

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**



**CALCULO DE LA PERMEABILIDAD DE UN MODELO DE
MEMBRANA CELULAR HACIA DOS AGENTES
ANTIFIMICOS**

**POR:
ORLANDO FABRIZIO DELGADO MOTA**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

JULIO 2014

CÁLCULO DE LA PERMEABILIDAD DE UN MODELO DE
MEMBRANA CELULAR HACIA DOS AGENTES
ANTIFÍMICOS

Aprobación de la Tesis:

Dr. Víctor Manuel Rosas García
Director de Tesis

Dr. Eugenio Hernández Fernández
Co-Director de Tesis

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Dra. Lucía Cantú Cárdenas

Dr. Omar González Santiago

CÁLCULO DE LA PERMEABILIDAD DE UN MODELO DE
MEMBRANA CELULAR HACIA DOS AGENTES
ANTIFÍMICOS

DIRECTOR DE TESIS

Prof. Víctor Manuel Rosas García

RESUMEN

Orlando Fabrizio Delgado Mota

Fecha de graduación: Julio 2014

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

**Título del Estudio: CÁLCULO DE LA PERMEABILIDAD DE UN
MODELO DE MEMBRANA CELULAR HACIA
DOS AGENTES ANTIFÍMICOS**

Número de páginas: 51

**Candidato para el grado de Maestría
en Ciencias con orientación en Farmacia**

Área de Estudio: Farmacia

Propósito y Método de Estudio: La permeabilidad de los fármacos a través de las membranas celulares determina su biodisponibilidad oral. Un entendimiento de cómo interaccionan los fármacos con las membranas, podría ayudar en el proceso de selección de moléculas como candidatos a nuevos fármacos. En el presente proyecto de investigación pusimos a prueba la influencia del tamaño y la forma estructural de la molécula en el proceso de permeación. Se realizaron cálculos por medio de simulaciones de dinámica molecular para analizar el comportamiento de fármacos antifímicos y su interacción a diferentes profundidades de la membrana. A partir de los perfiles de Potencial de Fuerza Media se determinó la permeabilidad de la Pirazinamida y de la Cicloserina.

Contribuciones y Conclusiones: La permeabilidad calculada nos muestra que la Pirazinamida permea cinco veces más rápido que la Cicloserina, refutando la hipótesis de que la molécula de menor tamaño permearía con mayor rapidez.

En las gráficas de los Potenciales de Fuerza Media para ambos fármacos, se pudo observar como la Pirazinamida presenta una barrera de energía de ~ 221 kJ/mol hacia el centro de la membrana. La Cicloserina muestra una disminución de energía de hasta ~ -795 kJ/mol en el centro de la membrana, debido a los huecos formados por las colas lipídicas y al aprovechamiento de éstos por la molécula de Cicloserina. Esta disminución de energía en el centro de la bicapa muestra que la Cicloserina tiende a permanecer dentro de la membrana.

FIRMA DEL ASESOR: _____

Prof. Víctor Manuel Rosas García

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Víctor Manuel Rosas García, mi asesor de Tesis, por brindarme el tiempo y la paciencia necesarias para guiarme en el camino de la investigación. Corregirme en mis errores y siempre estar al pendiente de todas mis dudas. Por ser un modelo a seguir en la vida y también en lo académico. Me llevo grandes experiencias y el saber que puedo contar con su apoyo aún cuando ya no me encuentre en la maestría.

A la Dra. María del Rayo Camacho Corona, al Dr. Omar González Santiago y a la Dra. Lucía Cantú Cárdenas, mi comité tutorial, por atender siempre mis dudas y estar al pendiente de mis avances en la tesis y por buscar siempre que salga adelante.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para poder realizar mis estudios de posgrado.

A Virginia Tech por permitirme el uso de su equipo computacional para poder realizar parte de mi investigación realizada en esta Tesis.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 La membrana plasmática.....	1
1.2 Factores que determinan la permeabilidad en la membrana.....	2
1.3 La permeabilidad y su importancia en el descubrimiento de fármacos.....	3
1.4 El logP y el cLogP.....	4
1.5 Modelo computacional para la permeación de moléculas.....	5
1.6 La pirazinamida y la cicloserina como fármacos de estudio.....	7
2. ANTECEDENTES.....	9
2.1 Revisión bibliográfica.....	9
2.2 Hipótesis.....	15
3. METODOLOGÍA.....	16
3.1 Equipo.....	16
3.2 Software utilizado.....	16
3.3 Obtención de las topologías de los fármacos.....	16
3.3.1 Obtención de las cargas atómicas y perfiles de torsión.....	17
3.3.2 Obtención de los parámetros de Lennard-Jones.....	18
3.3.3 Predicción de la estabilidad termodinámica relativa de los polimorfos de la PZA.....	19
3.4 Obtención de los parámetros de la bicapa de DPPC.....	20
3.5 Conformación del sistema de simulación.....	20
3.6 Configuración del sistema de simulación.....	20
3.7 Construcción del sistema de simulación.....	21
3.8 Potencial de fuerza media.....	21

3.8.1 Simulaciones del US.....	22
3.8.2 Obtención del perfil del PFM.....	23
3.9 Cálculo de la Permeabilidad.....	23
3.9.1 Cálculo del coeficiente de difusión.....	24
3.10 Simulación del Benceno.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1 Validación de los parámetros.....	25
4.2 Estabilidad termodinámica relativa de los polimorfos de la PZA.....	26
4.3 Potencial de Fuerza Media.....	26
4.4 Cálculo de la Permeabilidad.....	32
5. CONCLUSIONES.....	34
5.1 Perspectivas a futuro.....	35
REFERENCIAS.....	36
APÉNDICE A. TOPOLOGÍA DE LA PIRAZINAMIDA	41
APÉNDICE B. TOPOLOGÍA DE LA CICLOSERINA	44
APÉNDICE C. CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA DE SIMULACIÓN.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura	página
1: Modelos de fosfolípidos en las membranas.....	2
2: Modelado computacional de fosfolípido.....	6
3: Pirazinamida y Cicloserina.....	8
4: Visualización en 3D de la Pirazinamida y Cicloserina.....	17
5: Polimorfo α de la Pirazinamida.....	18
6: Representación de un cristal del polimorfo α con 100 moléculas de PZA.....	19
7: Potencial de Fuerza Media de la Pirazinamida.....	27
8: Potencial de Fuerza Media de la Cicloserina.....	29
9: Potencial de Fuerza Media del Benceno.....	30
10: Comparación del los PFM del Benceno y Pirazinamida.....	31

ABREVIATURAS

ACPYPE	AnteChamberPYTHON Parser Interface
Caco2	Células de Carcinoma de Colon
CCS	Cicloserina
cLog P	Logaritmo de P calculado
COM	Center of Mass
DME	1,2-dimetoxietano
DMP	1,2-dimetoxipropano
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
Log D	Coefficiente de distribución
Log P	Coefficiente de Partición
NPT	Número de átomos, presión y temperatura del sistema constantes
NVT	Número de átomos, volumen y temperatura del sistema constantes
PAMPA	Parallel artificial membrane permeability assay
PFM	Potencial de Fuerza Media
PZA	Pirazinamida

SMD	Steered molecular dynamics
SPC	Simple Point Charge
TIP3p	Three-site transferrable intermolecular potential
US	Umbrella Sampling
WHAM	Weighted Histograms Analysis Method

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

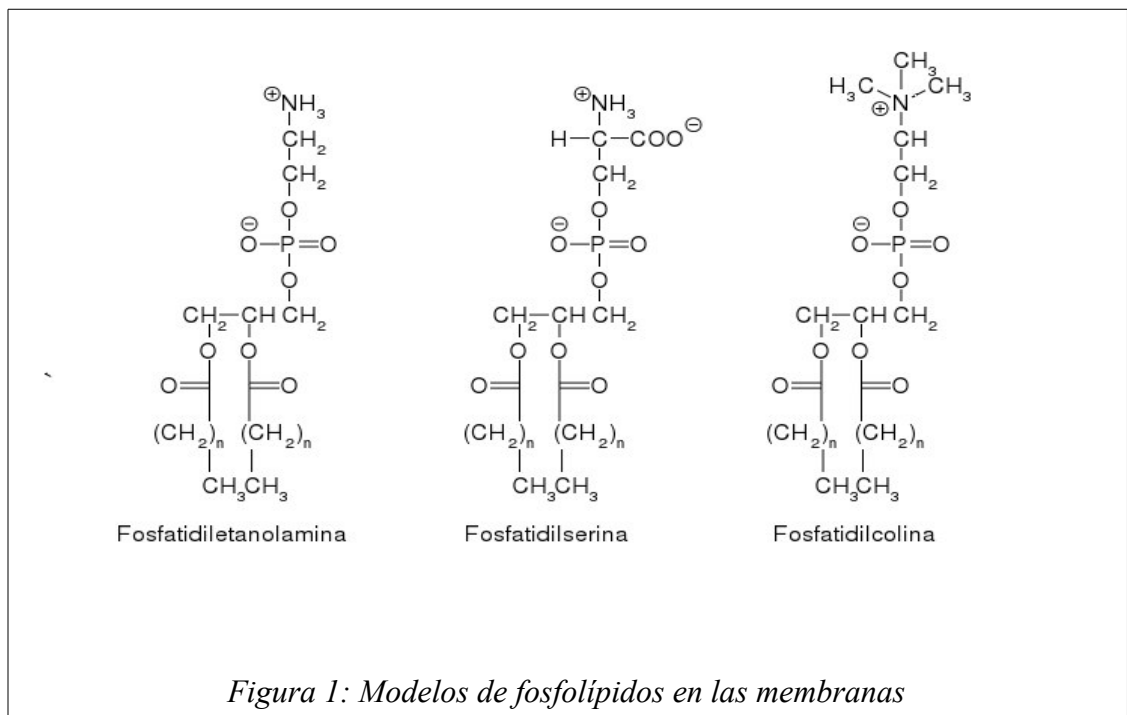
1.1 La membrana plasmática

La membrana plasmática es una bicapa lipídica que separa y protege los componentes químicos de la célula del medio externo. Está formada por dos capas de moléculas, específicamente por fosfolípidos, además de proteínas de membrana y colesterol. Mide aproximadamente 4 nm de grosor y cubre todo el exterior de la célula¹. Otras de sus funciones son mantener la composición iónica y el pH del citosol apropiado². La membrana cumple con la función de regular el transporte de sustancias hacia dentro y hacia fuera de la célula.

La membrana actúa como una barrera que previene la entrada de material no deseado desde el ambiente extracelular y la salida de metabolitos necesarios. Este paso de sustancias puede ser de modo pasivo o activo. El transporte activo es un mecanismo celular por medio del cual algunas moléculas atraviesan la membrana celular contra un gradiente de concentración, por lo que requiere energía adicional de la célula para ocurrir. El transporte pasivo es un transporte que ocurre a favor de un gradiente de concentración, es decir, de una solución más concentrada a una menos concentrada, sin necesidad de gasto de energía celular, ya que la fuerza impulsora es la diferencia del potencial químico.

1.2 Factores que determinan la permeabilidad en la membrana

Entre los factores que determinan el proceso de difusión se encuentra la composición de membrana, ya que no todas las membranas tienen la misma composición química. Los lípidos de las membranas biológicas tienen generalmente 16, 18 ó 20 carbonos de largo y presentan de 0 a 3 dobles enlaces³. Estos ácidos grasos se unen a los hidroxilos del glicerol, que a su vez va unido a un grupo fosfato. El fosfato se une mediante un enlace fosfodiéster a otro grupo de átomos que suele ser un grupo serina, etanolamina o una colina (figura 1).



La capacidad de un compuesto para permear una membrana por difusión pasiva depende de varios factores relacionados con las propiedades físico-químicas de la sustancia a permear.

Entre estos factores están los siguientes:

- Solubilidad en los lípidos: Las sustancias que se disuelven en los lípidos (moléculas hidrófobas, no polares) penetran con facilidad en la membrana dado que está compuesta en su mayor parte por fosfolípidos.
- Tamaño: la mayor parte de las moléculas de gran tamaño no pasan a través de la membrana. Sólo un reducido número de moléculas no polares de pequeño tamaño pueden atravesar la capa de fosfolípido.
- Carga: Las moléculas cargadas y los iones no pueden pasar, en condiciones normales, a través de la membrana. Estas especies requieren de un transportador activo⁴.

Otros factores importantes en la regulación del paso de la molécula de un lado al otro de la membrana que influyen en la capacidad para atravesar la membrana son la masa molecular, y la capacidad de formar puentes de hidrógeno con los componentes de la membrana.

1.3 La permeabilidad y su importancia en el descubrimiento de fármacos

La permeabilidad de las membranas juega un papel muy importante desde el punto de vista farmacéutico. La permeabilidad relativa a un fármaco, se refiere a la capacidad que tiene una molécula del fármaco para atravesar la bicapa lipídica⁵. El paso de los fármacos a través de la membrana es crucial para la biodisponibilidad⁶.

La farmacocinética es la rama de la farmacología encargada del estudio del paso de los fármacos a través del organismo en función de tiempo y dosis (biodisponibilidad). Un

fármaco que no es capaz de atravesar las membranas celulares, tiene una biodisponibilidad muy baja, lo que resulta en un incremento de dosis para obtener el efecto terapéutico.

En investigación de nuevos fármacos, la biodisponibilidad del fármaco es un factor determinante si se debe seguir considerando al fármaco como posible candidato o debe ser descartado. Es por eso que consideramos que la permeabilidad de los fármacos debe ser un tema de primordial importancia en la investigación de nuevos compuestos contra las enfermedades.

1.4 El logP y el cLogP

Experimentalmente se puede estimar la permeabilidad del fármaco por medio de la lipofilidad (logP) aunque esta determinación experimental es muy tardada y es propensa a errores.

El logP indica si el compuesto es más afín a un ambiente hidrofílico o lipofílico. Si es más afín a un ambiente lipofílico, difundirá más fácilmente hacia el interior de la membrana. Para esta determinación se utiliza el agua como la fase hídrica y 1-octanol para la fase lipídica, sin embargo, esta molécula es muy corta longitudinalmente en comparación con los componentes lipídicos de una membrana (de 16 a 18 carbonos). Su región polar no es tan fuertemente cargada como la que contienen los fosfolípidos.

Una forma computarizada del logP es el cLogP (logaritmo de P calculado), donde se utilizan softwares especializados para determinar la lipofilidad de la molécula. La determinación se hace asignándole un valor positivo o negativo a cada grupo funcional que

integra la molécula y, dependiendo de la sumatoria total, es la determinación de si es una molécula hidrofílica o lipofílica.

Los softwares utilizados para el cálculo del cLogP tienen ciertas limitaciones, ya que son capaces de determinar el logP de manera eficiente de moléculas ya reportadas con anterioridad, el problema reside cuando intentan utilizarlos para moléculas nuevas o en proceso de investigación. Los cálculos se vuelven imprecisos y cada software arroja valores diferentes para un mismo compuesto, por lo cual lo hace un método dudoso.

1.5 Modelo computacional para la permeación de moléculas.

En la actualidad, las simulaciones de dinámica molecular se han convertido en una herramienta útil para el estudio del comportamiento de las membranas lipídicas. Los recientes avances en la simulación y la mayor disponibilidad de recursos computacionales están permitiendo simulaciones de membranas más detalladas y en un menor tiempo de cómputo. Estas simulaciones tienen aplicaciones en diferentes áreas de la química y biología, y el área farmacéutica es una de ellas, como por ejemplo en el cálculo de la permeabilidad de la membrana hacia los fármacos, así como mostrar las interacciones que pueden existir entre el fármaco y la membrana.

La química computacional permite entender, desde un punto de vista fisicoquímico, como los fármacos (en nuestro estudio, los antifímicos) pueden interaccionar con los componentes de las membranas lipídicos. Por medio de técnicas de dinámica molecular, es posible simular una bicapa de fosfolípidos, que represente una membrana celular, y determinar los factores como energía libre, coeficientes de difusión del fármaco y el

potencial de fuerza media, que permitan comprender las interacciones entre el fármaco y la membrana.

Los modelos de bicapas constituidas únicamente por fosfolípidos (figura 2) son generalmente aceptados como buenos modelos de las membranas celulares⁷. La dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) es uno de los componentes lipídicos más ampliamente utilizado para la elaboración de modelos de las membranas celulares. Ésta molécula ha sido extensamente usada tanto experimentalmente como computacionalmente y es uno de los sistemas más estudiados en simulación.

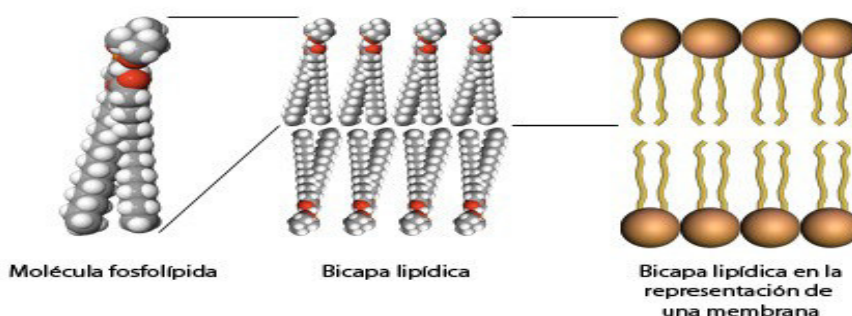


Figura 2: Modelado computacional de fosfolípido

El uso de estas simulaciones permite una mayor comprensión de los posibles mecanismos de permeación. A etapas tempranas en el desarrollo de fármacos se podrían detectar aquellas moléculas que serán capaces de atravesar las membranas y por lo tanto llegar a su diana terapéutica y descartarse y dejar de invertir en las moléculas que no serán capaces de atravesar la membrana. Con las simulaciones podrán solo escogerse aquellos compuestos que presenten mayor posibilidad de ejercer un efecto terapéutico.

Otra ventaja de usar las simulaciones de dinámica molecular es que puede aportar información acerca de los posibles maneras de organización de las diferentes regiones de la bicapa de fosfolípidos, en función de la energía libre, la difusión y la resistencia local a la permeabilidad. Además proporciona un panorama tridimensional para su estudio molecular, mientras que en los experimentos como los usados en el método Caco2 o método PAMPA solo puede aproximarse a la membrana como una barrera uniforme⁸.

1.6 La pirazinamida y la cicloserina como fármacos de estudio

Los fármacos que se utilizaron en el presente estudio son la pirazinamida (PZA) y la cicloserina (CCS). Ambos pertenecen a la familia de los antifímicos, fármacos usados contra la bacteria de la tuberculosis.

La PZA (figura 3) es un derivado sintético de la nicotinamida con un potente efecto esterilizante sobre los bacilos que se encuentran dentro de los macrófagos. Es un profármaco que se convierte a su forma activa, el ácido piracínico, por la acción de la enzima micobacteriana “piracinamidasa”⁹.

La PZA difunde pasivamente al interior de la bacteria, donde es convertida en ácido piracínico que se acumula intracelularmente por un sistema ineficiente de bombeo. Actúa disminuyendo el pH de la bacteria, inhibiendo una enzima implicada en la síntesis de los ácidos micólicos¹⁰.

La CCS, (4-amino-3-isoxazolidiona) (Figura 3) es un inhibidor competitivo de las enzimas D-alanil-D-alanina sintasa, alanina racemasa y alanina permasa, por ser un análogo de la

D-alanina. Estas enzimas son fundamentales en la síntesis de la pared micobacteriana¹¹. Es efectiva frente a todas las micobacterias, así como frente a otros microorganismos: *Enterobacter sp.*; *Escherichia coli*; *Mycobacterium avium*; *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium avium-intracellulare* entre otros.

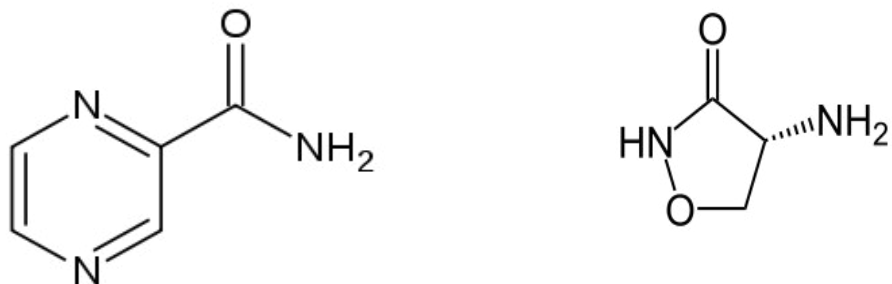


Figura 3: Pirazinamida (izquierda) y Cicloserina (derecha)

Los fármacos con acción antituberculosa son de primordial interés para nuestro equipo de investigación. Los fármacos se seleccionaron por tener similitudes estructurales en cuanto a forma y tamaño, lo cual nos permitirá analizar la influencia de los grupos funcionales y la relación del tamaño con el proceso de la permeabilidad.

Los demás fármacos antifímicos no están tomados en cuenta para esta tesis, debido a que poseen estructuras muy variadas y de alto peso molecular. Estos fármacos serán estudiados en el futuro, ya que entre los planes del equipo de investigación está el análisis de todos los antifímicos y su interacción con la membrana en el proceso de permeación.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

Se han reconocido muchas propiedades moleculares relacionadas al proceso de difusión pasiva del fármaco, tales como, el peso molecular, el estado de ionización, la capacidad de formar puentes de hidrógeno, el coeficiente de distribución ($\log D$) y el coeficiente de partición ($\log P$). Pero el uso del coeficiente de partición octanol/agua para la descripción de permeabilidad de membranas puede no ser el más adecuado como modelo debido a las diferencias entre la interfase octanol/agua y las membranas celulares: entre otros las cadenas de octanol son demasiado cortas, la interfase es una monocapa y no una bicapa y las cabezas polares en el octanol no tienen carga eléctrica.

Dado que experimentalmente requiere de mucho tiempo para que se llegue al equilibrio entre las fases, se prefiere realizar el $c\log P$, el cual muestra una gran dispersión en sus resultados de acuerdo al algoritmo de cálculo empleado¹².

2.1 Revisión bibliográfica

Bassolino-Klimas, Alper y Stouch¹³ fueron los primeros en realizar simulaciones de dinámica molecular a nivel atómico en membranas. Ellos simularon la difusión de benceno en una bicapa de 36 moléculas de dimiristoilfosfatidilcolina dispuestas en 2 monocapas. Su estudio concluyó que los solutos pequeños al atravesar la membrana no afectaban el grosor de la misma, pero que existe un reacomodo en el área de la región hidrocarbonada. Este reacomodo era debido a cambios en los ángulos de torsión en las

cadena lipídica formando pequeños huecos en la membrana. El benceno utilizaba estos huecos para difundir dando pequeños saltos (hopping), mecanismo similar a la de difusión de gases en polímeros suaves.

La teoría del polímero suave propuesta por Lieb y Stein¹⁴ en 1969 afirma que los solutos (gases) difunden en forma de saltos o hopping aprovechando los huecos formados por los cambios en la región de las cadenas acílicas.

Una investigación similar a la de Bassolino-Klimas fue la realizada por los investigadores Marrink y Berendsen¹⁵ calculando por medio de dinámica molecular la permeabilidad de la membrana hacia moléculas de agua. Propusieron un método para calcular los valores de permeabilidad utilizando el ΔG obtenido del Potencial de Fuerza Media a determinadas profundidades de la membrana.

Entre sus conclusiones proponen que la bicapa se puede dividir en cuatro regiones: 1) la región donde aparecen las cabezas polares pero con poca densidad; 2) una región de alta densidad de las cabezas polares y una densidad nula de moléculas de agua; 3) una región ordenada de las cadenas lipídicas; y por último 4) una región desordenada de las colas lipídicas.

Calcularon que la barrera de energía para una molécula de agua es de 25 KJ/mol y que la constante de difusión varía dependiendo de la profundidad de la membrana. La barrera de energía libre se presenta en la región 2, esto concuerda con los estudios realizados por Griffith, Dehlinger y Van¹⁶ en su estudio de la heterogeneidad de los fosfolípidos en

relación al perfil de polaridad en la membrana. Ellos concluyeron que la barrera de energía mas alta para la permeabilidad de compuestos polares se encuentra en la región de las cabezas polares. La región 3 es la región mas restringida para la permeación de los solutos debido a que las cadenas lipídicas se encuentran de manera ordenada impidiendo la formación de huecos; y la región de las colas lipídicas (región 4) es la de mayor difusión por un incremento en la formación de huecos donde las moléculas difunden mas fácilmente.

En 1994 Bassolino-Klimas¹⁷ y su equipo de investigación profundizaron en el estudio de las interacciones entre el benceno y la bicapa lipídica. Realizaron simulaciones variando las temperaturas del sistema entre 300 y 340 K analizando la influencia de la temperatura en la permeación del benceno. Concluyeron que a 310 K el benceno emigra hacia el centro de la bicapa y a 340 K el benceno permanecía cerca de la región de las cabezas polares. Con lo cual mostró que se debe ser cuidadoso con la selección de temperatura de la simulación.

Marrink and Berendsen¹⁸ continuaron con sus estudios de simulación de dinámica molecular para analizar la influencia de la hidrofobicidad de los compuestos en la permeación de membranas. Calcularon el coeficiente de permeabilidad del agua, el oxígeno y el amonio a través de una bicapa de DPPC. Entre sus conclusiones comentaron que el potencial de fuerza media del agua y del amonio es muy similar, presentando la barrera de energía más alta en la región de los grupos polares. También concluyeron que el oxígeno, por ser un grupo hidrofóbico, presenta una mayor facilidad para difundir al interior de la membrana. El oxígeno presenta una barrera de energía de -10.7 kJ/mol en el interior de la membrana, mientras que el amonio y el agua presentan barreras de 15 kJ/mol y 25 kJ/mol respectivamente.

Ulander y Haymet¹⁹, calcularon los coeficientes de difusión del ácido valpróico y el valproato utilizando una bicapa de dipalmitoilfosfatidilcolina. Obtuvieron una constante de difusión de $\sim 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y de $\sim 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para el valproato/ácido valpróico respectivamente. Concluyeron que la permeabilidad de las especies protonadas se debía a la formación de “dedos de agua” en la superficie de la membrana, que facilita la permeación al interior de la membrana.

El uso de simulaciones de dinámica molecular ha sido de gran ayuda para adquirir una mayor comprensión de las interacciones de las membranas con moléculas de interés científico, no solo para la interacción con fármacos.

Alper y Stouch²⁰ analizaron las interacciones de un análogo del nifedipino en la fase acuosa y en el interior de la membrana. Concluyeron que el análogo del fármaco experimentaba

una fuerte interacción con las cabezas polares de la bicapa así como con varias moléculas de agua. Esta interacción se debía a la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo amino del anillo del nifedipino y el oxígeno carbonílico de los ésteres de los ácidos grasos y con los hidrógenos de las moléculas de agua. Esto provocaba una orientación relativa a la normal de la bicapa y en este punto de la membrana mostraba la mayor barrera de energía para el paso del nifedipino al interior de la membrana.

Se han utilizado las técnicas de dinámica molecular para calcular la permeabilidad de péptidos demostrando la aceptación de este método. Stenberg P.²¹ utilizó la dinámica molecular para predecir la permeabilidad de la membrana a 19 oligopéptidos y comparando sus resultados con la permeabilidad epitelial intestinal utilizando una monocapa de células humanas procedentes de cáncer de colon (Caco2).

Otro estudio de permeabilidad en membranas fue el realizado por Li-li Chen²². Su estudio se basó en analizar un conjunto de 22 compuestos estructuralmente diferentes y con una permeabilidad celular calculada. La Dinámica Molecular se utilizó para determinar las interacciones de cada compuesto con una membrana de dimiristoilfosfatidilcolina. Concluyendo que la permeabilidad no solo se basa en las propiedades estructurales de los compuestos, pero que sí influye en gran medida para la interacción de la membrana.

En la actualidad los estudios de permeabilidad de diferentes compuestos en membranas por vía computacional han ido tomando mayor importancia. Se han mejorado las técnicas de simulación para mejorar los muestreos dentro de las membranas y obtener mejores resultados.

En el año 2012 Samanta, Hezaveh y Milano²³ realizaron estudios de permeabilidad para los compuestos 1,2-dimetoxietano (DME) y el 1,2-dimetoxipropano (DMP) a través de una bicapa de 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC). Ellos calcularon las barreras de energía libre de estos compuestos a través de simulaciones de dinámica molecular utilizando el método de muestreo de paraguas (US por su nombre en inglés Umbrella Sampling). Concluyeron que las barreras de energía fueron de ~20 kJ/mol para el DME y de ~12 kJ/mol para el DMP. Esta diferencia de energía muestra que el DMP tiene una menor barrera de energía lo que permite que este compuesto sea capaz de permear al interior de la membrana, mientras que el DME se quedaba en la región de las cabezas polares.

En el 2013 Meng y Xu²⁴ al igual que la investigación de Samanta utilizaron el US para predecir la permeabilidad de fármacos en membranas de DPPC. Ellos utilizaron la doxorubicina, el ibuprofeno y el atenolol como fármacos de estudio. Sus perfiles de energía libre mostraron que para la doxorubicina tiene una barrera de energía de ~10 kJ/mol en la región de las cabezas polares, el atenolol su barrera de energía es de ~25 kJ/mol mientras que el ibuprofeno presenta una barrera de energía de ~50 kJ/mol. Con estos datos, ellos concluyeron que para las moléculas hidrofílicas presentaran grandes barreras de energía libre debido a las interacciones con los grupos polares de la DPPC y con las moléculas de agua antes de penetrar en la bicapa. Las moléculas de carácter lipofílico tienden a penetrar más fácilmente, debido a que presentan barreras de energía libre menores.

De la revisión de los antecedentes es posible observar el gran uso de las técnicas computacionales por métodos como el US para analizar las barreras de energías y predecir la permeabilidad de las moléculas.

La revisión bibliográfica muestra que hasta la fecha no se han realizado estudios de esta naturaleza en fármacos antifímicos. Es por esto que hemos decidido realizar la investigación de los perfiles de permeabilidad para los compuestos pirazinamida y cicloserina. Se seleccionaron estos fármacos debido a similitudes estructurales en relación al tamaño y a la forma de sus moléculas. Ambos antifímicos presentan una estructura rígida debido a la presencia de un anillo bencénico en el caso de la PZA y un anillo hidrocarbonado de 5 miembros para la CCS, y haciendo referencia a la regla de Overton, donde las moléculas más pequeñas atravesarán más rápido la membrana, podemos esperar que la cicloserina tendrá una barrera de energía libre más baja que la pirazinamida, dando lugar a una mayor penetrabilidad de la membrana.. De acuerdo al mecanismo propuesto en la literatura y sabiendo que las moléculas de menor tamaño difundirán mas rápido al interior de la membrana se propone la siguiente hipótesis para la presente investigación.

2.2 Hipótesis

“Los cálculos de potencial de fuerza media y de la constante de difusión local mostrarán una mayor difusión de la cicloserina en la membrana celular, debido a su menor tamaño en relación a la pirazinamida, y al aprovechamiento de los huecos formados entre la zona desordenada de las colas lipídicas.”

CAPITULO 3

METODOLOGÍA

En el presente trabajo de tesis, se realizaron simulaciones de dinámica molecular de tipo atomístico o átomos unidos, lo que nos brinda una mayor precisión en los cálculos para la obtención del potencial de fuerza media.

3.1 Equipo

Se utilizó un cluster tipo Beowulf de 32 núcleos con 32 GB de RAM con 30 TB de almacenamiento.

3.2 Software utilizado

El sistema operativo utilizado fue Debian 7 (versión 6 y 7) con OpenMPI versión 1.6, fila de ejecución Torque/Maui. Los softwares utilizados para este trabajo de tesis fueron los paquetes de GROMACS²⁵, AVOGADRO²⁶, VMD²⁷ y ACPYPE²⁸.

3.3 Obtención de las topologías de los fármacos

En la determinación de la topología de los fármacos fue necesario dibujar la estructura tridimensional de cada molécula utilizando el programa de AVOGADRO y exportando el archivo a un formato .PDB, el cual contiene las posición de cada átomo en relación a los ejes X,Y y Z (figura 4).

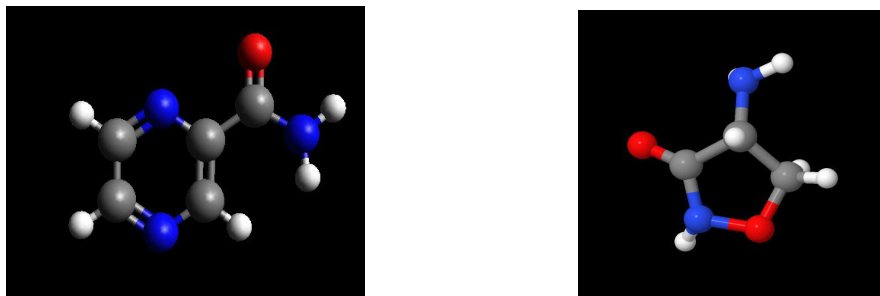


Figura 4: Visualización en 3D de la pirazinamida (izquierda) y cicloserina (derecha)

El archivo .PDB sirve de entrada para poder crear la topología de la molécula utilizando ACPYPE (AnteChamberPYthon Parser InterfacE), un programa diseñado a adaptar moléculas con los campos de fuerza compatibles con GROMACS, se utilizó el campo de fuerza AMBER03²⁹.

El programa VMD fue utilizado para la representación gráfica de los sistemas moleculares.

El archivo de la topología contiene la información referente a las longitudes de enlace entre los átomos, los ángulos de enlace, las cargas de los átomos, los parámetros de Lennard-Jones. Las topologías de las moléculas se encuentran en los apéndices A y B para la pirazinamida y la cicloserina respectivamente.

3.3.1 Obtención de las cargas atómicas y perfiles de torsión

Para el cálculo de las cargas atómicas de las moléculas de los fármacos se realizó una optimización con un nivel de teoría B3LYP/cc-pVTZ mediante GAMESS-US³⁰. Las cargas

obtenidas con GAMESS-US sustituyeron a las cargas generadas por ACPYPE, con el fin de proporcionar datos más exactos. El cálculo de las cargas atómicas y de los perfiles de torsión se realizaron de acuerdo al procedimiento propuesto de Jämbeck³¹

3.3.2 Obtención de los parámetros de Lennard-Jones

Los parámetros de Lennard-Jones fueron ajustados para reproducir el punto de fusión y la densidad de un cristal de pirazinamida por simulaciones de Dinámica Molecular.

A partir de la estructura cristalina del polimorfo α (figura 5), se construyó computacionalmente un cristal que representara la pirazinamida constituida por 100 moléculas (figura 6).

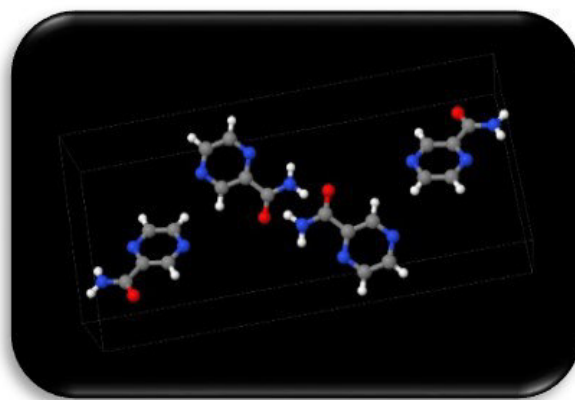


Figura 5: Polimorfo α de la pirazinamida

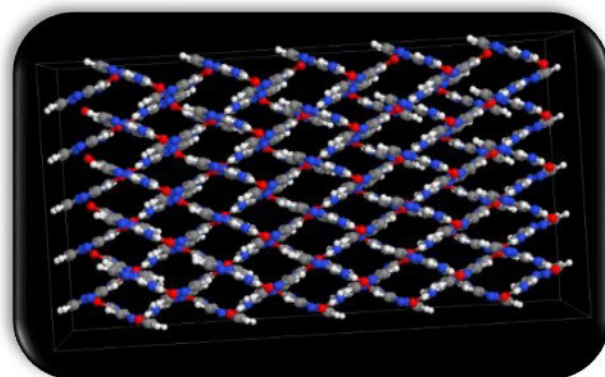


Figura 6: Representación de un cristal del polimorfo α con 100 moléculas de PZA

Se realizaron simulaciones de calentamiento gradual para obtener el punto de fusión por dinámica molecular y poder comparar los resultados con los valores experimentales. Las energías del punto de fusión fueron determinadas por la función de “g_energy” de GROMACS. Los valores de densidad se obtuvieron directamente de los cálculos del sistema después de la equilibración NPT (número de átomos, presión y temperatura constantes).

3.3.3 Predicción de la estabilidad termodinámica relativa de los polimorfos de la PZA

A partir de las estructuras cristalinas de los polimorfos α , β , γ , y δ , se realizaron simulaciones de dinámica molecular para validar los parámetros de Lennard-Jones. De cada polimorfo se realizó una simulación de un cristal con ~ 100 moléculas para analizar la estabilidad termodinámica relativa.

3.4 Obtención de los parámetros de la bicapa de DPPC

La estructura de la bicapa, la topología utilizada, las cargas de los átomos de la membrana y el campo de fuerza, fueron los desarrollados y utilizados por Jämbeck² en sus trabajos de investigación a nivel atomístico de membranas.

3.5 Conformación del sistema de simulación

El sistema está conformado por una molécula de PZA o CCS y una bicapa conformada por 128 cadenas lipídicas del tipo DPPC, 64 por cada lado de la bicapa. La caja de simulación se diseñó con una dimensión de 6.3 x 6.4 x 6.7 nm³ y fue llenada con ~3800 moléculas de agua del tipo TIP3p³² (por sus siglas en inglés three-site transferrable intermolecular potential), para un total de ~ 28 000 átomos en el sistema.

3.6 Configuración del sistema de simulación

Las simulaciones en la membrana fueron realizadas a una temperatura de 310 K, por encima de la temperatura de transición de fase cristal-líquido/líquido, usando un termostato V-rescale³³ con una constante de acoplamiento de 0.1 ps. La presión del sistema se mantuvo constante a 1 bar usando un termostato de Berendsen³⁴ con una constante de acoplamiento de 0.5 ps. Se utilizó una presión de acoplamiento del tipo semi-isotropico, para tomar en cuenta la diferencia en compresibilidad del sistema a lo largo de los ejes X, Y y Z.

Se utilizó un tiempo de integración de 2 fs para todas las simulaciones. Las interacciones electrostáticas fueron evaluadas usando el método de malla de partículas de Ewald³⁵ con un tamaño de 1.0 nm y un espaciado de cuadrícula de 0.12 nm con una ranura de interpolación de cuarto orden (Apéndice C).

3.7 Construcción del sistema de simulación.

Para la construcción del sistema, se requirió del archivo de la bicapa, conteniendo la ubicación de todos sus átomos en las coordenadas X, Y y Z. Se le realizó una equilibración a la membrana a 310 K por 500 ps, para asegurarnos que adquiriera la conformación correcta en la caja de simulación.

Se colocó la molécula del fármaco en el interior de la membrana, lo mas próximo a su Centro de Masas (COM por sus siglas en inglés Center of Mass). Una vez colocada la molécula, se incluyeron las moléculas de agua en ambos lados de la bicapa, por medio del comando “genbox” y sustituyendo en el archivo de la topología el tipo de agua carga de punto simple (SPC por sus siglas en inglés Simple Point Charge) por un modelo de agua de TIP3p.

El sistema completo se sometió a una equilibración NVT (número de átomos, volumen y temperatura del sistema constantes), por 100 ps y manteniendo a la molécula restringida en su posición en los ejes X, Y y Z, con el fin de ajustar la presión en el sistema a 1 bar. La temperatura del sistema se ajustó a 310 K, por medio de una equilibración NPT (número de átomos, presión y temperatura constantes) durante 100 ps.

3.8 Potencial de fuerza media

Una vez que el sistema fue equilibrado y alcanzó la temperatura requerida para la simulación, se procedió a realizar una simulación de dinámica molecular dirigida (SMD por sus siglas en inglés Steered molecular dynamics). La SMD es un método donde a una molécula se le asigna una fuerza de empuje y una dirección determinada con el fin de acelerar el proceso de permeación, que de otra manera requeriría mucho tiempo de cómputo, para después obtener las configuraciones necesarias para el muestreo umbrella (US por sus siglas en inglés).

La SMD se realizó desde el centro de la membrana hasta la fase acuosa. Se utilizó una fuerza de empuje de $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$, una velocidad de 0.001 nm por ps equivalente a 1 nm por ns de simulación, y la molécula fue dirigida a lo largo del eje Z. La simulación fue de 3 ns para asegurarnos que la molécula atravesaría la región de las cabezas polares, situándose en la fase acuosa del sistema.

A partir de la simulación SMD y con el comando “g_dist” se obtuvo una serie de configuraciones (posiciones de la molécula a diferentes profundidades a lo largo del eje Z en relación al COM de la DPPC y de la molécula de interés) que fueron tomados como puntos de referencia para el muestro de paraguas.

3.8.1 Simulaciones del US

El US es un método para calcular el Potencial de Fuerza Media (PMF) a partir de múltiples simulaciones en diferentes profundidades de la membrana y aplicando una fuerza de restricción a la molécula de interés para analizar la energía que requiere al situarse en esa

profundidad.

Se obtuvieron ~3000 configuraciones distintas, de las cuales se seleccionaron solo 34. Las configuraciones fueron seleccionadas de acuerdo a la distancia entre los COM de la DPPC y las moléculas de PZA/CCS procurando una distancia no mayor a 0.1 nm entre cada configuración para asegurar el cálculo correcto del perfil del PFM. En cada una de las configuraciones seleccionadas se realizó una equilibración NPT de 100 ps. Posterior a esta equilibración se realizó una simulación aplicando una fuerza de restricción a la molécula de PZA/CCS de $3000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ y el tiempo de simulación para cada configuración fue de 7 ns.

3.8.2 Obtención del perfil del PFM

El método para extraer el perfil del PFM fue el WHAM³⁶ (por sus siglas en inglés Weighted Histograms Analysis Method). Por medio del comando “g_wham” en el software de GROMACS, nos brinda el perfil del potencial de fuerza media.

3.9 Cálculo de la Permeabilidad

La determinación computacional del coeficiente de permeabilidad se realizó según la metodología descrita por Marrink y Berendsen¹⁸.

El coeficiente de permeabilidad “P” usualmente es definido como la relación entre el flujo y la diferencia de concentración, es por ello que P es equivalente a la inversa de la resistencia de la permeación “R” definido en la ecuación 1.

$$R=1/P \quad (1)$$

La resistencia a la permeación también puede expresarse en términos de Potencial de fuerza media y constantes de difusión como muestra la ecuación 2:

$$R = \int_{z_1}^{z_2} \frac{\exp(\Delta G(z)/RT)}{D(z)} dz \quad (2)$$

Donde $\Delta G(z)$ hace referencia a la energía del perfil del PFM a determinada profundidad de la membrana (z), R es la constante universal de los gases, T es la temperatura de la simulación en Kelvin, y $D(z)$ es la constante de difusión a determinada profundidad (z).

3.9.1 Cálculo del coeficiente de difusión

El cálculo del coeficiente de difusión se realizó por medio de las funciones “g_velacc” y “g_analyze” de GROMACS. Estas funciones calculan el coeficiente de difusión en cada una de las profundidades a través de los archivos de trayectoria y haciendo referencia a la ecuación de Green-Kubo.

3.10 Simulación del Benceno

Con el fin de analizar y comparar los resultados obtenidos de la PZA/CCS se planteó realizar la simulación de una molécula de benceno tomando en cuenta que ésta es una molécula completamente hidrófoba.

La metodología y la conformación del sistema para el benceno, fue el mismo que el utilizado para las moléculas de PZA y de CCS.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Validación de los parámetros

En el caso de la pirazinamida se ajustaron las cargas atómicas a un nivel de teoría alto y los perfiles de torsión que han proporcionado interacciones confiables con las cargas de los átomos del sistema.

Los parámetros de Lennard-Jones se evaluaron con las simulaciones de calentamiento y el cálculo de densidad del cristal del PZA. Los resultados de la simulación de calentamiento gradual muestran que el punto de fusión para un cristal del polimorfo α esta entre un rango de 460 – 470 K mientras que el valor experimental el punto de fusión es de 460 - 466 K según la literatura³⁷. La densidad obtenida por medio de dinámica molecular fue de 1403 kg/m³ muy cerca al valor experimental del polimorfo α que es de 1401 Kg/m³. Con estos resultados hemos podido concluir que los parámetros (cargas atómicas, parámetros de Lennard-Jones, perfiles de torsión) utilizados para la PZA quedan validados, lo que asegura que pueden ser empleados para utilizar esta molecula en simulaciones de dinámica molecular.

Para la CCS se ajustaron las cargas atómicas con un alto nivel de teoría, ya que el cálculo de interacciones electrostáticas es el que domina el cálculo de las energías de dinámica molecular. La CCS no presenta enlaces sencillos de rotación libre que requieran realizar perfiles de torsión.

Los parámetros de Lennard-Jones para la cicloserina, no pudieron ser ajustados, debido a que no se encontraron reportadas estructura de rayos X del fármaco, es por eso que se dejaron los valores obtenidos por el programa de ACPYPE.

4.2 Estabilidad termodinámica relativa de los polimorfos de la PZA

La validación de los parámetros de la PZA se realizó mediante el análisis de la estabilidad termodinámica de los polimorfos de la PZA por simulaciones de dinámica molecular. Los resultados de las simulaciones predijeron el orden de estabilidad en concordancia con la estabilidad reportada en la literatura³⁸. El polimorfo α es el que presenta una menor energía de sistema, seguido del β , γ , y siendo el polimorfo δ el de mayor energía de sistema.

Con esto se puede concluir que el polimorfo α es el más estable termodinamicamente. Además que los parámetros utilizados para la molécula de PZA quedan validados al predecir por medio de simulaciones de dinámica molecular el orden de estabilidad de los polimorfos de la pirazinamida según los reportados por Cherukuvada, Thakuria y Nangia⁴¹.

4.3 Potencial de Fuerza Media

A partir de los resultados de las simulaciones del US se obtuvieron los perfiles de Potencial de Fuerza Media (PMF) para cada una de las moléculas de la presente investigación.

La primer gráfica (figura 7) corresponde al perfil del Potencial de Fuerza Media de la PZA donde se pueden observar una primera barrera de energía de ~ 45 kJ/mol ubicada a los 2 nm

de profundidad, correspondiente a la fase desolvatación del fármaco y las interacciones con las cabezas polares de la DPPC. Posteriormente se observa un descenso en la energía hasta ~ -43 kJ/mol ubicada en la región ordenada de las colas lipídicas. Este descenso se debe a que la PZA se estabiliza en la membrana debido a la carga electrostática de los lípidos induce a un dipolo en la nube electrónica de la PZA, lo que provoca que se ésta se oriente en forma paralela a las colas lipídicas disminuyendo la energía requerida en esta región.



Figura 7: Potencial de fuerza media de la Pirazinamida

La barrera de energía más alta es de ~ 220 kJ/mol y se presenta hacia el centro de la bicapa. Se puede observar un aumento gradual de energía en la región desordenada de la membrana, debido a que en esta región se forman huecos entre las colas lipídicas, lo que ocasiona que el fármaco debe desprenderse de las interacciones formadas con los residuos de ácidos grasos para poder atravesar hacia el otro lado de la bicapa.

La siguiente gráfica (figura 8) muestra el perfil del PFM de la cicloserina. Este perfil presenta una sola barrera de energía de ~ 83 kJ/mol. Esta barrera se presenta en la región ordenada de las colas lipídicas, debido a que la cicloserina avanza solamente de manera mecánica, principalmente utilizando los huecos que se puedan formar entre las colas lipídicas, y en menor medida, por las interacciones que pudieran formarse entre el anillo de la cicloserina con los residuos de los ácidos grasos de la membrana. Posteriormente, se observa descenso en la energía muy marcado de hasta ~ -795 kJ/mol hacia el centro de la bicapa,. En este caso, la región desordenada favorece la formación de huecos que son aprovechados por la cicloserina para difundir más fácilmente hacia el interior de la membrana.

Como se mencionó anteriormente la CCS no interacciona tan fuertemente con las colas lipídicas, por lo cual, no se presenta una barrera de energía que deba de romper para poder avanzar a través de la membrana.

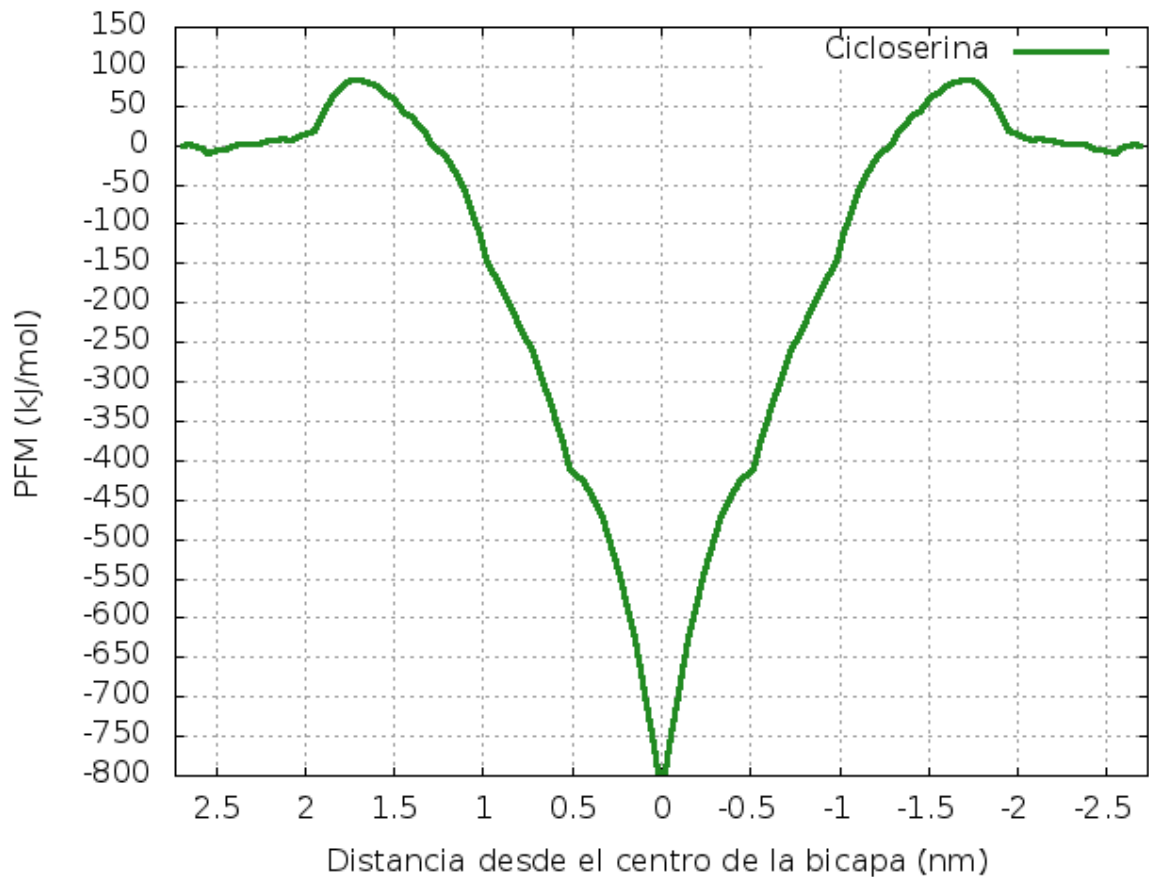


Figura 8: Potencial de Fuerza media de la Cicloserina

El perfil del PFM para la molécula del benceno está representado en la figura 9. Esta gráfica muestra una barrera de energía que va aumentando gradualmente hasta ~ 123 kJ/mol, desde la fase acuosa del sistema hasta la zona de las cabezas polares a ~ 2.1 nm de profundidad, esta energía representa la gran interacción con las cabezas polares que le dificultan el paso hacia el interior de la membrana por ser una molécula completamente no polar.

En la región ordenada de la membrana, se observa una segunda barrera de energía de ~ 151 kJ/mol, que representa la dificultad para atravesar esta zona debido a las interacciones electrostáticas formadas con las colas lipídicas que estabilizan el paso del benceno.

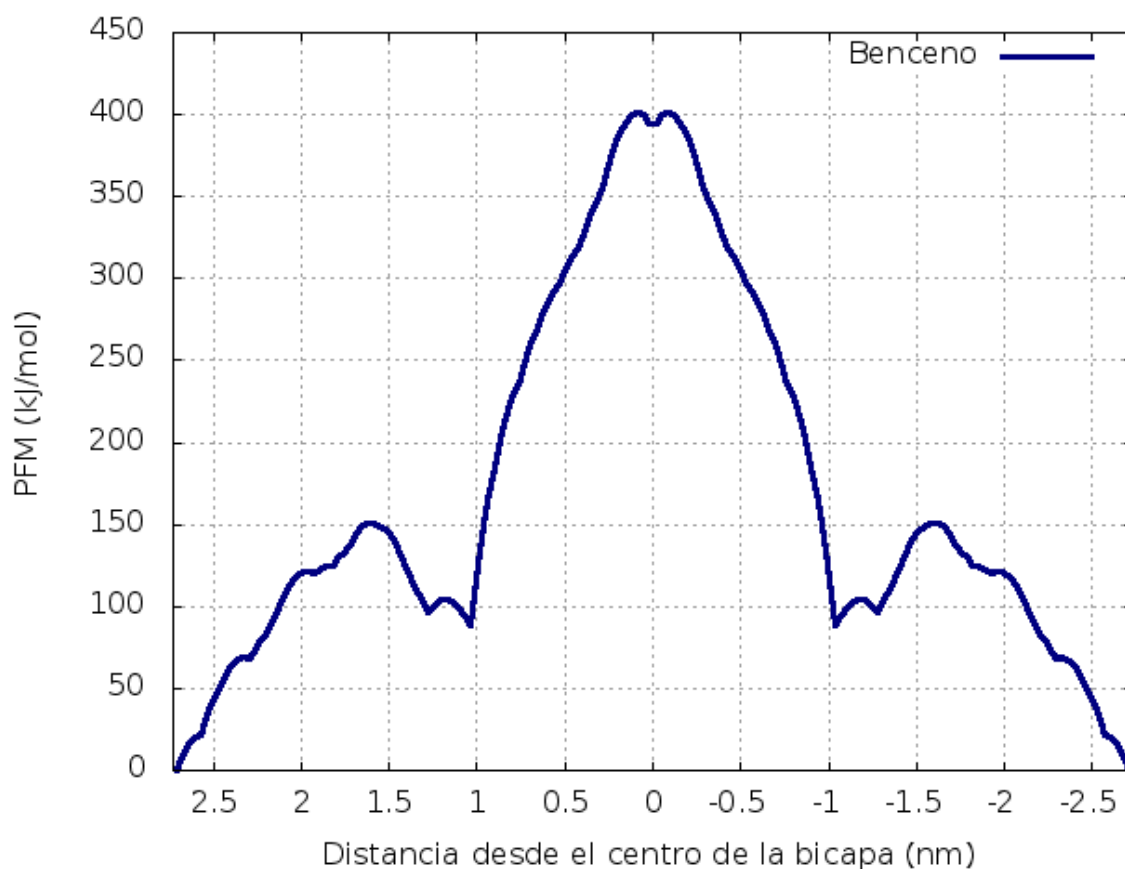


Figura 9: Potencial de Fuerza Media del Benceno

La principal barrera de energía se presenta hacia el interior de la membrana con una energía de ~ 401 kJ/mol. Este aumento gradual en la energía se debe a que el benceno debe romper estas interacciones formadas con la membrana para poder difundir a través de los huecos formados en la región desordenada y mayormente pasar al centro de la bicapa, donde no tiene con quien interaccionar.

Los cálculos del benceno se realizaron como método de comparación de la influencia del anillo aromático en el proceso de la permeabilidad de las membranas. Como se puede observar en la figura 10, la tendencia de los potenciales de fuerza media del benceno y de la pirazinamida son muy parecidos.

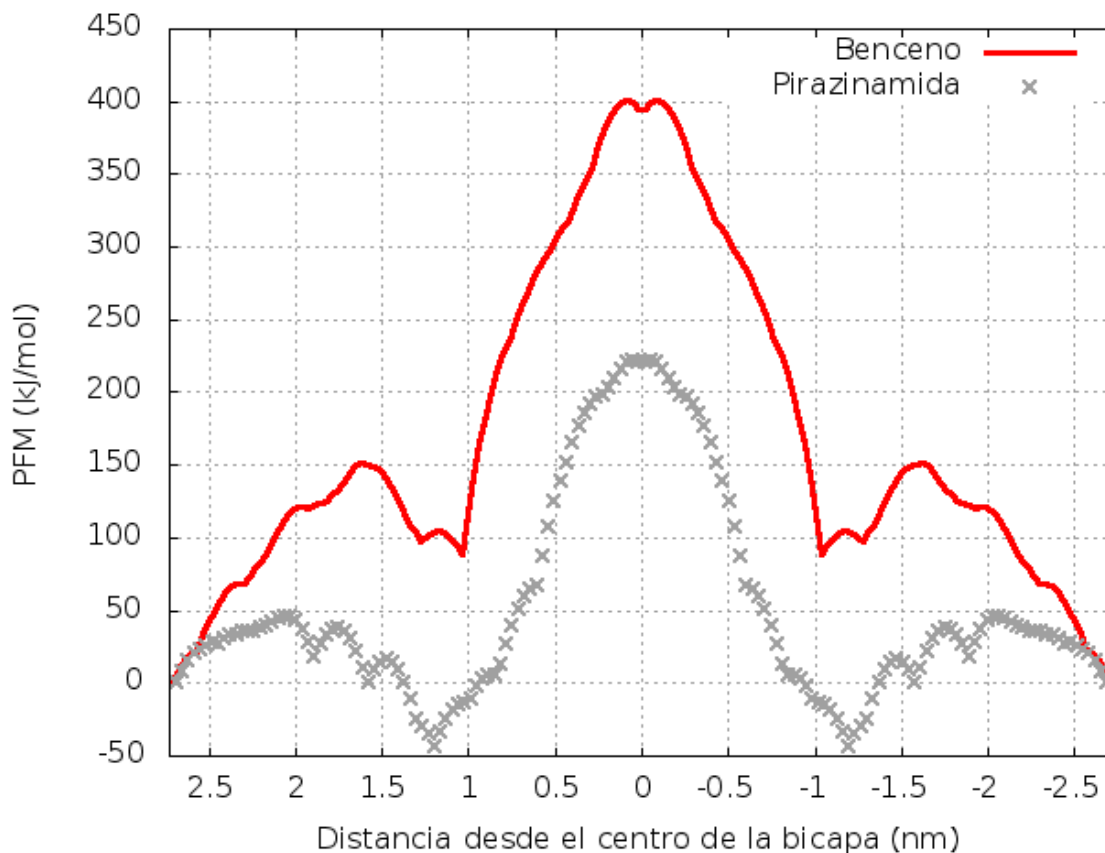


Figura 10: Comparación del los PFM del benceno y pirazinamida

La diferencia de energías en la zona ordenada de la membrana, de 1.3 a 1.9 nm de profundidad, se debe a que la pirazinamida es capaz de orientarse de forma paralela a las colas lipídicas para poder difundir por la presencia de grupos polares como la amida. A diferencia del benceno, que es una molécula completamente no polar y de menor tamaño

que no requiere un acomodo específico para atravesar la membrana. Además en determinados puntos de la membrana, si se llega a presentar algún hueco, el benceno puede girar y adoptar alguna posición que le resulte perjudicial al momento de seguir su trayectoria hacia el interior de la membrana.

La diferencia de tamaño entre el benceno y la pirazinamida determina el aumento de energía hacia el interior de la membrana, debido a que para el benceno puede estabilizarse en los huecos de las colas lipídicas por medio de las fuerzas electrostáticas, mismas que se deben romper para continuar con la permeación. La pirazinamida también presenta estas interacciones con las colas lipídicas de la membrana, pero debido a su mayor tamaño, no puede estabilizarse completamente dentro de los huecos formados en la membrana y por lo tanto presenta menos interacciones que debe de romper para continuar con el proceso de permeación.

En el caso de la gráfica del PFM de la cicloserina es muy distinto, este proceso de permeación se debe principalmente al aprovechamiento de los huecos formados en la membrana para difundir y su descenso en la energía se debe a que la cicloserina no presenta demasiadas interacciones con la membrana.

4.4 Cálculo de la Permeabilidad

Los cálculos del valor de permeabilidad indican que la pirazinamida permea casi 5 veces más rápido que la cicloserina.

Para el caso de la pirazinamida, el valor de la permeabilidad calculada fue de 5.96×10^2 m/s mientras que para la cicloserina se obtuvo una permeabilidad de 1.32×10^2 m/s. Aun cuando estos valores no concuerdan con las magnitudes que esperábamos obtener, muestran que la tendencia de la permeabilidad concuerda con la forma del perfil de Potencial de Fuerza Media. Ya que suponemos que la cicloserina podría presentar una acumulación en el centro de la bicapa debido a que en esta región es la zona donde se encuentra más estable, y la pirazinamida muestra una repulsión a estar en el medio de la bicapa por la gran cantidad de energía que requiere para establecerse en esta zona.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

La hipótesis que planteamos al inicio de esta investigación queda refutada, ya que nosotros planteamos que la cicloserina permearía mas rápido que la pirazinamida, haciendo alusión a su menor tamaño y al aprovechamiento de los espacios brindados por las torsiones de las colas lipídicas hacia el interior de la membrana. Pero los valores obtenidos con los perfiles del Potencial de Fuerza Media indican que la pirazinamida es capaz de permear casi 5 veces más rápido que la cicloserina.

Esto se debe a que sólo tomamos en cuenta el movimiento mecánico en el interior de la membrana en relación al tamaño y forma de las moléculas, sin haber considerado las posibles interacciones de dispersión formadas entre el anillo aromático de la pirazinamida y las cargas de las colas lipídicas de la membrana. Además los perfiles de Potencial de Fuerza Media indican que hay una preferencia de la cicloserina en el centro de la membrana, por lo que esta molécula tendera en un principio a acumularse en el interior de la membrana antes de difundir hasta el otro lado de la bicapa.

El presente trabajo de investigación proporcionó información sobre la importancia de considerar la presencia de grupos aromáticos en la membrana, que influyen de manera significativa en el proceso de permeación de los fármacos a través de la membrana.

5.1 Perspectivas a futuro

En los trabajos a futuro en el equipo de investigación se plantea realizar los cálculos del Potencial de Fuerza Media de los diferentes fármacos antifímicos y la realización de dichos cálculos en una modelo de pared bacteriana de ácidos micólicos. Refinar la técnica para el cálculo de la permeabilidad para acercarnos a los ordenes de magnitud correctos. Continuar investigando las interacciones que se podrían presentar al utilizar diferentes grupos funcionales con la membrana y posteriormente con la pared bacteriana.

REFERENCIAS

- 1 Philip Nelson. (2005) *Física Biológica: energía, información, vida*. Editorial Reverté. España. Pág. 59-60.
- 2 Lodish, Berk, Matsudaira, kayser, Darnell. (2005) *Biología Celular y Molecular*. (5° ed.). Editorial Médica Panamericana. 2005. Pág. 164-165.
- 3 Jiménez, Felipe, Merchant y Horacio. (2003) *Biología celular y molecular*. Pearson educación México ISBN: 970-260387-0
- 4 Tortora, Funke, Case. *Introducción a la microbiología*. (9° ed.) Editorial Médica Panamericana. Pág. 91
- 5 Meng, Fancui, Xu, Weiren. (2013) “Drug permeability prediction using PMF method”. *Journal of molecular modeling*. 19; 991:007
- 6 Xiang, T.-X; Anderson, B. D. (2006) *Adv. Drug Delivery Rev.* 58, 1357-1378
- 7 Johan Ulander, D. J. Haymet. (2003) “Permeation Across Hydrated DPPC Lipid Bilayers: Simulation of the Titrable Amphiphilic Drug Valproic Acid”. *Biophysical Journal*. 85, 3475 – 3483
- 8 Mario Orsi, Wendy E. Sanderson, Jonathan W. Essex. (2009) “Permeation of Small Molecules through a Lipid Bilayer: A Computer Simulation Study”. *Journal of Physical Chemistry B*. 113, 12019 – 12029
- 9 Pere Coll. (2003) “Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*”. *Enfermedades infecciones y Microbiología Clínica*. 21, 299-308
- 10 Zimhony O., Cox JS, Welch JT, Vilcheze C., Jacobs WR Jr. (2000) “Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*”. *Nature Medicine*. 6, 1043-1047 .

-
- 11 Davidson P. T. (1988) "Treatment of micobacterial infections". *Bulletin of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 40, 2452-2454
- 12 Tetko, I. V.; Poda, G. I.; Ostermann, C.; Mannhold, R. (2009) "Comparison of 30 log P Calculation Methods on Public and Proprietary Datasets with more than 96,000 Compounds, LogP2009 PhysChem and ADMET Profiling in Drug Research", Zurich, Switzerland, February 8-11;
- 13 Dona Bassolino-Klimas, Howar Alper, Terry Stouch. (1993) "Solute Diffusion in lipid bilayer mebranes: An atomic level study by molecular dinamics simulation". *Biochemistry* 32(47), 12624-12637
- 14 Lieb, W. R. & Stein, W. D. (1969) "Biological membranes behave as nonporus polmeric sheets with respect to the diffusion of nonelectrolytes" *Nature* 224, 240 – 243
- 15 Marrink, S. J., Berendsen, H. J. C. (1993) "Molecular dynamics of water transport through membranes: Water from solvent to solute". *Pure & Applied Chemistry*. 65(12) 2513- 2520
- 16 Griffith O. H., Dehlinger P. J., Van P. S. (1974) "Shape of the hydrophobic Barrier of phospholipid bilayer (evidence for water penetration in biological membranes)". *Journal of membrane biology*. 15, 159 – 192
- 17 Dona Bassolino-Klimas, Howar Alper, Terry Stouch. (1994) "Mechanism of solute diffusion trhough lipid bilayer membranes by molecular dinamics simulation". *Journal of the American Chemistry Society*. 117, 4118 – 4129
- 18 Marrink, S. J., Berendsen, H. J. C. (1996) "Permeation Process of Small Molecules across Lipid Membranes Studied by Molecular Dynamics Simulations". *Journal of Physical Chemistry*. 100, 16729-16738

-
- 19 Ulander J., Haymet A. D. J., (2003) “Permeation Across Hydrated DPPC Lipid Bilayers: Simulation of the Titrable Amphiphilic Drug Valproic Acid”. *Biophysical Journal*, 85, 3473 – 3484
- 20 Howard E. Alper and Terry R. Stouch. (1995) “Orientation and diffusion of a drug analog in biomembranes: Molecular Dynamics Simulation”. *Journal of Physical Chemistry*. 99, 5714 – 5731
- 21 Stenberg P., Luthman K., Artursson P. (1999) “Prediction of membrane permeability to peptides from calculated dynamic molecular surface properties”. *Pharmaceutical Research* 16(2), 205 – 212
- 22 Li-li Chen, Jia Yao, Jian-bo Yang, Jie Yang. (2005) “Predicting MDCK cell permeation coefficients of organic molecules using membrane-interaction QSAR analysis”. *Acta Pharmacologica Sinica*. 26(11), 1322 – 1333
- 23 Susruta Samanta, Samira Hezaveh, Giuseppe Milano, and Danilo Roccatano. (2012) “Diffusion of 1,2-Dimethoxyethane and 1,2-Dimethoxypropane through Phosphatidylcholine Bilayers: A Molecular Dynamics Study”. *Journal of Physical Chemistry*. 116, 5141 – 5151
- 24 Meng F. Xu W. (2013) “Drug permeability prediction using PMF method”. *Journal of Molecular Modeling*. 19, 991 – 997
- 25 Berendsen, H.J.C., D. van der Spoel, y R. van Drunen. (1995) “GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation”. *Computer Physics Communications* 91, no. 1-3: 43-56. doi:10.1016/0010-4655(95)00042-E.
- 26 Hanwell, Marcus D., Donald E. Curtis, David C. Lonie, Tim Vandermeersch, Eva Zurek, y Geoffrey R. Hutchison. (2012) “Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform”. *Journal of Cheminformatics* 4(1) 17. doi:10.1186/1758-2946-4-17.

-
- 27 Humphrey, William, Andrew Dalke, y Klaus Schulten. (1996) “VMD: Visual molecular dynamics”. *Journal of Molecular Graphics* 14, no 1 : 33-38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- 28 Sousa da Silva, A. W. & Yranken, W. F. (2012) “Acypype - antechamber python parser interface”. *BMC Research Notes*, 5:367 doi:10.1186/1756-0500-5-367
- 29 Case, David A, Thomas E Cheatham III, Tom Darden, Holger Gohlke, Ray Luo, Kenneth M Merz Jr., Alexey Onufriev, Carlos Simmerling, Bing Wang, y Robert J Woods. (2005) “The Amber Biomolecular Simulation Programs”. *Journal of Computational Chemistry*. 26, no 16 : 1668-88. doi:10.1002/jcc.20290.
- 30 Bode, Brett M., y Mark S. Gordon. (1998) “Macmolplt: a graphical user interface for GAMESS”. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 16, no 3: 133-38. doi:10.1016/S1093-3263(99)00002-9.
- 31 Joakim P. M. Jämbeck, Alexander P. Lyubartsev. (2012) “Derivation and Systematic Validation of a Refined All-Atom Force Field for Phosphatidylcholine Lipids” *Journal of Physical Chemistry B*, 116(10), 3164-3179 doi: 10.1021/jp212503e
- 32 Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein. (1983) “Comparison of simple potential functions for simulating liquid water”. *Journal of Chemical Physics*. 79:926–935
- 33 Bussi, G.; Donadio, D.; Parrinello, M. J. (2007) “Canonical Sampling through velocity rescaling”. *Journal of Chemical Physics*. 126, 14101–14107.
- 34 Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Vangunsteren, W. F., Dinola, A., Haak, J. R. (1984) “Molecular Dynamics with coupling to an external bath”. *Journal of Chemical Physics*. 81(8), 3684–3690.

-
- 35 Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. J. (1993) "Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems". *Journal of Chemical Physics*, 98(12), 10089–10092.
- 36 Kumar, S.; Bouzida, D.; Swendsen, R. H.; Kollman, P. A.; Rosenberg, J. M. (1992) *Journal of Computational Chemistry*. 13(32), 1011–1021.
- 37 <http://www.tcichemicals.com/eshop/es/ve/commodity/P0633/> revisado el 22 de abril del 2014
- 38 S. Cherukuvada; R. Thakuria, A. Nangia. (2010) "Pyrazinamide Polymorphs: Relative stability and vibrational spectroscopy". *Crystal Growth & Design*, 10, 3931 – 3941. doi: 10.1021/cg1004424

APÉNDICE A
TOPOLOGÍA DE LA PIRAZINAMIDA

[atomtypes]

;name	bond_type	mass	charge	ptype	sigma	epsilon	Amb
o	o	0.00000	0.00000	A	2.95992e-01	8.78640e-01 ; 1.66	0.2100
n	n	0.00000	0.00000	A	3.25000e-01	7.11280e-01 ; 1.82	0.1700
ca	ca	0.00000	0.00000	A	3.39967e-01	3.59824e-01 ; 1.91	0.0860
nb	nb	0.00000	0.00000	A	3.25000e-01	7.11280e-01 ; 1.82	0.1700
c	c	0.00000	0.00000	A	3.39967e-01	3.59824e-01 ; 1.91	0.0860
h4	h4	0.00000	0.00000	A	2.51055e-01	6.27600e-02 ; 1.41	0.0150
hn	hn	0.00000	0.00000	A	1.06908e-01	6.56888e-02 ; 0.60	0.0157

[moleculetype]

;name	nrexcl
pz	3

[atoms]

; nr	type	resi	res	atom	cgmr	charge	mass	; qtot	bond_type
1	o	1	PZ	OPZ	1	-0.534457	16.00000	; qtot	cargas RESP//B3LYP/cc-pVTZ por Liz
2	n	1	PZ	NPZ	2	-0.837192	14.01000	; qtot	
3	ca	1	PZ	CPZ	3	0.282830	12.01000	; qtot	
4	nb	1	PZ	N1PZ	4	-0.391079	14.01000	; qtot	
5	ca	1	PZ	C1PZ	5	0.197138	12.01000	; qtot	
6	nb	1	PZ	N2PZ	6	-0.469734	14.01000	; qtot	
7	ca	1	PZ	C2PZ	7	0.186358	12.01000	; qtot	

8	c	1	PZ	C3PZ	8	0.527908	12.01000 ; qtot
9	ca	1	PZ	C4PZ	9	0.058549	12.01000 ; qtot
10	h4	1	PZ	HPZ	10	0.072372	1.00800 ; qtot
11	h4	1	PZ	H1PZ	11	0.094630	1.00800 ; qtot
12	h4	1	PZ	H2PZ	12	0.058666	1.00800 ; qtot cargas RESP//B3LYP/cc-pVTZ por Liz
13	hn	1	PZ	H3PZ	13	0.334107	1.00800 ; qtot
14	hn	1	PZ	H4PZ	14	0.419905	1.00800 ; qtot

[dihedrals] ; propers

; treated as RBs in GROMACS to use combine multiple AMBER torsions per quartet

; i j k l func phase kd pn

7	3	8	1	9	180.00	34.000	1 ;	C2-	C-	C3-	O****
7	3	8	1	9	0.00	-11.000	2 ;	C2-	C-	C3-	O****
7	3	8	1	9	180.00	5.000	3 ;	C2-	C-	C3-	O****
7	3	8	1	9	0.00	1.000	4 ;	C2-	C-	C3-	O****
7	3	8	1	9	180.00	1.000	5 ;	C2-	C-	C3-	O****
7	3	8	1	9	0.00	-2.000	6 ;	C2-	C-	C3-	O****

APÉNDICE B
TOPOLOGÍA DE LA CICLOSERINA

; cicloserina_GMX.itp created by acpype (Rev: 7268) on Mon Nov 11 14:30:59 2013

[atomtypes]

;name	bond_type	mass	charge	ptype	sigma	epsilon	Amb
os	os	0.00000	0.00000	A	3.00001e-01	7.11280e-01 ; 1.68	0.1700
c3	c3	0.00000	0.00000	A	3.39967e-01	4.57730e-01 ; 1.91	0.1094
n	n	0.00000	0.00000	A	3.25000e-01	7.11280e-01 ; 1.82	0.1700
n3	n3	0.00000	0.00000	A	3.25000e-01	7.11280e-01 ; 1.82	0.1700
c	c	0.00000	0.00000	A	3.39967e-01	3.59824e-01 ; 1.91	0.0860
o	o	0.00000	0.00000	A	2.95992e-01	8.78640e-01 ; 1.66	0.2100
h1	h1	0.00000	0.00000	A	2.47135e-01	6.56888e-02 ; 1.39	0.0157
hn	hn	0.00000	0.00000	A	1.06908e-01	6.56888e-02 ; 0.60	0.0157

[moleculetype]

;name cicloserina nrexcl

ccs 3

[atoms]

; nr	type	resi	res	atom	cgnr	charge	mass	; qtot	bond_type
1	os	1	CCS	O1	1	-0.211500	16.00000	; qtot -0.268	
2	c3	1	CCS	C2	2	-0.014300	12.01000	; qtot -0.207	
3	n	1	CCS	N3	3	-0.628500	14.01000	; qtot -0.537	
4	c3	1	CCS	C4	4	0.251800	12.01000	; qtot -0.466	

5	n3	1	CCS	N5	5	-1.029700	14.01000 ; qtot -1.357
6	c	1	CCS	C6	6	0.744000	12.01000 ; qtot -0.732
7	o	1	CCS	O7	7	-0.574900	16.00000 ; qtot -1.267
8	h1	1	CCS	H8	8	0.075900	1.00800 ; qtot -1.200
9	h1	1	CCS	H9	9	0.075900	1.00800 ; qtot -1.133
10	hn	1	CCS	H10	10	0.440400	1.00800 ; qtot -0.835
11	h1	1	CCS	H11	11	0.068800	1.00800 ; qtot -0.729
12	hn	1	CCS	H12	12	0.401000	1.00800 ; qtot -0.364
13	hn	1	CCS	H13	13	0.401000	1.00800 ; qtot 0.000

APÉNDICE C

CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA DE SIMULACIÓN

```

title      = Umbrella pulling simulation
; Run parameters
integrator = md
dt         = 0.002
tinit     = 0
nsteps    = 1500000 ; 3000 ps= 3.0 ns = 3.0 nm
nstcomm   = 10

; Output parameters
nstxout   = 5000 ; every 10 ps
nstvout   = 5000
nstfout   = 500
nstxtcout = 500 ; every 1 ps
nstenergy = 500

; Bond parameters
constraint_algorithm = lincs
constraints          = all-bonds
continuation         = yes ; continuing from NPT
; Single-range cutoff scheme
nstlist             = 5
ns_type             = grid
rlist               = 1.0
rcoulomb            = 1.0
rvdw                = 1.0

; PME electrostatics parameters
coulombtype         = PME
fourierspacing      = 0.12
fourier_nx          = 0
fourier_ny          = 0
fourier_nz          = 0
pme_order           = 4
ewald_rtol          = 1e-5
optimize_fft        = yes

; Berendsen temperature coupling is on in two groups
Tcoupl              = v-rescale
tc_grps             = BEN  DPPC_SOL
tau_t               = 0.5  0.5
ref_t               = 310  310
; Pressure coupling is on
Pcoupl              = berendsen
pcoupltype          = semiisotropic
tau_p               = 0.5  0.5

```

```
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5
ref_p          = 1.0 1.0
refcoord_scaling = com
; Generate velocities is off
gen_vel       = no
; Periodic boundary conditions are on in all directions
pbc          = xyz
; Long-range dispersion correction
DispCorr     = EnerPres
; Pull code
pull         = umbrella
pull_geometry = distance ; simple distance increase
pull_dim     = N N Y
pull_start   = yes ; define initial COM distance > 0
pull_ngroups = 1
pull_group0  = DPPC_SOL
pull_group1  = BEN
pull_rate1   = 0.001 ; 0.001 nm per ps = 1 nm per ns
pull_k1      = 1000 ; kJ mol-1 nm-2
```

RESUMEN BIBLIOGRAFICO

Orlando Fabrizio Delgado Mota

Candidato para el grado de Maestría en

Maestro en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: CÁLCULO DE LA PERMEABILIDAD DE UN MODELO DE MEMBRANA
CELULAR HACIA DOS AGENTES ANTÍFÍMICOS

Campo de Estudio: Farmacología

Bibliografía:

Datos Personales: Nacido en San Nicolás de los Garza, Nuevo León el 2 de Enero de 1986, hijo de Abel Delgado Rodríguez y María del Rosario Mota Aguilera.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo con orientación en farmacia en 2011.

Experiencia Profesional: Jefe del departamento de Farmacovigilancia en Servicios Médicos de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 2012.