principle and application to cisplatin-loaded microspheres. *J. Controlled Release* **48**, 19–27 (1997).
56. Li, Q., Liu, X., Yan, W. & Chen, Y. Antitumor effect of poly lactic acid nanoparticles loaded with cisplatin and chloroquine on the oral squamous cell carcinoma. *Aging* **13**, 2593–2603 (2020).
57. Lee, B. K., Yun, Y. & Park, K. PLA micro- and nano-particles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **107**, 176–191 (2016).
58. Bao, L.-L., Huang, H.-Q., Zhao, J., Nakashima, K. & Gong, Y.-K. Preparation and characterization of zwitterionic phospholipid polymer-coated poly(lactic acid) nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **25**, 1703–1716 (2014).
59. Gangapurwala, G., Vollrath, A., De San Luis, A. & Schubert, U. S. PLA/PLGA-Based Drug Delivery Systems Produced with Supercritical CO₂—A Green Future for Particle Formulation?

- Pharmaceutics* **12**, 1118 (2020).
60. Ghasemi, R. *et al.* mPEG-PLA and PLA-PEG-PLA nanoparticles as new carriers for delivery of recombinant human Growth Hormone (rhGH). *Sci. Rep.* **8**, 9854 (2018).
 61. Essa, S., Rabanel, J. M. & Hildgen, P. Characterization of rhodamine loaded PEG-g-PLA nanoparticles (NPs): Effect of poly(ethylene glycol) grafting density. *Int. J. Pharm.* **411**, 178–187 (2011).
 62. Moreno, D. *et al.* Characterization of cisplatin cytotoxicity delivered from PLGA-systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68**, 503–512 (2008).
 63. Gryparis, E. C., Hatziapostolou, M., Papadimitriou, E. & Avgoustakis, K. Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **67**, 1–8 (2007).
 64. Emami, J. *et al.* PLGA-PEG-RA-based polymeric micelles for tumor targeted delivery of irinotecan. *Pharm. Dev. Technol.* **23**, 41–54 (2018).
 65. Zahr, A. S., de Villiers, M. & Pishko, M. V. Encapsulation of Drug Nanoparticles in Self-Assembled Macromolecular Nanoshells. *Langmuir* **21**, 403–410 (2005).
 66. Zheng, J. *et al.* Enhancement of Surface Graft Density of MPEG on Alginate/Chitosan Hydrogel Microcapsules for Protein Repellency. *Langmuir* **28**, 13261–13273 (2012).
 67. Pasquinelli, M. A. & Yingling, Y. G. Molecular Dynamics Simulations of Nano-Bio Materials. in *Encyclopedia of Nanotechnology* (ed. Bhushan, B.) 1454–1463 (Springer Netherlands, 2012). doi:10.1007/978-90-481-9751-4_402.
 68. Tian, P. Molecular dynamics simulations of nanoparticles. *Annu. Rep. Sect. C Phys. Chem.* **104**, 142–164 (2008).
 69. Hogg, T. & Huberman, B. A. Understanding biological computation: reliable learning and recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 6871–6875 (1984).
 70. Buonfiglio, R., Recanatini, M. & Masetti, M. Protein Flexibility in Drug Discovery: From Theory to Computation. *ChemMedChem* **10**, 1141–1148 (2015).
 71. Miao, Y., Feher, V. A. & McCammon, J. A. Gaussian Accelerated Molecular Dynamics: Unconstrained Enhanced Sampling and Free Energy Calculation. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3584–3595 (2015).
 72. Proctor, E. A. & Dokholyan, N. V. APPLICATIONS OF DISCRETE MOLECULAR DYNAMICS IN BIOLOGY AND MEDICINE. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **37**, 9–13 (2016).
 73. Collier, T. A., Piggot, T. J. & Allison, J. R. Molecular Dynamics Simulation of Proteins. in *Protein Nanotechnology: Protocols, Instrumentation, and Applications* (eds. Gerrard, J. A. & Domigan, L. J.) 311–327 (Springer US, 2020). doi:10.1007/978-1-4939-9869-2_17.
 74. Lopes, P. E. M., Guvench, O. & MacKerell, A. D. Current Status of Protein Force Fields for Molecular Dynamics Simulations. in *Molecular Modeling of Proteins* (ed. Kukol, A.) 47–71 (Springer, 2015). doi:10.1007/978-1-4939-1465-4_3.
 75. Cournia, Z., Allen, B. & Sherman, W. Relative Binding Free Energy Calculations in Drug Discovery: Recent Advances and Practical Considerations. *J. Chem. Inf. Model.* **57**, 2911–2937 (2017).
 76. Abel, R., Wang, L., Harder, E. D., Berne, B. J. & Friesner, R. A. Advancing Drug Discovery through Enhanced Free Energy Calculations. *Acc. Chem. Res.* **50**, 1625–1632 (2017).

77. Roussey, N. M. & Dickson, A. Enhanced Jarzynski free energy calculations using weighted ensemble. *J. Chem. Phys.* **153**, 134116 (2020).
78. Liu, X. *et al.* Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **13**, 23–37 (2018).
79. Isralewitz, B., Gao, M. & Schulten, K. Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 224–230 (2001).
80. Nair, P. C. & Miners, J. O. Molecular dynamics simulations: from structure function relationships to drug discovery. *Silico Pharmacol.* **2**, 4 (2014).
81. Lu, H. & Schulten, K. Steered molecular dynamics simulations of force-induced protein domain unfolding. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **35**, 453–463 (1999).
82. Palmieri, B. & Ronis, D. Jarzynski equality: connections to thermodynamics and the second law. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **75**, 011133 (2007).
83. Computing Protein–Protein Association Affinity with Hybrid Steered Molecular Dynamics | Journal of Chemical Theory and Computation. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jctc.5b00340>.
84. Smith, T. J. MOLView: A program for analyzing and displaying atomic structures on the Macintosh personal computer. *J. Mol. Graph.* **13**, 122–125 (1995).
85. Casalini, T., Rossi, F., Castrovinci, A. & Perale, G. A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, (2019).
86. Stipa, P. *et al.* Prediction of drug-carrier interactions of PLA and PLGA drug-loaded nanoparticles by molecular dynamics simulations. *Eur. Polym. J.* **147**, 110292 (2021).
87. HU, J., WANG, J., WANG, G., YAO, Z. & DANG, X. Pharmacokinetics and antitumor efficacy of DSPE-PEG2000 polymeric liposomes loaded with quercetin and temozolomide: Analysis of their effectiveness in enhancing the chemosensitization of drug-resistant glioma cells. *Int. J. Mol. Med.* **37**, 690–702 (2016).
88. Takayama, R., Inoue, Y., Murata, I. & Kanamoto, I. Characterization of Nanoparticles Using DSPE-PEG2000 and Soluplus. *Colloids Interfaces* **4**, 28 (2020).
89. O’Boyle, N. M. *et al.* Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminformatics* **3**, 33 (2011).
90. Vanommeslaeghe, K., Raman, E. P. & MacKerell, A. D. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 3155–3168 (2012).
91. Knight, J. L., Yesselman, J. D. & Brooks III, C. L. Assessing the quality of absolute hydration free energies among CHARMM-compatible ligand parameterization schemes. *J. Comput. Chem.* **34**, 893–903 (2013).
92. Csizmadia, P. MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web. (1999) doi:10.3390/ecsoc-3-01775.
93. Martínez, L., Andrade, R., Birgin, E. G. & Martínez, J. M. PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* **30**, 2157–2164 (2009).
94. Phillips, J. C. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781–1802 (2005).
95. Oliveira, M. D. L. *et al.* Theoretical causes of the Brazilian P.1 and P.2 lineages of the SARS-

- CoV-2 virus through molecular dynamics. 2021.04.09.439181 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2021.04.09.439181> (2021).
96. Mark, P. & Nilsson, L. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *J. Phys. Chem. A* **105**, 9954–9960 (2001).
 97. Feller, S. E., Zhang, Y., Pastor, R. W. & Brooks, B. R. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *J. Chem. Phys.* **103**, 4613–4621 (1995).
 98. Best, R. B. *et al.* Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone ϕ , ψ and Side-Chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3257–3273 (2012).
 99. Guvench, O. & MacKerell, A. D. Comparison of Protein Force Fields for Molecular Dynamics Simulations. in *Molecular Modeling of Proteins* (ed. Kukol, A.) 63–88 (Humana Press, 2008). doi:10.1007/978-1-59745-177-2_4.
 100. MacKerell, A. D. *et al.* All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586–3616 (1998).
 101. Durrant, J. D. & McCammon, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol.* **9**, 71 (2011).
 102. Leimkuhler, B., Noorizadeh, E. & Penrose, O. Comparing the Efficiencies of Stochastic Isothermal Molecular Dynamics Methods. *J. Stat. Phys.* **143**, 921–942 (2011).
 103. Izrailev, S. *et al.* Steered Molecular Dynamics. in *Computational Molecular Dynamics: Challenges, Methods, Ideas* (eds. Deuffhard, P. *et al.*) 39–65 (Springer, 1999). doi:10.1007/978-3-642-58360-5_2.
 104. Do, P.-C., Lee, E. H. & Le, L. Steered Molecular Dynamics Simulation in Rational Drug Design. *J. Chem. Inf. Model.* **58**, 1473–1482 (2018).
 105. Park, S., Khalili-Araghi, F., Tajkhorshid, E. & Schulten, K. Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using Jarzynski's equality. *J. Chem. Phys.* **119**, 3559–3566 (2003).
 106. Park, S. & Schulten, K. Calculating potentials of mean force from steered molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* **120**, 5946–5961 (2004).
 107. Izrailev, S., Stepaniants, S., Balsera, M., Oono, Y. & Schulten, K. Molecular dynamics study of unbinding of the avidin-biotin complex. *Biophys. J.* **72**, 1568–1581 (1997).
 108. Fiorin, G., Klein, M. L. & Hémin, J. Using collective variables to drive molecular dynamics simulations. *Mol. Phys.* **111**, 3345–3362 (2013).
 109. Moreno-Villoslada, I. *et al.* pH Dependence of the Interaction between Rhodamine B and the Water-Soluble Poly(sodium 4-styrenesulfonate). *J. Phys. Chem. B* **110**, 11809–11812 (2006).
 110. Nunzio, M. R. di, Douhal, Y., Organero, J. A. & Douhal, A. Structural and photodynamic properties of the anti-cancer drug irinotecan in aqueous solutions of different pHs. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 14182–14191 (2018).
 111. Xu, L., Crawford, K. & Gorman, C. B. Effects of Temperature and pH on the Degradation of Poly(lactic acid) Brushes. *Macromolecules* **44**, 4777–4782 (2011).
 112. Khanal, S. *et al.* pH-Responsive PLGA Nanoparticle for Controlled Payload Delivery of Diclofenac Sodium. *J. Funct. Biomater.* **7**, 21 (2016).
 113. Maruyama, K. *et al.* Targeting efficiency of PEG-immunoliposome-conjugated antibodies at PEG terminals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **24**, 235–242 (1997).

114. Zheng, M. *et al.* Plga–lecithin–peg core-shell nanoparticles for cancer targeted therapy. *Nano LIFE* **02**, 1250002 (2012).
115. Sthoer, A. & Tyrode, E. Interactions of Na⁺ Cations with a Highly Charged Fatty Acid Langmuir Monolayer: Molecular Description of the Phase Transition. *J. Phys. Chem. C* **123**, 23037–23048 (2019).
116. Vuković, L. *et al.* Structure and Dynamics of Highly PEG-ylated Sterically Stabilized Micelles in Aqueous Media. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 13481–13488 (2011).
117. Asadzadeh, H. & Moosavi, A. Investigation of the interactions between Melittin and the PLGA and PLA polymers: molecular dynamic simulation and binding free energy calculation. *Mater. Res. Express* **6**, 055318 (2019).
118. Zhou, S. *et al.* Hydrogen Bonding Interaction of Poly(d,l-Lactide)/hydroxyapatite Nanocomposites. *Chem. Mater.* **19**, 247–253 (2007).
119. Fang, Y. *et al.* Complex Formation via Hydrogen bonding between Rhodamine B and Montmorillonite in Aqueous Solution. *Sci. Rep.* **8**, 229 (2018).
120. Onishi, H., Machida, Y. & Machida, Y. Antitumor Properties of Irinotecan-Containing Nanoparticles Prepared Using Poly(DL-lactic acid) and Poly(ethylene glycol)-block-poly(propylene glycol)-block-poly(ethylene glycol). *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 116–119 (2003).

Anexos

Tabla anexo 1: Resumen de propiedades estructurales e interacciones de hidrogeno asociadas al paso de IRI a través de los sistemas generados.

Sistema	Nº prom. De puentes de hidrogeno con acuosa.	Nº prom. De puentes de hidrogeno con núcleo (PLA/PLGA).	Nº prom. de puentes de hidrogeno con DSPE-PEG ₂₀₀₀ .	Nº aguas presentes en el núcleo.	X de distancia de los terminales al centro de masa (Å)
COO ⁻ /PLA	5,91	1,57	1,50	837	95.29
COO ⁻ /PLGA	5,82	1,88	1,61	893	93,12
OCH ₃ /PLA	6,32	1,81	1,56	769	85,03
OCH ₃ /PLGA	6,20	1,98	1,50	650	84,82
NH ₂ /PLA	6,16	1,98	1,58	781	90,40
NH ₂ /PLGA	6,15	2,24	1,47	528	85.62

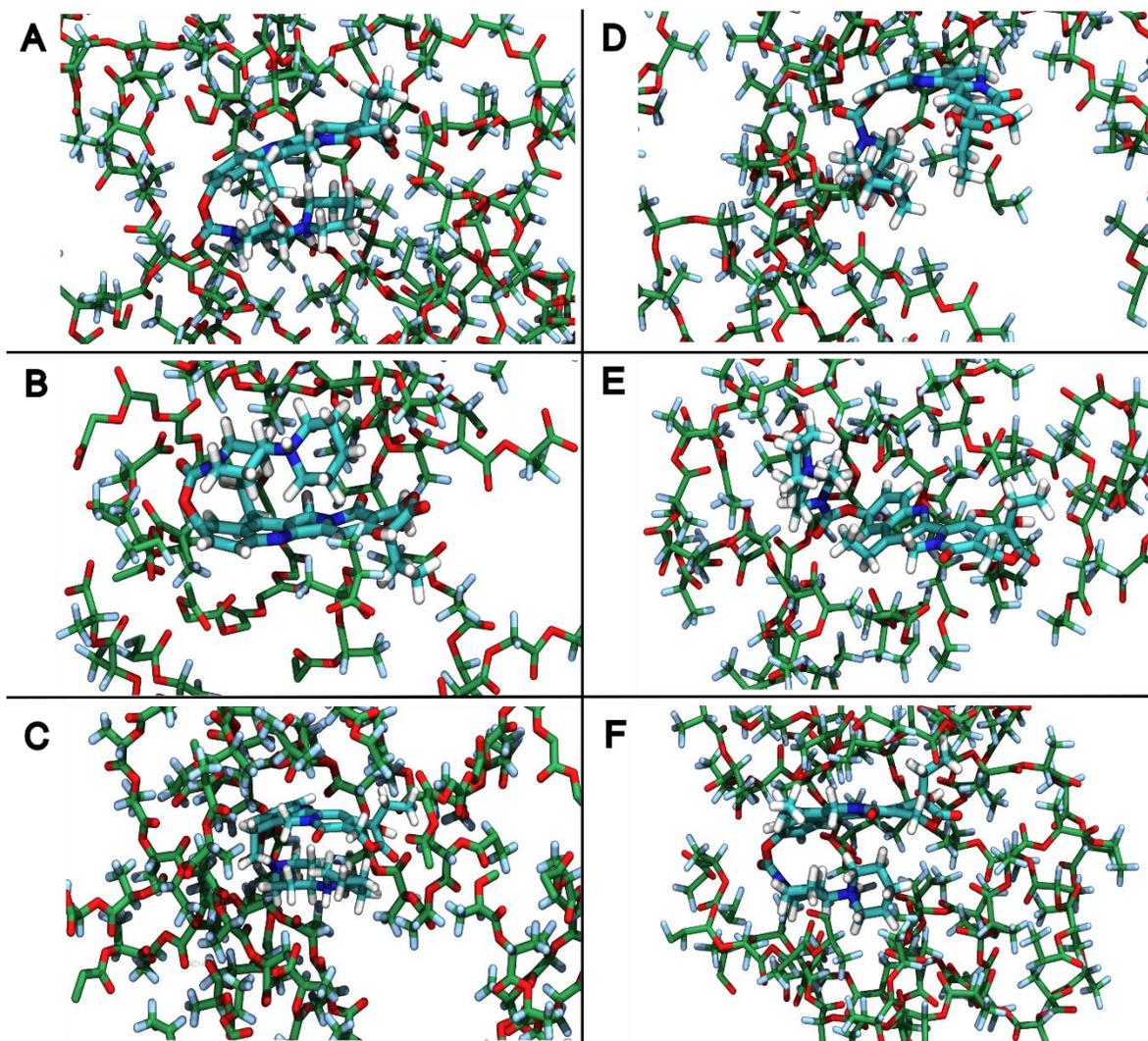


Figura anexa 1: Conformaciones estructurales adoptadas por IRI en los puntos fuerza máxima (50 ns). Cada letra hace alusión a los puntos de máxima fuerza indicados en la figura 15 correspondiendo a: A) PLGA-COO⁻, B) PLGA-NH₂, C) PLGA-OCH₃, D) PLA-COO⁻, E) PLA-NH₂ y F) PLA-OCH₃.