

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias  
en Nanociencias  
con orientación en Física de Materiales**

---

**Estudio *in silico* de la interacción entre el aptámero anti-MUC1  
y el epítipo de la Mucina 1**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Brianda Paola López Santini**

Ensenada, Baja California

2018

Tesis Defendida por

**Brianda Paola López Santini**

y aprobada por el siguiente comité

---

**Dr. Sergio Andrés Águila Puentes**

Director de Tesis

Miembros del comité

**Dr. Abraham Marcelino Vidal Limón**

**Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez**



---

**Dr. Sergio Fuentes Moyado**

Coordinador del Posgrado en Nanociencias

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**

Directora de Estudios de Posgrado

*Brianda Paola López Santini © 2018*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta Brianda Paola López Santini como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias con orientación en Física de Materiales.

### **Estudio *in silico* de la interacción entre el aptámero anti-MUC1 y el epítotope de la Mucina 1**

Resumen aprobado por:

---

Sergio A. Águila Puentes  
Director de tesis

La rápida expansión de nuevas tecnologías para terapias de cáncer dirigidas ha aumentado la necesidad de desarrollar agentes altamente específicos capaces de unirse a moléculas biológicamente activas o receptores que se expresan de manera anormal en células o tejidos enfermos. Entre las estrategias de administración de fármacos más prometedoras se encuentran los nano-vehículos mediados por aptámeros. Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla de DNA o RNA que se pliegan en estructuras tridimensionales únicas bien definidas, capaces de reconocer moléculas, tales como proteínas, fosfolípidos, azúcares y ácidos nucleicos, con alta afinidad y selectividad. En comparación con otros agentes de unión, como anticuerpos, poseen ventajas distintivas: su síntesis es fácil y económica, muestran un bajo potencial inmunogénico y antigénico, y permiten una gran variedad de modificaciones químicas. Uno de los aptámeros de DNA mejor identificados es el aptámero anti-MUC1 que se acopla con múltiples interacciones a epítotope altamente repetidos en la región extracelular de la glicoproteína transmembranal Mucina 1, proteína de interés por expresarse hasta diez veces más y de forma alterada en la superficie de células tumorales. Este trabajo tuvo como objetivo investigar teóricamente la forma de mejorar las interacciones de unión entre el aptámero anti-MUC1 y el epítotope de la Mucina 1 mediante la generación de mutaciones puntuales en la secuencia del aptámero. Un total de 17 mutaciones fueron construidas y simuladas por dinámicas moleculares a lo largo de 100 ns. El monitoreo de enlaces de hidrógeno y los cálculos MM/GBSA de los eventos de unión seleccionados indicaron que tres de los aptámeros mutados, 11T>1MP, 12T>U y 11T>PSU/12T>U, tienen mejores capacidades de unión que el aptámero nativo. Las tres mutaciones mostraron una formación de surcos que favorecen estructuralmente la interacción del aptámero-epítotope; un aumento el número de enlaces de hidrógeno formados y mayores interacciones electrostáticas que dieron como resultado una mejor energía de unión libre global.

Palabras Clave: **Anti-MUC1; aptámero; dinámica molecular; MM/GBSA; Mucina 1.**

Abstract of the thesis presented by Brianda Paola López Santini as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience with orientation in Materials Physics

***In silico* study of the interactions between the anti-MUC1 aptamer and the epitope of the Mucin 1**

Abstract approved by:

---

Sergio A. Águila Puentes  
Thesis Director

The rapid expansion of new technologies for targeted cancer therapies has increased the need to develop highly specific agents capable of binding to biologically active molecules or receptors that are expressed abnormally in cancer cells or tissues. Among of the most promising drug delivery strategies for cancer therapy applications are aptamer-mediated nano-vehicles. Aptamers are single stranded DNA or RNA oligonucleotides that fold into unique three-dimensional structures capable of recognizing molecules, such as proteins, phospholipids, sugars or nucleic acids with high affinity and selectivity. In comparison with other binding agents, such as antibodies, they have distinct advantages: their synthesis is easy and inexpensive, they show a low immunogenic and antigenic potential, and they allow a great variety of chemical modifications. Among the best identified ssDNA aptamers we find the anti-MUC1 aptamer which targets the highly repeated epitopes in the extracellular region of the transmembrane glycoprotein Mucin 1, which is mutated and over expressed up to 10-fold in a high number of carcinomas. The aim of this work was to enhance the binding affinity between the anti-MUC1 aptamer and the MUC-1 epitope by mutation scanning in the wild-type aptamer structure. A total of 17 mutations were constructed and simulated by Molecular Dynamics (MD) along 100 ns. Hydrogen bond monitoring and MM/GBSA calculations from selected binding events indicated that three of the mutated aptamers, 11T>1MP, 12T>U and 11T>PSU/12T>U, had better binding abilities than the wild-type aptamer. All three mutations showed a groove formation that structurally favors the aptamer-epitope interaction; an increase in hydrogen bonding count and higher electrostatic interactions that resulted in an overall better free binding energy.

Keywords: **Anti-MUC1; Aptamer; MM/GBSA; Molecular Dynamics; Mucine 1.**

## Dedicatoria

*A mis padres,  
por apoyar mis locuras.*

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN), por ser las instituciones que me formaron académicamente durante la maestría, así como a todo personal académico y administrativo que labora en ellas, por apoyarme de mil maneras.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría.

A mi director de tesis, el Dr. Sergio Águila, por recibirme y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. Le agradezco su apoyo y sus asesorías. Ha sido un enorme placer colaborar con usted.

A los miembros del comité de tesis, el Dr. Abraham Vidal Limón y el Dr. Carlos Brizuela Rodríguez, por sus valiosas observaciones y correcciones a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A el Dr. Joel Alderete de la Universidad de Concepción, Chile, y a la Dra. Verónica Jiménez de la Universidad Andrés Bello, Chile, y a sus respectivos equipos de trabajo. Su apoyo, recursos, enseñanzas y colaboración fueron indispensables para el desarrollo de esta investigación.

A mi familia científica, Sergio y Abraham, sus enseñanzas de vida las llevaré por siempre.

A mis amigos, en especial a Cubo y Camilo, porque de no ser por su compañía y apoyo, el camino no hubiese sido tan divertido.

A Fer, mi compañero de vida. Gracias por la paciencia y los cuidados. Estaría perdida sin ti.

A mi familia, a mi mamá Dina, mi papá Norberto, mi hermana Stefanie, mis abuelos y mis sobrinos Frida y Crucito, por apoyarme en todo momento. Son mi inspiración. Los amo.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2. Antecedentes.....</b>	<b>5</b>
2.1. La Mucina 1 como receptor.....	5
2.2. Selección de aptámeros.....	7
2.3. Selección del aptámero anti-MUC1.....	7
2.4. Estructura tridimensional del aptámero anti-MUC1.....	8
2.5. Interacción entre el aptámero anti-MUC1 y el epítipo MUC-1.....	9
<b>Capítulo 3. Justificación, Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>11</b>
3.1. Justificación.....	11
3.2. Hipótesis.....	11
3.3. Objetivos.....	12
3.3.1. Objetivo General.....	12
3.3.2. Objetivos Particulares.....	12
<b>Capítulo 4. Metodología.....</b>	<b>13</b>
4.1. Sistemas simulados.....	14
4.2. Simulaciones de dinámica molecular.....	14
4.3. Análisis de las trayectorias.....	18
4.3.1. RMSD: <i>Root Mean Square Deviation</i> .....	18
4.3.2. RMSF: <i>Root Mean Square Fluctuation</i> .....	19
4.3.3. MM/GBSA.....	19
4.3.4. Enlaces de Hidrógeno.....	20

<b>Capítulo 5. Resultados y Discusiones</b> .....	21
5.1. Mutaciones y dinámica molecular.....	21
5.2. Equilibrio y flexibilidad de las dinámicas moleculares.....	22
5.3. MM/GBSA: El primer filtro.....	28
5.4. Dobles Mutantes.....	30
5.5. Identificando el evento de unión.....	32
5.6. Habilidades de unión: interacciones, energía libre y cambios estructurales.....	33
5.6.1. Sistema nativo.....	40
5.6.2. Sistema 11T>PSU.....	41
5.6.3. Sistema 11T>1MP.....	41
5.6.4. Sistema 12T>U.....	41
5.6.5. Sistema 11T> PSU/12T>U.....	42
<b>Capítulo 6. Conclusiones</b> .....	43
<b>Literatura citada</b> .....	44
<b>Apéndice A. Metodología</b> .....	48
A.1. Estructura inicial del epítotope MUC-1.....	48
A.2. Preparación de los sistemas para dinámica molecular.....	49
A.3. Protocolo de dinámica molecular.....	50
A.4. Análisis de las trayectorias.....	53

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Representación esquemática del funcionamiento de los aptámeros.....	2
2	Sistemas de nanopartículas y aptámeros para terapias dirigidas contra el cáncer.	3
3	Componentes estructurales de la Mucina 1 en células epiteliales.....	6
4	Secuencia del epítoto de la Mucina 1.....	6
5	Secuencia de nucleótidos del aptámero anti-MUC1.....	9
6	Cuatro trayectorias del aptámero anti-MUC1 y el epítoto de la Mucina 1 obtenidas por Dinámica Molecular.....	10
7	Esquema de la metodología empleada para mejorar la afinidad de unión del aptámero anti-MUC1 por el epítoto de la Mucina 1.....	13
8	Estructuras de las moléculas utilizadas en este estudio.....	15
9	Esquema que muestra el protocolo estándar para realizar una simulación de dinámica molecular.....	16
10	Ejemplo de una ecuación utilizada para aproximar las fuerzas atómicas que gobiernan el movimiento molecular.....	16
11	Preparación del sistema nativo para la simulación de dinámica molecular.....	21
12	Gráficas de (a) RMSD y (b) RMSF del sistema nativo.....	23
13	RMSD de los sistemas mutantes para la timina 11.....	24
14	RMSD de los sistemas mutantes para la timina 12.....	25
15	RMSD de los sistemas mutantes para la timina 13.....	26
16	RMSF de los sistemas mutantes para la timina 11.....	27
17	RMSF de los sistemas mutantes para la timina 12.....	27
18	RMSF de los sistemas mutantes para la timina 13.....	28
19	RMSD de los sistemas con dobles mutantes.....	31
20	RMSF de los sistemas con dobles mutantes.....	31

21	Monitoreo de enlaces de hidrógeno y selección del evento de unión.....	34
22	Relación entre los componentes de la energía libre y los enlaces de hidrógeno formados durante la dinámica molecular del sistema nativo.....	36
23	Relación la energía libre total y los enlaces de hidrógeno formados durante la dinámica molecular del sistema nativo.....	36
24	<i>Frames</i> a 0, 10 y 20 ns del evento de unión del sistema (a) nativo, (b) 11T>PSU, (c) 11T>1MP, (d) 12T>U y (e) 11T>PSU/12T>U.....	37
25	Gráfica de distancia entre el bucle del aptámero y la arginina 5 del epítipo a lo largo de los 20 ns del evento de unión para el sistema (a) nativo, (b) 11T>PSU, (c) 11T>1MP, (d) 12T>U y (e) 11T>PSU/12T>U.....	38
26	(a) Zona de interacción del aptámero nativo y los surcos formados en la región del bucle de los aptámeros mutados: (b) 11T>PSU, (c) 11T>1MP, (d) 12T>U y (e) 11T>PSU/12T>U.....	39

## Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Representaciones químicas de los cinco nucleótidos naturales elegidos para mutar el aptámero.....	22
2	Energías libres y sus componentes calculados por MM/GBSA de los aptámeros con mutaciones puntuales.....	29
3	Energías libres y sus componentes calculados por MM/GBSA de los aptámeros con dobles mutaciones.....	32
4	Descripción detallada de la formación de enlaces de hidrógeno durante los eventos de interacción.....	35
5	Energías libres y sus componentes calculados por MM/GBSA para cada evento de unión de las simulaciones de tipo nativo, 11T>PSU, 11T>1MP, 12T>U y 11T>PSU/12T>U para el intervalo seleccionado de 20 ns.....	40

## Capítulo 1. Introducción

---

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Hoy en día, esta enfermedad es responsable de una de cada siete muertes a nivel mundial, siendo el cáncer de pulmón y el cáncer de mama los tipos más frecuentes en hombres y mujeres, respectivamente. La preocupación global por esta enfermedad está creciendo rápidamente, ya que sólo para el 2030 se predice que habrán 21.6 millones de nuevos diagnósticos de cáncer (CFF, 2017). Por lo tanto, la investigación e industria dirigidas a desarrollar nuevos fármacos contra el cáncer se están expandiendo a ritmo acelerado.

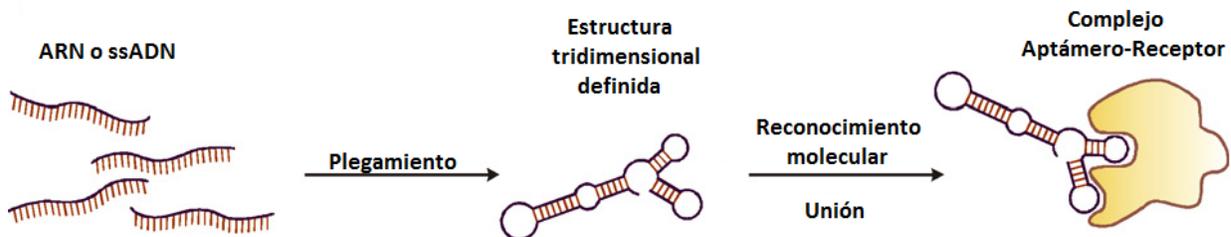
Según la última edición del *Global Oncology Trend Report*, los costos de terapias oncológicas y sus medicinas de apoyo, a nivel global, ascendieron a los 107 mil millones de dólares en el 2015, un aumento del 11.5% sobre el 2014. Se estima que para el 2020, estos costos lleguen a los 150 mil millones de dólares. En consecuencia, el desarrollo clínico de nuevos fármacos contra el cáncer se ha expandido en más del 60% durante la última década, con casi un 90% del presupuesto enfocado al desarrollo de terapias dirigidas contra el cáncer (Aitken, 2016).

El término de terapia dirigida se refiere a una nueva generación de fármacos contra el cáncer diseñados para interferir específicamente con receptores, típicamente alguna proteína, propios de las células cancerosas (Sawyers, 2004). Las terapias dirigidas contra el cáncer surgieron para dar solución a la gran cantidad de limitaciones que presenta la quimioterapia, la modalidad de tratamiento más empleada hoy en día. El objetivo principal de la quimioterapia yace en destruir al tumor maligno, al interferir con las células que se dividen de forma acelerada por medio de la interrupción de eventos esenciales para ellas. Sin embargo, los fármacos llegan a prácticamente todos los tejidos del organismo, y ejercen su acción, tanto sobre las células malignas como sobre las sanas (Chari, 2008; Brannon-Peppas and Blanchette, 2012).

Infortunadamente, debido a la poca selectividad de los agentes quimioterapéuticos, los tratamientos de quimioterapia, aún no son suficientemente efectivos para desaparecer el cáncer antes de que el paciente sea gravemente afectado (Brannon-Peppas and Blanchette, 2012). Actualmente, para generar fármacos capaces de dirigirse hacia un tumor canceroso se han estudiado y se explotan las diferencias entre células cancerosas y células sanas (Wang *et al.*, 2007). A diferencia de la quimioterapia tradicional, la terapia dirigida se enfoca en atacar anomalías moleculares específicas de las células cancerosas (Huang *et al.*, 2014). Con base en esta información, la investigación oncológica más reciente

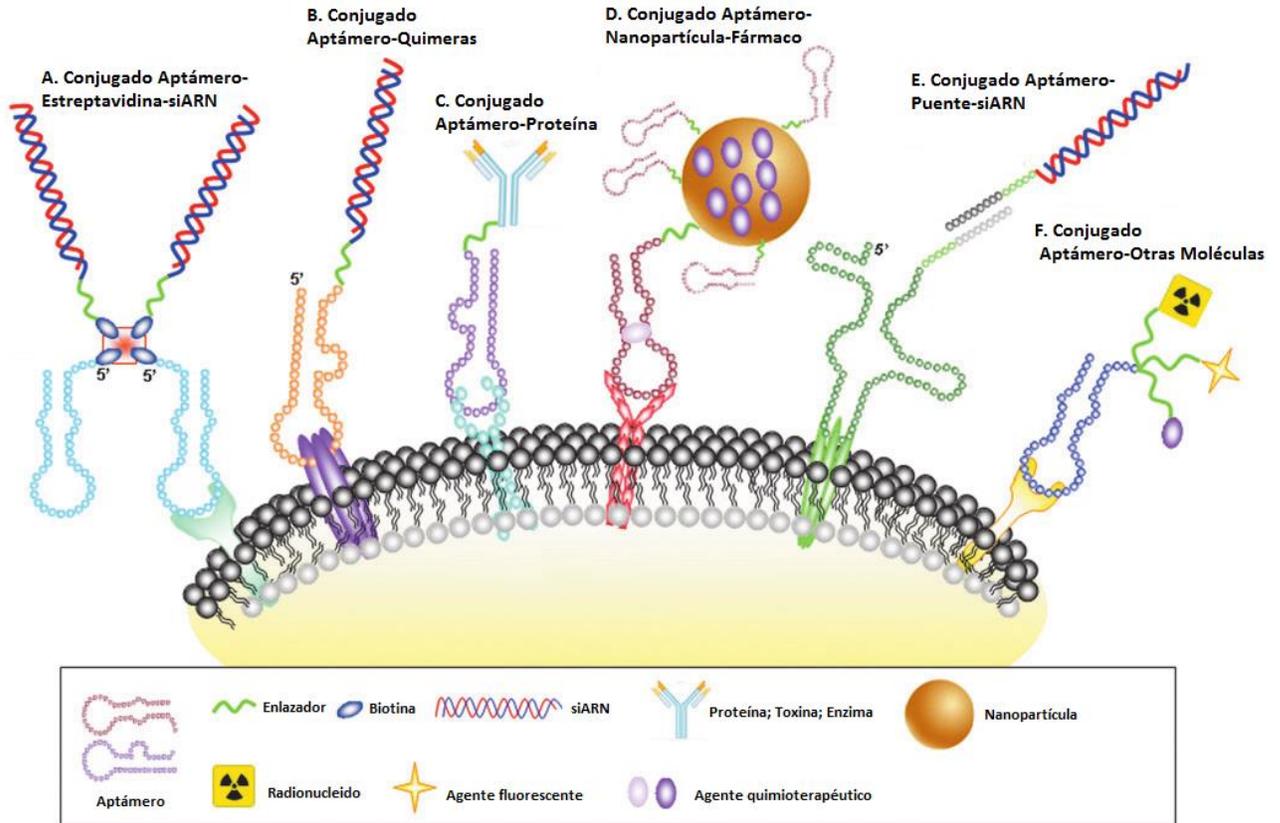
se ha orientado a desarrollar sistemas de nanopartículas acopladas a ciertas moléculas biológicas (ligandos), tales como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos u otras, capaces de unirse con alta afinidad a algunas moléculas receptoras que se encuentran en la membrana de las células de los tumores malignos (Wang *et al.*, 2007; Levy-Nissenbaum *et al.*, 2008).

Entre las estrategias más prometedoras para terapias dirigidas contra el cáncer se encuentra el uso de fármacos transportados por aptámeros. Los aptámeros son cadenas sencillas de oligonucleótidos de DNA o RNA que se pliegan para formar estructuras tridimensionales únicas (Figura 1), capaces de reconocer a diferentes receptores celulares, como proteínas, fosfolípidos, azúcares, y ácidos nucleicos, con alta afinidad y selectividad (Stoltenburg, Reinemann and Strehlitz, 2007; Levy-Nissenbaum *et al.*, 2008; Reshetnikov, Golovin and Kopylov, 2010; Chang, Yang and Huang, 2011; Li *et al.*, 2014; Rhinehardt, Srinivas and Mohan, 2015). La afinidad de unión entre un aptámero y un receptor celular es resultado de la compatibilidad estructural, las interacciones electrostáticas, de van der Waals y enlaces de hidrógeno, o de una combinación de estos efectos (Stoltenburg, Reinemann and Strehlitz, 2007).



**Figura 1.** Representación esquemática del funcionamiento de los aptámeros (Stoltenburg, Reinemann and Strehlitz, 2007). Los aptámeros son cadenas sencillas de DNA o RNA que se pliegan para formar estructuras tridimensionales capaces de unirse con alta afinidad y especificidad a receptores moleculares.

Existe mucho interés en la investigación e industria farmacéutica oncológica por utilizar diferentes sistemas de aptámeros unidos a fármacos (Figura 2) debido a que, en comparación con otros ligandos que existen actualmente, como los anticuerpos, estas estructuras tienen algunas ventajas. Entre estas ventajas se encuentran: un costo de síntesis bajo, un tamaño lo suficientemente pequeño para penetrar tumores sólidos, baja inmunogenicidad, y que permiten una amplia variedad de modificaciones químicas (Borbas *et al.*, 2007; Keefe, Pai and Ellington, 2010; Yu *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Sistemas de nanopartículas y aptámeros para terapias dirigidas contra el cáncer (Zhao *et al.*, 2014). La fabricación de nano-vehículos consiste en unir covalentemente el aptámero de interés a una nanopartícula por medio de un enlazador.

Hoy en día, uno de los aptámeros mejor identificados y más utilizados es el aptámero anti-MUC1. Este aptámero está compuesto por una cadena sencilla de 23 oligonucleótidos de DNA (*ssDNA*) y tiene afinidad por el receptor Mucina 1 (Rhinehardt, Srinivas and Mohan, 2015). Dicho receptor pertenece a una gran familia de glicoproteínas transmembranales, que a su vez forman parte de una clase de marcadores superficiales de tumores malignos que se expresan de forma única y abundante en una gran variedad de células cancerosas. Específicamente, la Mucina 1 se expresa de forma alterada en diversos carcinomas epiteliales tales como el cáncer de mama y el cáncer de pulmón (Levitin *et al.*, 2005; Borbas *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009; Kufe, 2009; Pichinuk *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014; Martínez-Sáez *et al.*, 2015).

El propósito de este trabajo fue investigar computacionalmente cómo algunas mutaciones puntuales en la estructura del aptámero anti-MUC1 pueden afectar su estabilidad y su afinidad con el

epítpe MUC-1, basándose en la información cualitativa y cuantitativa adquirida a partir de simulaciones de dinámica molecular y cálculos de energía libre. De tal modo, que los mejores candidatos puedan ser evaluados a través de estudios *in vitro* en la próxima fase de la investigación.

## Capítulo 2. Antecedentes

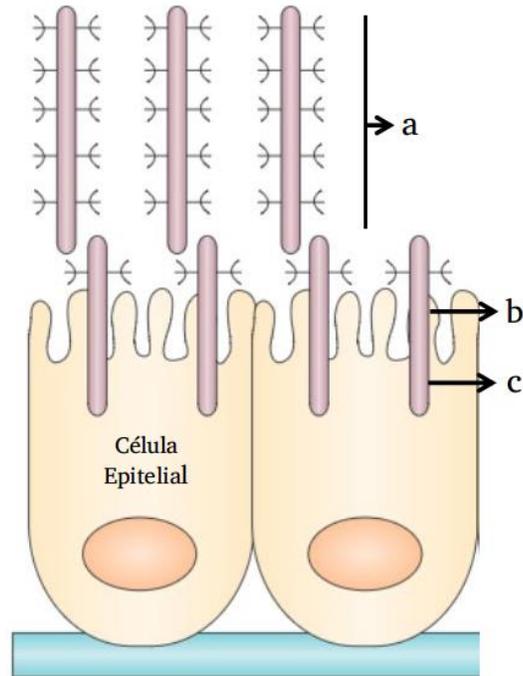
---

### 2.1. La Mucina 1 como receptor

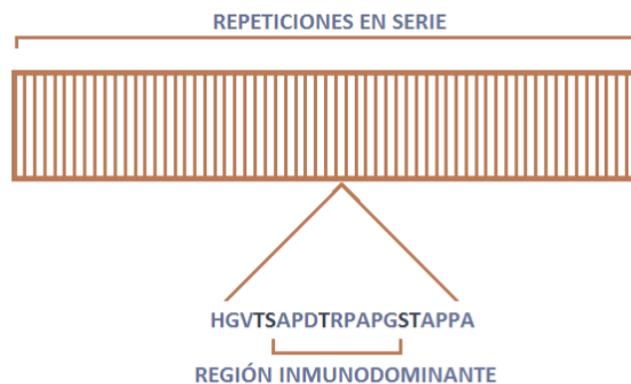
La glicoproteína Mucina 1 es encontrada tanto en células cancerosas como en células sanas; sin embargo, su expresión presenta dos características que favorecen que el aptámero anti-MUC1 se una preferentemente a la Mucina 1 de las células enfermas. Una de estas peculiaridades es que la Mucina 1 se sobreexpresa alrededor de 10 veces más en células de carcinomas que en células epiteliales saludables (Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1999; Kufe, 2009; Savla *et al.*, 2011; Pichinuk *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014). La otra, aún más favorable, es que la región inmunodominante (epítipo MUC-1) reconocida por el aptámero sólo está expuesta en células cancerosas, debido a modificaciones de la estructura química de la Mucina 1 que solo ocurren en las células malignas (Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1999; Kufe, 2009).

La Mucina 1 está conformada por un gran dominio extracelular, por una región transmembranal y por una pequeña región citoplasmática (Cai *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014). El dominio extracelular contiene un número variable de repeticiones en tándem de 20 aminoácidos (HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA) (Levitin *et al.*, 2005). Dichas repeticiones se encuentran altamente O-glicosiladas (se le ha añadido N-acetil-galactosamina a un residuo de serina o treonina), provocando que el dominio extracelular se extienda en forma de rodillo entre 100 y 200 nm sobre la superficie de células epiteliales (Figura 3) (Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1999).

En 1993, Papadimitriou y colaboradores (Burchell and Taylor-Papadimitriou, 1993) descubrieron las principales diferencias entre las características de la Mucina 1 expresada en células malignas y las que se encuentra en células epiteliales saludables. Existen cinco sitios potenciales para O-glicosilaciones en cada repetición en tándem de la Mucina 1. En su estudio demostraron que mientras que la célula sana presenta en promedio 2.5 O-glicosilaciones, la célula cancerosa tiene los cinco espacios ocupados por estos carbohidratos y que la estructura de estos se encuentra incompleta. Asimismo, determinaron que tales cambios en las glicosilaciones de la Mucina 1 en células cancerosas dan lugar a la exposición de epítopes (de secuencia APDTRPAPG) que se encontraban enmascarados (Figura 4). Son precisamente estos epítopes los que convierten a la Mucina 1 en un excelente receptor de aptámeros.



**Figura 3.** Componentes estructurales de la Mucina 1 en células epiteliales. Glicoproteína transmembranal que está compuesta de una (a) región extracelular que se extiende hasta 200 nm en el exterior de la célula, (b) una región transmembranal y (c) una pequeña región citoplasmática.



**Figura 4.** Secuencia del epítipo de la Mucina 1. La Mucina 1 está conformada por repeticiones en tándem de 20 aminoácidos, donde las serinas y treoninas pueden estar O-glicosiladas. La región inmunodominante (epítipo) se encuentra expuesta cuando existen 5 O-glicosilaciones incompletas por tándem.

## 2.2 Selección de aptámeros

En 1990, los grupos de Szostak y Gold describieron de forma independiente un método para seleccionar aptámeros capaces de unirse a dianas específicas (Szostak and Ellington, 1990; Tuerk and Gold, 1990). Este método, llamado 'selección *in vitro*' o 'selección sistemática de aptámeros por enriquecimiento exponencial' (SELEX, por sus siglas en inglés), tiene como base el concepto de evolución natural- diversificación, selección y replicación- y describe un procedimiento capaz de aislar ligandos de RNA de forma rápida. Szostak y Gold tenían la hipótesis de que, si un número muy grande (>10<sup>10</sup>) de secuencias aleatorias de RNA con conformaciones terciarias únicas era sometido a una selección a presión en paralelo, algunas de esas secuencias tendrían propiedades de unión.

El método de SELEX consiste en tres pasos: incubación de una biblioteca aleatoria de cadenas sencillas de oligonucleótidos con su molécula diana, separación de las cadenas unidas de las no unidas, y amplificación de las secuencias con afinidad (Toh *et al.*, 2015). Estos pasos se repiten entre 8 y 15 veces para obtener una solución enriquecida de ácidos nucleicos. Las secuencias obtenidas se analizan y la que se repita con mayor frecuencia es seleccionada como el aptámero con mayor potencial (Stoltenburg, Reinemann and Strehlitz, 2007).

A lo largo de los años, el método de SELEX ha pasado por una gran variedad de refinamientos y modificaciones. Hoy por hoy, los aptámeros pueden seleccionarse a partir de RNA o DNA y bajo condiciones que se asemejen más al medio ambiente de la aplicación prevista (Levy-Nissenbaum *et al.*, 2008). El desarrollo de estas nuevas variedades del método de SELEX y la versatilidad de los aptámeros han resultado en un incremento exponencial de publicaciones relacionadas con aptámeros durante los últimos años (Poolsup and Kim, 2017).

## 2.3 Selección del aptámero anti-MUC1

En el año 2006, Ferreira *et al.* utilizaron el método de SELEX para identificar una variedad de aptámeros sintéticos con alta afinidad por la glicoproteína Mucina 1. Los aptámeros fueron seleccionados a partir de una biblioteca inicial que contenía una región degenerada de 25 bases, dando lugar a 425 moléculas iniciales de ssDNA de secuencia aleatoria. El aptámero obtenido que demostró la mayor

afinidad por la Mucina 1, tenía la secuencia: GCAGTTGATCCTTTGGATACCCTGG. En sus experimentos incluso probaron que este aptámero fue capaz de interiorizarse con selectividad en las células epiteliales cancerosas. A dicho aptámero se le llamó anti-MUC1.

En este mismo estudio, se demostró que la región inmunodominante de la Mucina 1 yace justamente en la secuencia de 9 aminoácidos (APDTRPAPG) que Papadimitriou y colaboradores (Burchell and Taylor-Papadimitriou, 1993) habían determinado. Esto lo hicieron al repetir la metodología de SELEX utilizando dos péptidos: uno de 9 aminoácidos y en el otro de 60 aminoácidos, correspondiente a 3 veces la secuencia de una sección del tándem (HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA). Las dos selecciones dieron como resultado secuencias idénticas para el aptámero.

## **2.4 Estructura tridimensional del aptámero anti-MUC1**

La estructura tridimensional del aptámero anti-MUC1 fue determinada por Baouendi y colaboradores en el 2011. Para su estudio partieron de la secuencia del aptámero obtenida por Ferreira *et al.* (2006). Determinaron su conformación estructural utilizando Modelamiento Molecular y Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Sus resultados muestran que el aptámero contiene cuatro secciones: tres pares de Watson-Crick, seguidos de tres pares de bases no apareadas, luego otros cuatro pares de Watson-Crick y finaliza con un bucle de tres timinas (Figura 5). El aptámero anti-MUC1 está compuesto de 728 átomos y tiene una carga neta de -22.0 e. El archivo con toda la información estructural del aptámero construido por este equipo ahora se encuentra disponible bajo el código 2L5K en la base de datos del Protein Data Bank (por sus siglas en inglés).

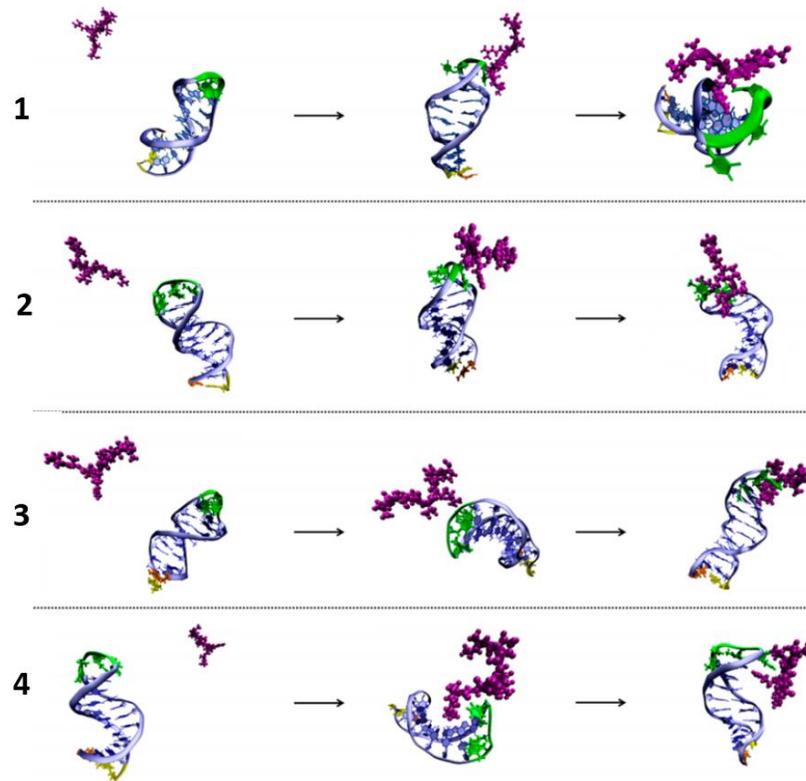


**Figura 5.** Secuencia de nucleótidos del aptámero anti-MUC1. Círculos cerrados: pares de Watson-Crick, círculos abiertos: pares no apareados (Baouendi *et al.*, 2012).

## 2.5 Interacción entre el aptámero anti-MUC1 y la Mucina 1

Recientemente, Rhinehardt, Srinivas y Mohan (2015) describieron detalladamente la interacción entre el aptámero anti-MUC1 y el epítipo de la glicoproteína Mucina 1 por medio de estudios de Dinámica Molecular. Las conformaciones iniciales para el aptámero anti-MUC1 de 23 ácidos nucleicos y el epítipo de 9 aminoácidos (APDTRPAPG) fueron obtenidas del PDB. En este estudio se reportaron los resultados de 4 dinámicas de 300 ns cada una y con coordenadas iniciales diferentes (Figura 6). En cada una de ellas, el evento de unión fue examinado por el cálculo de la distancia entre el péptido y el aptámero.

Los cálculos de Modelamiento Molecular hechos por Rhinehardt y colaboradores demostraron que para cada una de las dinámicas la cantidad de tiempo que interactúan es variable, pero siempre resultan en una unión consistente y sostenida del péptido con la región del bucle del aptámero. Todas las simulaciones indican que la arginina del epítipo MUC1 desempeña un papel integral en la unión, y de forma consistente se une fuertemente a las timinas que se encuentran en el bucle del aptámero.



**Figura 6.** Cuatro trayectorias del aptámero anti-MUC1 y el epítipo de la Mucina 1 obtenidas por Dinámica Molecular (Rhinehardt, Srinivas and Mohan, 2015). En todas las trayectorias se observa que el epítipo se une a la región del bucle del aptámero.

## Capítulo 3. Justificación, Hipótesis y Objetivos

---

### 3.1 Justificación

La calidad y la esperanza de vida de los pacientes con cáncer dependerá directamente de la capacidad del tratamiento de dirigirse de forma específica a las células cancerosas del tumor (Brannon-Peppas and Blanchette, 2012). En consecuencia, surge la necesidad de generar vehículos, como los aptámeros, cada vez más selectivos y que se unan con mayor afinidad a los receptores de células cancerosas para aumentar las eficiencias de los fármacos anticancerígenos (Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1999; Ferreira, Matthews and Missailidis, 2006; Cerchia and de Franciscis, 2010).

Por otra parte, los estudios computacionales se están convirtiendo en una herramienta estándar de las investigaciones científicas, y los hallazgos propuestos a menudo no se aceptan solamente sobre la base de experimentos. Hoy en día, los modelos computacionales se vuelven casi obligatorios, especialmente cuando un estudio argumenta a favor de un nuevo mecanismo de reacción. Estudios previos han demostrado que las simulaciones computacionales de dinámica molecular y los cálculos de energía libre juegan un papel importante en la investigación de mecanismos de unión proteína-ligando (Genheden and Ryde, 2015; Vidal-Limón *et al.*, 2017). Por lo tanto, este trabajo tuvo como enfoque el mejorar la afinidad de unión entre aptámero anti-MUC1 y el epítipo MUC1 utilizando técnicas computacionales.

### 3.2 Hipótesis

Las mutaciones puntuales en el aptámero anti-MUC1 aumentan su afinidad de unión por el epítipo de la Mucina 1.

### **3.3 Objetivos**

#### **3.3.1 Objetivo General**

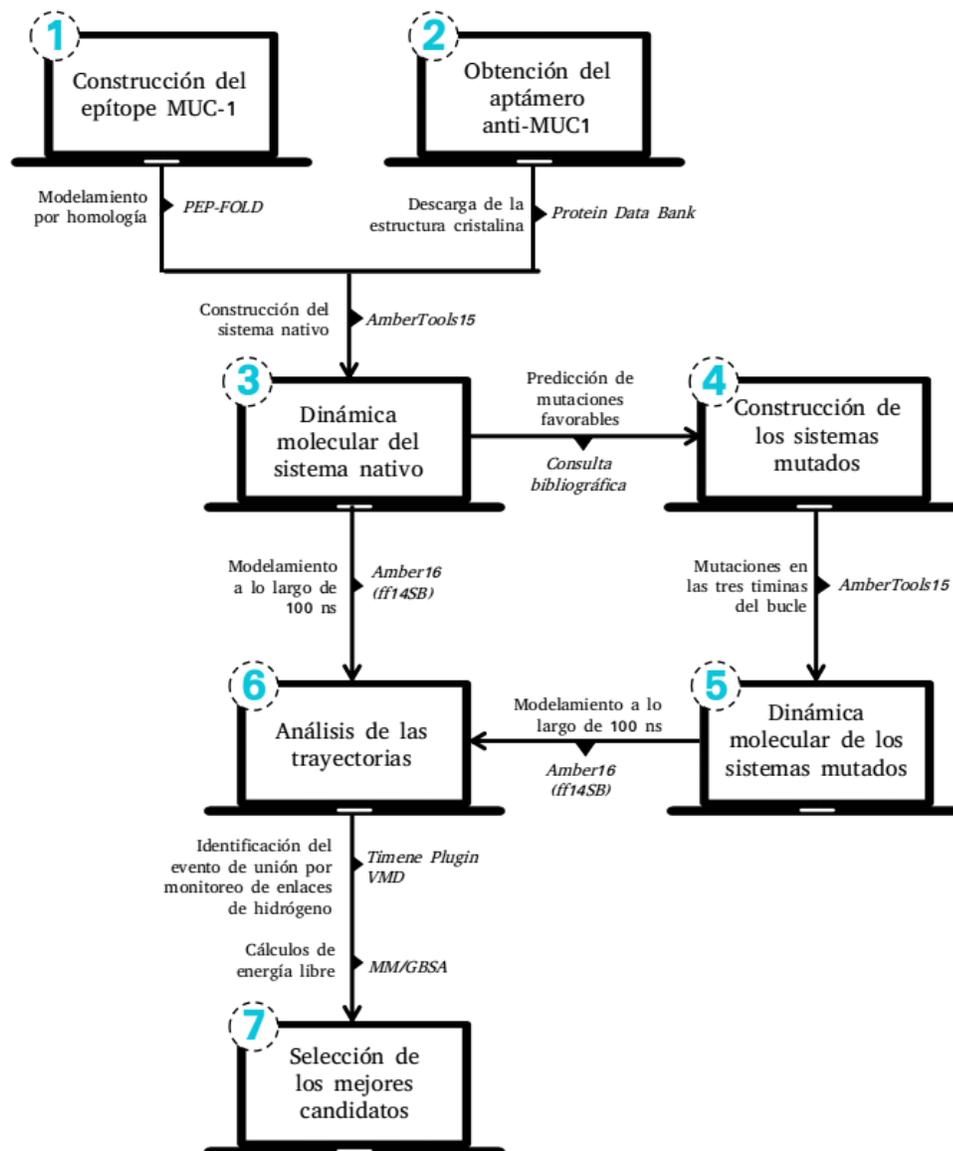
Estudiar de forma computacional el efecto que ejercen las mutaciones puntuales sobre el aptámero anti-MUC1 en su interacción con el epítotope de la Mucina 1.

#### **3.3.2 Objetivos Particulares**

1. Estudiar las interacciones de unión entre el aptámero nativo y el epítotope MUC-1 por medio de Dinámica Molecular.
2. Identificar posibles mutaciones favorables para la interacción y ejercerlas sobre la estructura nativa del aptámero anti-MUC1.
3. Estudiar el efecto de las mutaciones generadas en el aptámero anti-MUC1 sobre su interacción con el epítotope MUC-1 por medio de Dinámica Molecular.
4. Evaluar la interacción de unión del sistema nativo y de los sistemas mutados por medio de monitoreo de enlaces de hidrógeno y cálculos de energía por el método MM/GBSA para seleccionar a los mejores candidatos.

## Capítulo 4. Metodología

En este capítulo se hará una descripción detallada de la metodología empleada para cada paso de este estudio. En la Figura 7 se muestra el diagrama del flujo de trabajo. Todos los cálculos de simulación de dinámica molecular fueron realizados en GPUs del cluster de supercómputo Aikanaro de la Universidad Andrés Bello, Chile, y en la supercomputadora Miztli de la UNAM, Ciudad de México.



**Figura 7.** Esquema de la metodología empleada para mejorar la afinidad de unión del aptámero anti-MUC1 por el epítipo de la Mucina 1. Se resaltan los programas utilizados en cada paso.

## 4.1 Sistemas simulados

La configuración inicial del aptámero S2.2 anti-MUC1 se obtuvo a desde el PDB: código 4L5K (Figura 8A) (Baouendi *et al.*, 2012). El PDB es una base de datos en línea que recopila los resultados de los experimentos de determinación de estructuras moleculares, organiza los datos y los pone a disposición de la comunidad de forma gratuita (Westbrook *et al.*, 2003).

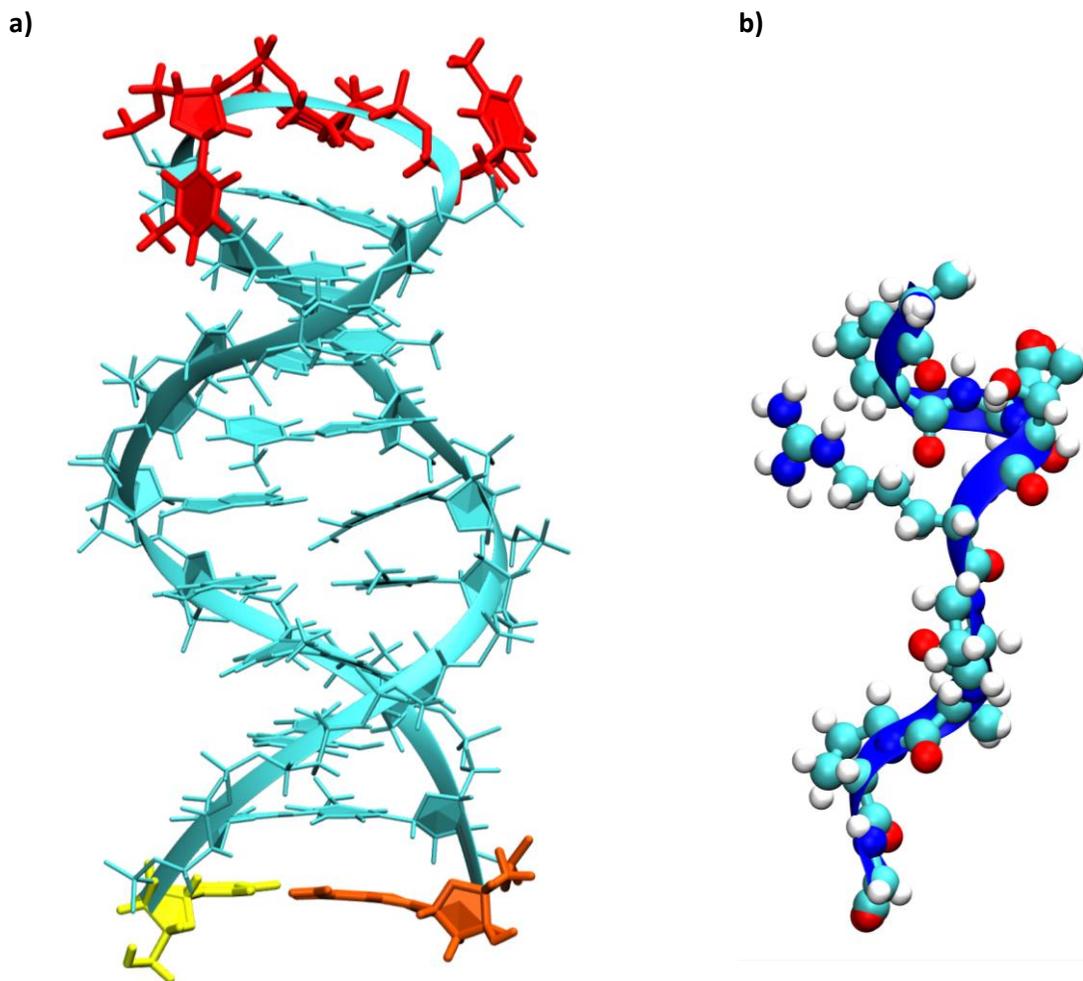
El epítipo MUC-1 de 9 residuos (APDTRPAPG) se modeló mediante predicción utilizando el servidor PEP-FOLD (Figura 8B) (Thévenet *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2014). PEP-FOLD es un servidor en línea, dirigido al modelado *de novo* de conformaciones tridimensionales para péptidos entre 9 y 25 aminoácidos en solución acuosa. Este programa predice los perfiles de la secuencia de los aminoácidos y ensambla los fragmentos pronosticados mediante un procedimiento que utiliza una versión modificada del campo de fuerza OPEP. A partir de una secuencia de aminoácidos, PEP-FOLD realiza una serie de 50 simulaciones y devuelve las conformaciones más representativas identificadas en términos de energía y frecuencia. Se eligió la conformación de menor energía calculada con PEP-FOLD para este estudio. La secuencia del epítipo en formato pdb se encuentra en la sección A1 del apéndice.

Para construir las mutaciones en la estructura del aptámero, se eligieron 5 de los nucleótidos sintéticos reportados por Psciuk *et al.* (2006). Todas las mutaciones se construyeron utilizando el módulo Leap en Amber 16 (D.A. Case, *et al.*, 2016). Cada uno de los nucleótidos elegidos ya se encontraba parametrizado para el campo de fuerza que se utilizó en los cálculos de dinámica molecular descritos a continuación.

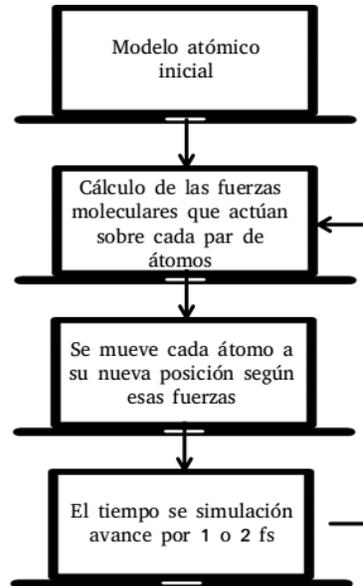
## 4.2 Simulaciones por dinámica molecular

Las simulaciones de dinámicas moleculares, desarrolladas a fines de la década de 1970, se basan en la física newtoniana para simular movimientos atómicos (Durrant and McCammon, 2011). El proceso general de aproximación utilizado por esta técnica se describe en la Figura 9. Primero, se prepara un modelo computacional del sistema molecular a partir de datos obtenidos por resonancia magnética nuclear (RMN), cristalografía u homología. Después, se estiman las fuerzas que actúan sobre cada par de átomos del sistema a partir de la ecuación de la Figura 10. Todas las fuerzas que surgen a partir de las

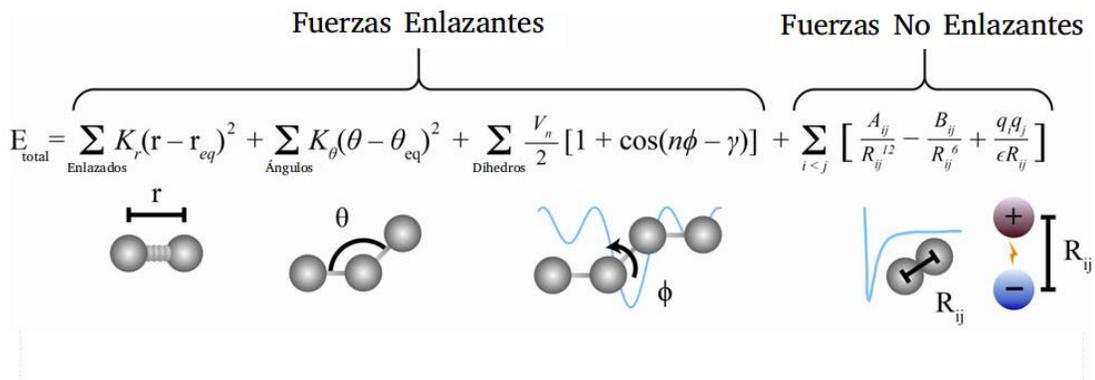
interacciones entre átomos tanto enlazados como los no enlazados tienen una contribución. Los enlaces químicos y los ángulos atómicos se modelan utilizando resortes virtuales simples, y los ángulos diedros se modelan utilizando una función sinusoidal que se aproxima a las diferencias de energía entre las conformaciones eclipsadas y escalonadas (Durrant and McCammon, 2011). Las fuerzas no enlazantes surgen debido a las interacciones de van der Waals, modeladas utilizando el potencial de Lennard-Jones 6-12, a las interacciones cargadas (electrostáticas) que son modeladas con la ley de Coulomb (Jones, 1924), y a la formación de enlaces de hidrógeno.



**Figura 8:** Estructuras de las moléculas utilizadas en este estudio: (a) aptámero anti-MUC1 nativo (ilustrado como una cadena principal de cinta) con reflejos en los 3 nucleótidos de timina de la región del bucle (rojo) y el 3 '(amarillo) y 5 '(naranja) terminal. (b) Epítipo MUC-1 (mostrado en representación de bolas y barras con la cadena principal representada en forma de cinta). Código de color: oxígeno, rojo; carbono, cian; nitrógeno, azul; hidrógeno, blanco.



**Figura 9.** Esquema que muestra el protocolo estándar para realizar una simulación de dinámica molecular. En primer lugar, se prepara un modelo estructural del sistema receptor-ligando. Después, se estiman las fuerzas que actúan cada par de átomos del sistema. Finalmente, las posiciones de los átomos se mueven de acuerdo con las leyes de movimiento de Newton. El proceso se repite conforme el tiempo de simulación avanza.



**Figura 10.** Ejemplo de una ecuación utilizada para aproximar las fuerzas atómicas que gobiernan el movimiento molecular. Las fuerzas atómicas que gobiernan el movimiento molecular se pueden dividir en aquellas causadas por interacciones entre átomos que están enlazados y aquellos causadas por interacciones entre átomos que no enlazados. Los enlaces químicos y los ángulos atómicos se modelan utilizando resortes simples, y los ángulos diedros (es decir, las rotaciones sobre un enlace) se modelan utilizando una función sinusoidal que se aproxima a las diferencias de energía entre las conformaciones eclipsadas y escalonadas. Las fuerzas no ligadas surgen debido a las interacciones de van der Waals, modeladas con el potencial de Lennard-Jones, y las interacciones cargadas (electrostáticas), modeladas usando la ley de Coulomb.

Para reproducir el comportamiento real de las moléculas en movimiento, los términos de energía descritos anteriormente son parametrizados para ajustarse a datos obtenidos por cálculos mecánico-cuánticos y estudios experimentales. Esta parametrización incluye la identificación de la rigidez y longitudes ideales de los resortes que describen los enlaces químicos y ángulos atómicos, determinando las mejores cargas atómicas parciales utilizadas para calcular las energías de interacción electrostática, así como la identificación de los radios atómicos de van der Waals, y así sucesivamente. En conjunto, estos parámetros se denominan 'campos de fuerza' porque describen las contribuciones de las diversas fuerzas atómicas que rigen la dinámica molecular.

Una vez que se han calculado las fuerzas que actúan sobre cada uno de los átomos del sistema, las posiciones de estos átomos se mueven de acuerdo con las leyes de movimiento de Newton. El tiempo de simulación se avanza, a menudo por solo 1 o 2 cuatrillonésimas de segundo, y el proceso se repite, típicamente millones de veces. Debido a que se requieren tantos cálculos, las simulaciones de dinámica molecular se realizan generalmente en clústeres de computadoras o supercomputadoras que usan docenas o cientos de procesadores en paralelo (Durrant and McCammon, 2011).

Las simulaciones de dinámica molecular de este estudio se realizaron con el software AMBER16 (D.A. Case, R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese *et al.*, 2016). Los parámetros de la estructura proteica se describieron usando el campo de fuerza ff14SB. La asignación de los tipos de átomos y el cálculo de las cargas parciales para cada aptámero se llevaron a cabo utilizando la implementación Antechamber de Ambertools15, utilizando el método semiempírico estándar AM1. Todos los sistemas se solvataron en una caja cúbica de 10 Å de longitud utilizando el modelo de agua TIP3P y se añadieron contraiones de Na<sup>+</sup> para garantizar la neutralidad de la carga total. Las interacciones no ligadas se calcularon dentro de un límite de 12 Å, y las electrostáticas de largo alcance se trataron usando el método *Particle-Mesh Ewald*. El algoritmo SHAKE se habilitó para restringir todos los enlaces que implican hidrógeno durante las simulaciones. El protocolo de dinámica molecular consistió en: (a) 5000 pasos de minimización de descenso más empinados seguidos de 10000 pasos de minimización de gradiente conjugado, (b) 500 ps de calentamiento NVT progresivo de 0 a 300K y (c) 5 ns de equilibrio NVT (d) 100 ns de dinámica de producción de NPT a 300 K y 1 bar, desde donde se recopilaron los datos de producción.

### 4.3 Análisis de las trayectorias

Las trayectorias de dinámica molecular se analizaron mediante la implementación del software VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>)(Humphrey, Dalke and Schulten, 1996). Se realizaron cálculos RMSD, RMSF ponderados en masa para el aptámero utilizando el procesador CPPTRAJ (Roe and Cheatham III, 2013). El plugin Timeline de VMD se empleó para identificar el evento de unión mediante el monitoreo de enlaces de hidrógeno a lo largo de las trayectorias de las dinámicas moleculares de los sistemas en estudio. Luego, se calcularon las distancias entre los aptámeros y el epítipo a lo largo del evento de unión y se realizaron cálculos de MM/GBSA para evaluar la energía de los sistemas. Finalmente, se estudiaron los cambios conformacionales en el aptámero por medio de análisis de las trayectorias con el visualizador gráfico de VMD y cálculos del radio de giro con el procesador CPPTRAJ.

#### 4.3.1 RMSD: *Root Mean Square Deviation*

Para el análisis conformacional de los aptámeros se utilizó la medida RMSD la cual mide la distancia media entre los átomos de dos estructuras moleculares previamente superpuestas mediante el algoritmo de Kabsch. Se evaluó cada conformación (*frame*,  $t$ ) a lo largo del tiempo de la trayectoria frente al *frame* de referencia  $t = 0$ , el cual corresponde a la estructura cristalográfica del aptámero. La ecuación es la siguiente:

$$RMSD_{t,0} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \| r_i(t) - r_i(0) \|^2} \quad (1)$$

donde  $RMSD_{t,0}$  es el valor de RMSD en Å entre una estructura en el instante  $t$  y una estructura de referencia en el instante 0.  $N$  es el número de átomos en la estructura;  $r_i(t)$  y  $r_i(0)$  son los vectores de coordenadas del átomo  $i$  en los *frames*  $t$  y  $0$ , respectivamente (Dixit, Ponomarev and Beveridge, 2006).

### 4.3.2 RMSF: Root Mean Square Fluctuation

La flexibilidad estructural de cada residuo del aptámero se calculó por RMSF el cual sigue un principio similar al del RMSD con la diferencia de que se evalúa de forma independiente cada residuo, y de que la estructura de referencia es la media de todas las coordenadas (x, y, z) que dicho átomo tiene a largo de una trayectoria. La ecuación es la siguiente:

$$RMSF_j = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{i=1}^T \|\alpha_{ij} - \bar{\alpha}\|^2}, \quad \text{con} \quad \bar{\alpha} = \frac{1}{T} \sum_{i=1}^T \alpha_i \quad (2)$$

donde  $RMSF_j$  es el valor de RMSF en Å del residuo  $j$  del aptámero.  $T$  es el número *frames* en la trayectoria;  $\alpha_{ij}$  es el vector de coordenadas de  $\alpha$  en el *frame*  $i$  del residuo  $j$ ; y  $\bar{\alpha}$  es el vector de la media de las coordenadas de  $\alpha$  en el residuo  $j$  tomando en cuenta todos los *frames*.

### 4.3.3 MM/GBSA

Los cálculos de energía libre de unión de proteína-ligando se estimaron usando el método MM/GBSA. Se realizaron dos estimaciones: 1) de los últimos 2500 *frames* y 2) de los 1000 *frames* correspondientes a los 20 ns del mejor evento de unión de cada producción de dinámica molecular. El método MM/GBSA (energías mecánicas moleculares combinadas con el método Poisson-Boltzmann o generalizado de solvatación continua del área de la superficie y del nacimiento) se ha utilizado ampliamente para estimar las afinidades de unión al ligando en muchos sistemas. La energía libre de un estado se estima a partir de la siguiente suma:

$$G = E_{\text{unión}} + E_{\text{ele}} + E_{\text{vdw}} + G_{\text{pol}} + G_{\text{gas}} - TS \quad (3)$$

donde los tres primeros términos son estándares de energía MM a partir de interacciones ligadas (enlace, ángulo y diedro), electrostáticas y de van der Waals.  $G_{\text{pol}}$  y  $G_{\text{gas}}$  son las contribuciones polares y no polares a las energías libres de solvatación.  $G_{\text{pol}}$  se obtiene típicamente resolviendo la ecuación PB o usando el modelo Born generalizado (GB, que proporciona el enfoque MM/GBSA), mientras que el término no polar se estima a partir de una relación lineal con el área superficial accesible al disolvente (SASA). El último

término en la ecuación 3 es la temperatura absoluta,  $T$ , multiplicada por la entropía,  $S$ . Nuestros cálculos GB se llevaron a cabo utilizando igb de 2 con valores  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de 1.0, 0.8 y 4.85, respectivamente. Las constantes dieléctricas para el solvente y el soluto se ajustaron a 80 y 5, respectivamente (Genheden and Ryde, 2015).

#### 4.3.4 Enlaces de Hidrógeno

El enlace de hidrógeno es uno de los fenómenos moleculares más importantes a considerar en estudios por dinámica molecular. Desempeña un papel vital en la estructura y función de varias moléculas interesantes, por ejemplo, es responsable de las características estructurales secundarias y terciarias y de interacciones intermoleculares de proteínas y ácidos nucleicos (Shibata and Zielinski, 1992). Por lo tanto, como parte fundamental de este estudio, se hizo un monitoreo de los enlaces de hidrógeno a lo largo de las trayectorias de 100 ns considerando distancias y ángulos de corte de 3.0 Å y 20°, respectivamente.

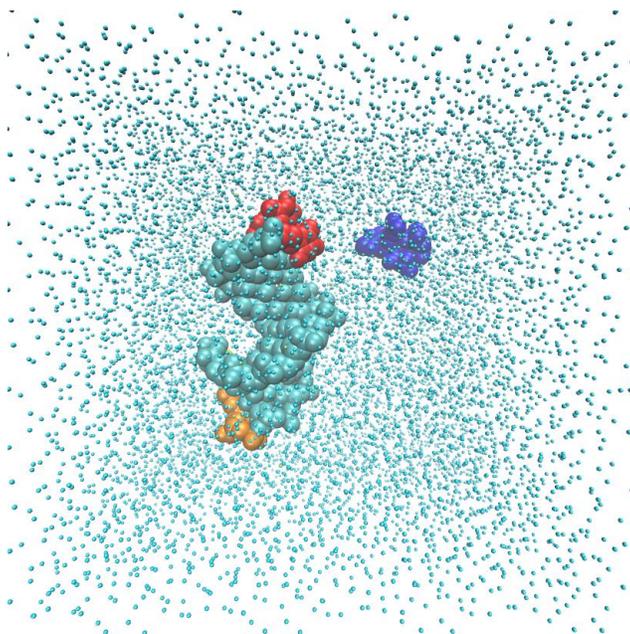
Los enlaces de hidrógeno son interacciones entre el átomo de hidrógeno unido covalentemente a un donador electronegativo y el par solitario de electrones de un aceptor. Mientras que los enlaces de hidrógeno a menudo se consideran primordial o exclusivamente interacciones electrostáticas, muchos estudios de complejos unidos por este tipo de enlaces muestran que los enlaces de hidrógeno son más cortos que la suma de los radios de van der Waals de los átomos donadores y aceptores, y que muestran mayores restricciones angulares que las interacciones electrostáticas puras. Esto indica que en un enlace de hidrógeno existe superposición orbital y carácter covalente parcial (Herschlag and Pinney, 2018).

## Capítulo 5. Resultados y Discusiones

---

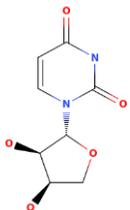
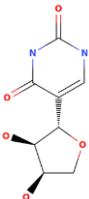
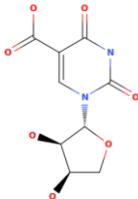
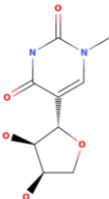
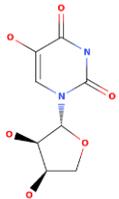
### 5.1. Mutaciones y dinámica molecular

Una de las principales ventajas de trabajar con aptámeros es que permiten una gran variedad de modificaciones químicas. Existen una gran cantidad de nucleótidos sintéticos reportados que presentan características muy interesantes para realizar mutaciones que cambien el ambiente químico del sitio de unión entre dos moléculas. Se eligieron cinco de los nucleótidos sintéticos reportados por Psciuk *et al.* (2006) debido a sus diferentes estructuras, polaridades y capacidades de formar enlaces de hidrógeno, para mutar las tres timinas de la región del bucle del aptámero anti-MUC1. Se ha demostrado que dicha región de 3 timinas juega el papel más importante en la interacción epítipo-aptámero (Rhinehardt, Srinivas and Mohan, 2015). Los tres nucleótidos fueron mutados con Uridina (U), 5-carboximetil uridina (5CU), 5-hidroxil uridina (5HU), Pseudouridina (PSU) y 1-metil pseudouridina (1MP), resultando en un total de 15 aptámeros mutados, todas las estructuras se muestran en la Tabla 1.



**Figura 11.** Preparación del sistema nativo para la simulación de dinámica molecular. Caja de agua con el aptámero anti-MUC1, el epítipo MUC-1 y iones de  $\text{Na}^+$ , que en conjunto conforman un sistema de carga neutra de 35,243 átomos.

**Tabla 1.** Representaciones químicas de los cinco nucleótidos naturales elegidos para mutar el aptámero.

Estructura	Nombre (código)	Estructura	Nombre (código)
	Uracilo (U)		Pseudouridina (PSU)
	5-carboximetil uridina (5CU)		1-metil pseudouridina (1MP)
	5-hidroxil uridina (5HU)		

Se construyó el sistema nativo y se simuló por dinámica molecular durante 100 ns de producción (Figura 11). Luego, se siguió la misma metodología para la construcción y el modelamiento de los sistemas mutados. Las simulaciones de dinámica molecular se han convertido en una herramienta estándar para la investigación de biomoléculas y un gran número de estudios han validado esta técnica utilizando datos experimentales (van Gunsteren, Dolenc and Mark, 2008). Las simulaciones ayudan a nuestra comprensión de los procesos biológicos y dan una dimensión dinámica a los datos estructurales del sistema estudiado (Hansson, Oostenbrink and van Gunsteren, 2002).

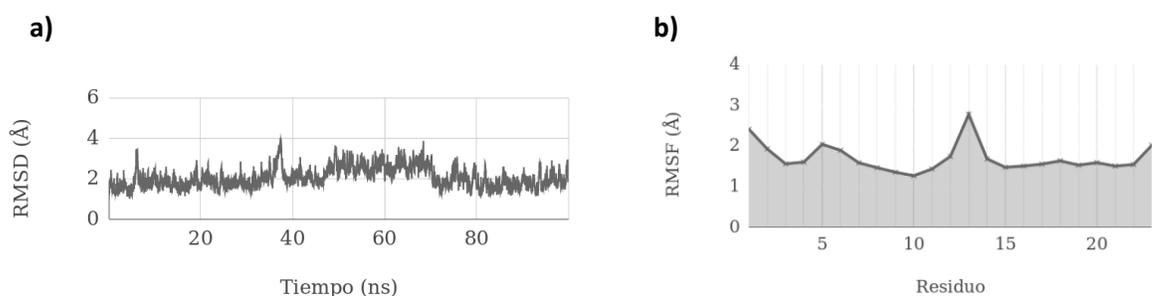
## 5.2. Equilibrio y flexibilidad de las dinámicas moleculares

Antes de analizar las interacciones entre los diferentes aptámeros y el epítipo, fue necesario que determináramos la confiabilidad de las dinámicas moleculares. Para esto, se realizaron estudios de desviación de la distancia cuadrática media (RMSD) a todos los aptámeros a lo largo de las trayectorias calculadas de 100 ns. El aptámero nativo presentó una gráfica estable que llegó al equilibrio con un RMSD

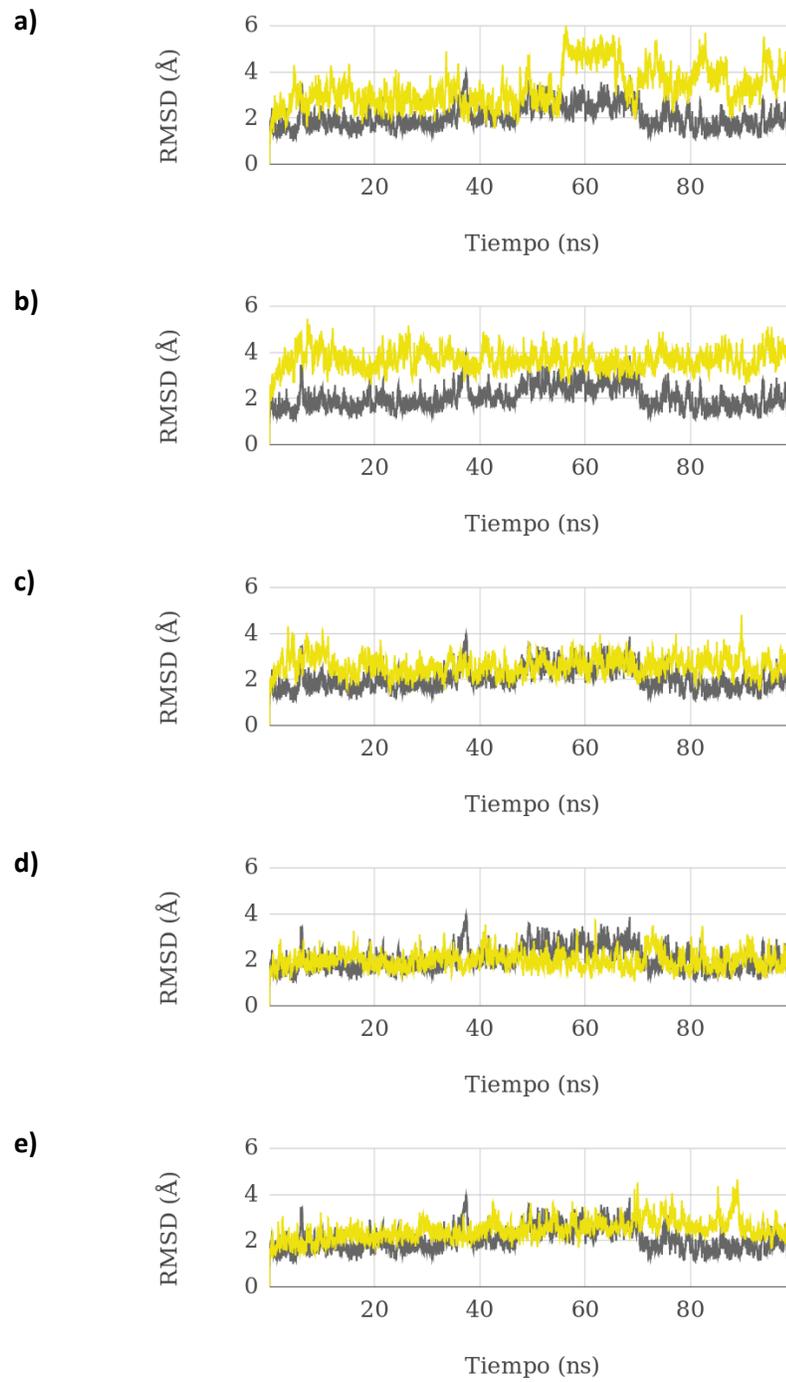
promedio de 2.05 Å (Figura 12A). En la gráfica se aprecia una pequeña elevación del RMSD entre los 45 y 75 ns de simulación que corresponde a un cambio conformacional ocasionado por su interacción con el epítotope. El RMSD del aptámero nativo se tomó como referencia para analizar el equilibrio de los sistemas mutados.

En la Figura 13 se muestran los RMSD calculados para todos los aptámeros con mutación en el residuo 11. Las estructuras que fueron mutadas con 5HU, PSU y 1MP presentaron un RMSD muy similar al del nativo. El mutante con 5CU muestra un valor de RMSD ligeramente más elevado a la referencia pero también se encuentra en equilibrio. Por su parte, el aptámero mutado con U presenta una serie de cambios conformacionales a partir de los 55 ns que corresponden a una inestabilidad ocasionada por la unión y despegue recurrente entre el aptámero y el epítotope. Finalmente, en las gráficas de las Figuras 14 y 15 vemos que todos los mutantes con modificaciones en los residuos 12 y 13 llegan al equilibrio de forma muy similar al nativo, presentando cambios conformacionales mínimos a lo largo de las dinámicas.

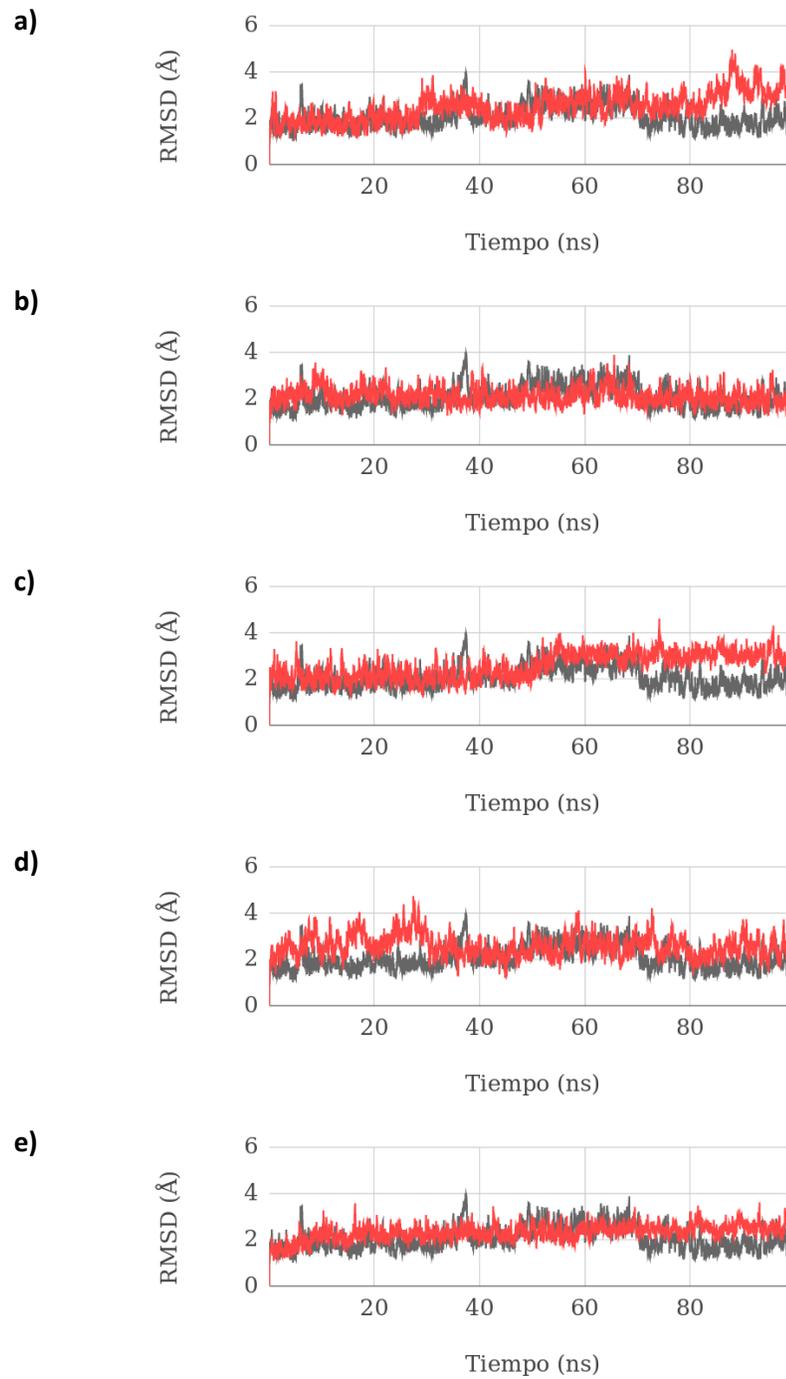
La información detallada sobre la flexibilidad del aptámero nativo y de los mutados se puede evaluar mediante el cálculo de RMSF, dichos promedios se calcularon en función de las trayectorias equilibradas de cada dinámica. El aptámero nativo presenta valores de RMSF (Figura 12A) muy específicos debido a sus enlaces de hidrógeno intramoleculares, consistente con los descritos previamente por Ferrerira *et al.*, 2012 (Figura 6). La flexibilidad de los residuos depende las formaciones de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre las cadenas laterales del aptámero. Se calculó el RMSF para cada uno de los 23 nucleótidos de los aptámeros mutados a lo largo de los 100 ns y sus gráficas se muestran en las Figuras 16, 17 y 18. Todos los mutantes conservaron un comportamiento de RMSF similar al del nativo, asegurando que la estabilidad estructural global se conservó para cada uno.



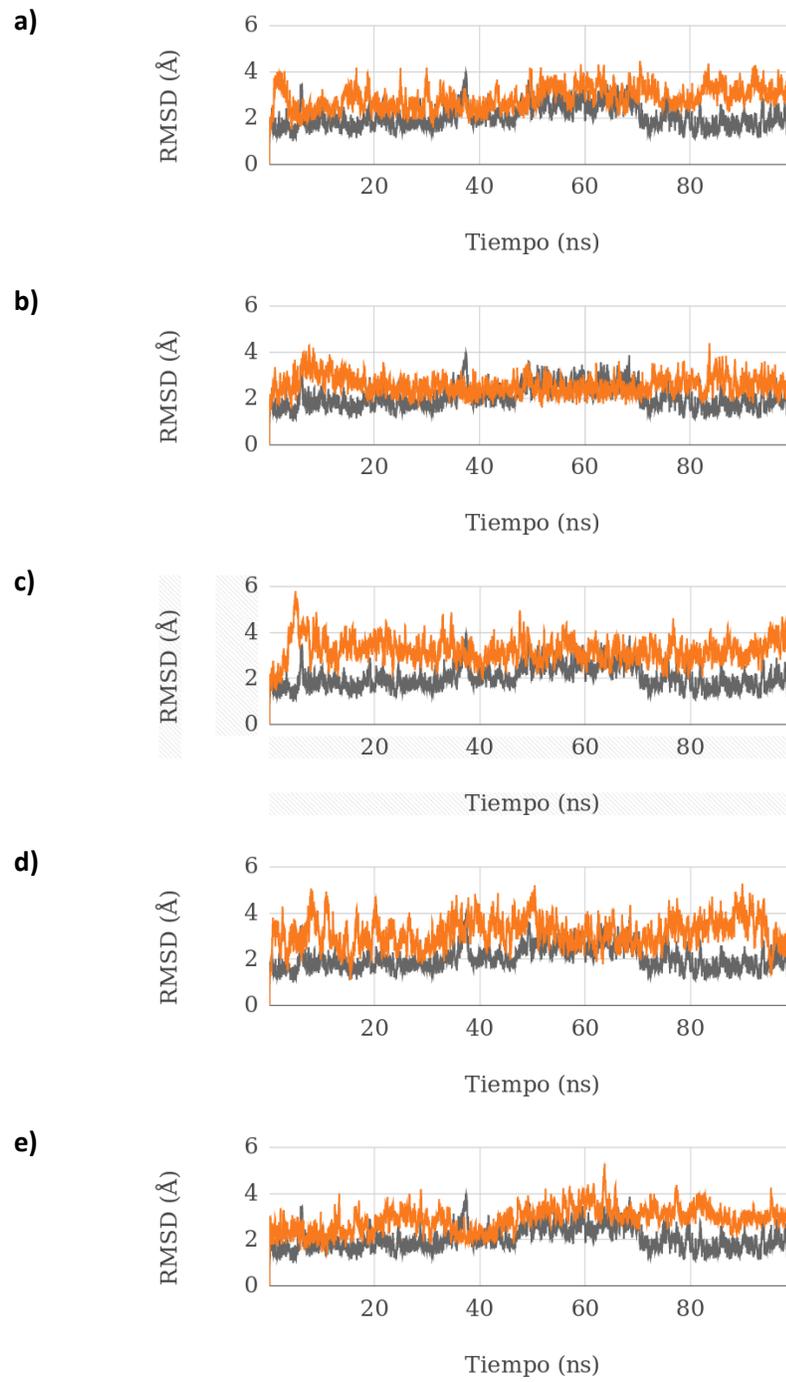
**Figura 12.** Gráficas de (a) RMSD y (b) RMSF del sistema nativo.



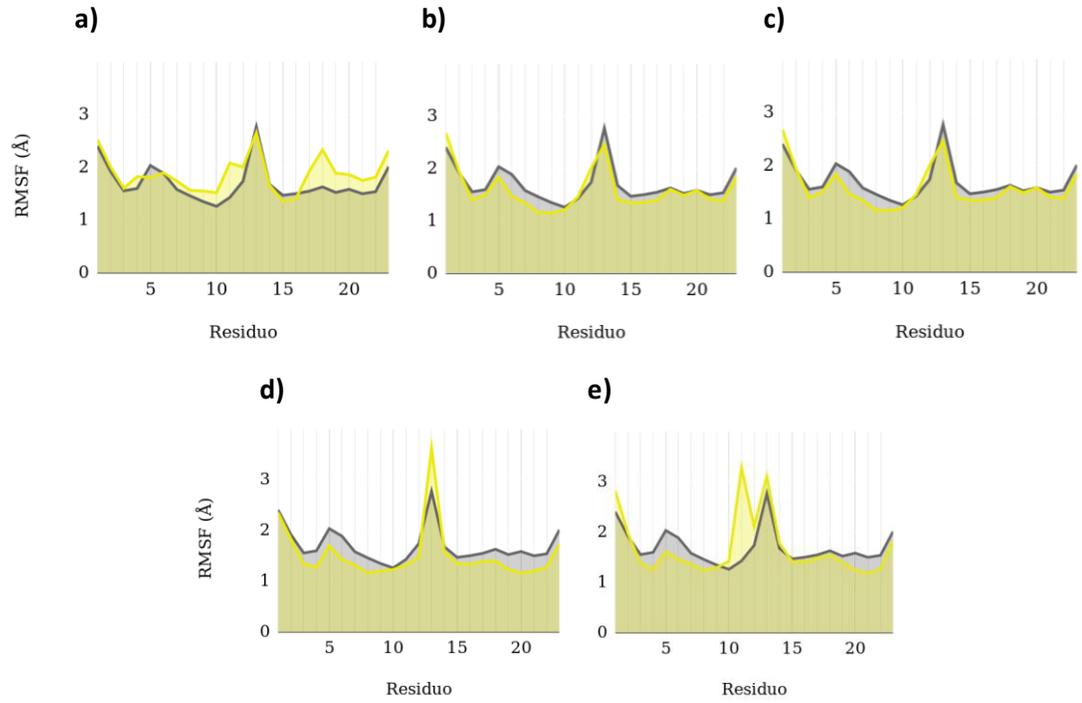
**Figura 13.** RMSD de los sistemas mutantes para la timina 11; (a) U, (b) 5CU, (c) 5HU, (d) PSU y (e) 1MP.



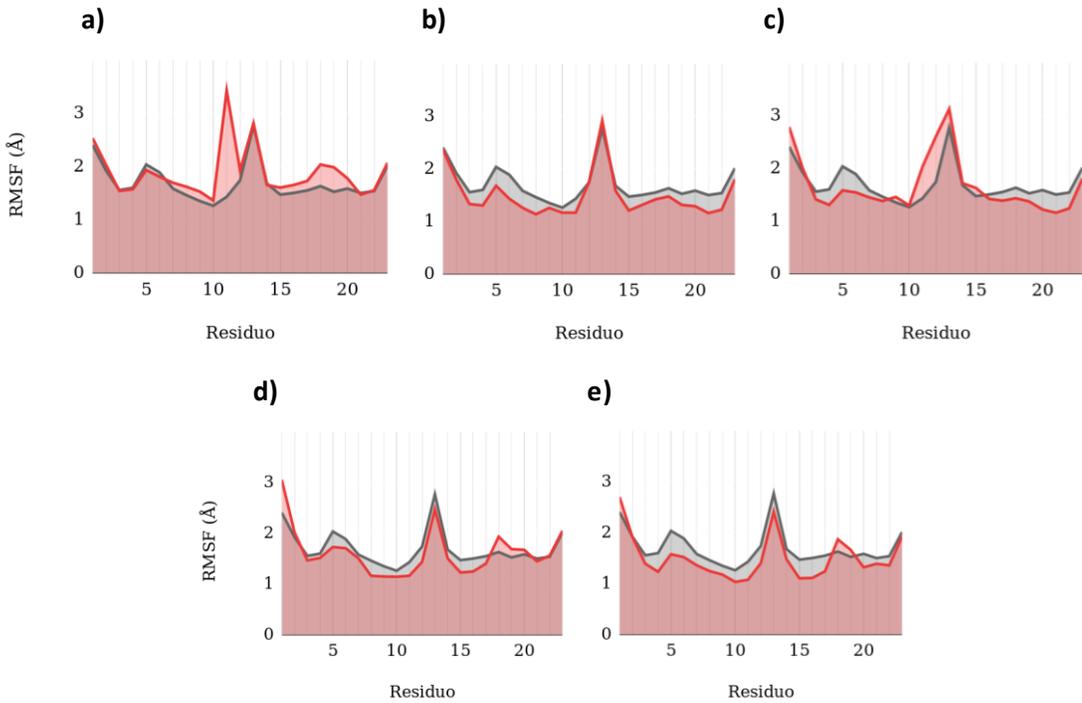
**Figura 14.** RMSD de los sistemas mutantes para la timina 12; (a) U, (b) 5CU, (c) 5HU, (d) PSU y (e) 1MP.



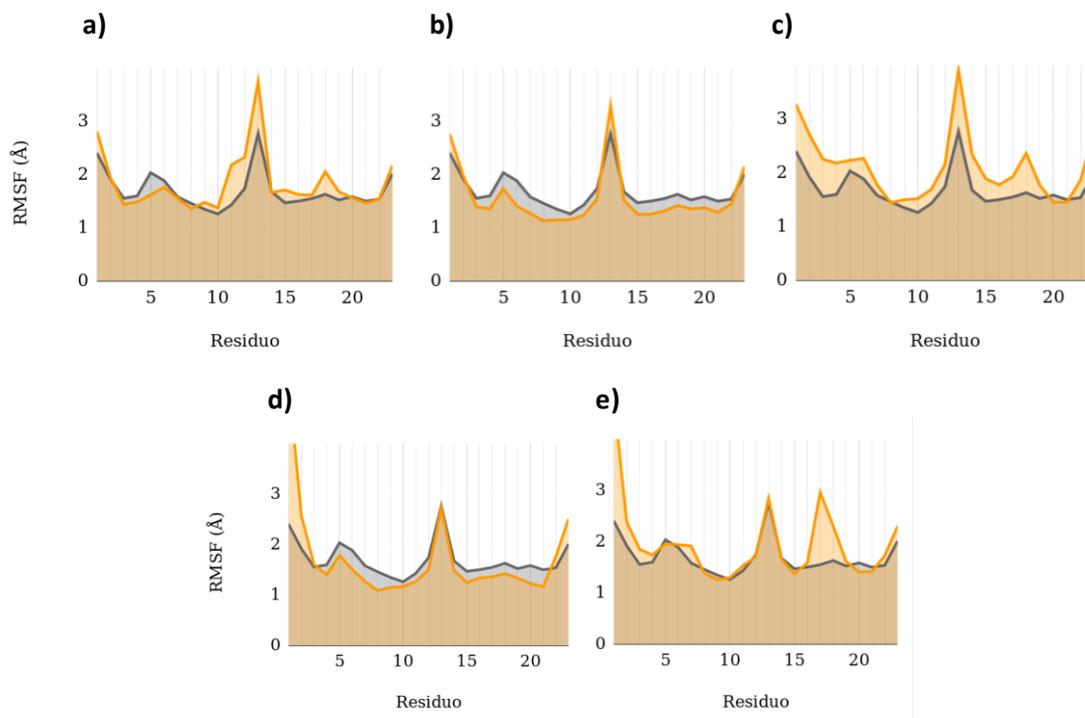
**Figura 15.** RMSD de los sistemas mutantes para la timina 13; (a) U, (b) 5CU, (c) 5HU, (d) PSU y (e) 1MP.



**Figura 16.** RMSF de los sistemas mutantes para la timina 11; (a) U, (b) 5CU, (c) 5HU, (d) PSU y (e) 1MP.



**Figura 17.** RMSF de los sistemas mutantes para la timina 12; (a) U, (b) 5CU, (c) 5HU, (d) PSU y (e) 1MP.



**Figura 18.** RMSF de los sistemas mutantes para la timina 13; (a) U, (b) 5CU, (c) 5HU, (d) PSU y (e) 1MP.

### 5.3. MM/GBSA: El primer filtro

Para determinar la eficiencia de unión de una mutante con respecto al nativo, se recomienda utilizar más de una técnica de análisis. De esta manera, debemos hacer uso de un conjunto de herramientas que se complementen entre sí para determinar las habilidades totales que tiene esta nueva estructura para interactuar con el receptor. Así que nuestro grupo de trabajo diseñó una metodología capaz de filtrar a los candidatos hasta encontrar a los más afines. La primera selección se hizo a través de un estudio donde se empleó un protocolo estándar de MM/GBSA que permite analizar de forma robusta el comportamiento de los diferentes componentes de la energía libre a lo largo de la segunda mitad de una dinámica molecular, ya que es conocido que los cálculos de energía libre de simulaciones de dinámica molecular pueden ser una herramienta poderosa en el proceso del diseño de medicamentos asistidos por computadora (Hansson, Oostenbrink and van Gunsteren, 2002).

**Tabla 2.** Energías libres y sus componentes calculados por MM/GBSA de los aptámeros con mutaciones puntuales.

Mutación	$\Delta E_{vdw}$ (Kcal/mol)	$\Delta E_{ele}$ (Kcal/mol)	$\Delta E_{gb}$ (Kcal/mol)	$\Delta E_{surf}$ (Kcal/mol)	$\Delta G_{gas}$ (Kcal/mol)	$\Delta G_{solv}$ (Kcal/mol)	$\Delta G_{unión}$ (Kcal/mol)	$\Delta(\Delta G_{unión})$ (Kcal/mol)	
Nativo	-23.61	-250.54	257.22	-3.01	-274.16	254.21	-19.95	0.00	
T11	U	-3.59	-165.72	166.06	-0.67	-169.31	165.38	-3.93	16.02
	5CU	-15.22	-386.14	387.56	-2.50	-401.36	385.06	-16.30	3.65
	5HU	-4.43	-169.82	172.37	-0.73	-174.26	171.63	-2.62	17.33
	PSU	-17.94	-336.17	335.54	-2.62	-354.12	332.92	-21.20	-1.25
	1MP	-22.54	-348.88	348.13	-3.31	-371.43	344.82	-26.61	-6.66
T12	U	-21.03	-381.36	376.18	-2.86	-402.40	373.32	-29.08	-9.10
	5CU	-2.35	-78.22	79.08	-0.56	-80.57	78.51	-2.06	17.89
	5HU	-19.01	-134.75	143.42	-2.31	-153.76	141.10	-12.66	17.29
	PSU	-26.63	-156.42	175.46	-3.28	-183.05	172.17	-10.88	9.07
	1MP	-31.58	-169.46	191.27	-3.74	-201.05	187.53	-13.58	6.43
T13	U	-21.7	-328.21	341.20	-2.85	-349.95	338.34	-11.61	8.34
	5CU	-25.04	-277.84	295.69	-3.31	-302.89	292.38	-10.51	9.44
	5HU	-28.00	-189.08	204.39	-3.38	-217.09	201.00	-16.09	3.86
	PSU	-19.10	-230.95	236.99	-2.55	-250.06	234.44	-15.61	4.33
	1MP	-24.90	-319.91	325.31	-3.37	-344.82	321.94	-22.88	7.71

Así, que las afinidades de unión del sistema nativo y de los sistemas mutados se calcularon utilizando los 2500 *frames* correspondientes a los últimos 50 ns de las trayectorias de dinámica molecular. Las energías libres calculadas ( $\Delta G_{unión}$ ) para los sistemas nativos y mutados se muestran en la Tabla 2. Tres de las conformaciones mutadas resultaron en energías libres inferiores con respecto al aptámero nativo: 11T>PSU, 11T>1MP y 12T>U con un  $\Delta(\Delta G_{unión})$  de -1.25, -6.66 y -9.10 (kcal/mol), respectivamente.

De los resultados en esta tabla se puede observar que cada mutación individual en la 13va timina del aptámero dio como resultado una energía libre de unión más alta que la del sistema nativo. Esto no

fue un resultado inesperado ya que estudios previos de Rhinehardt *et al.* (2015) habían demostrado que este residuo es el participante más activo durante el evento de unión. Por lo tanto, las mutaciones en este nucleótido disminuyeron su afinidad de unión con el epítipo al desestabilizar por completo las interacciones totales.

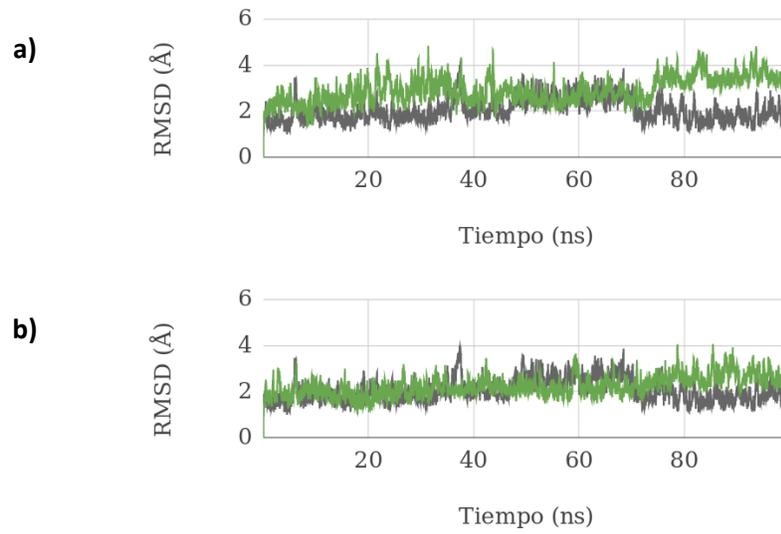
Del mismo modo, todos los aptámeros con las mutaciones 5CU y 5HU presentaron una menor afinidad de unión. En todos los casos, la energía de desolvatación fue protagonista al resultar en una mayor energía libre que la del sistema nativo.

#### 5.4. Dobles Mutantes

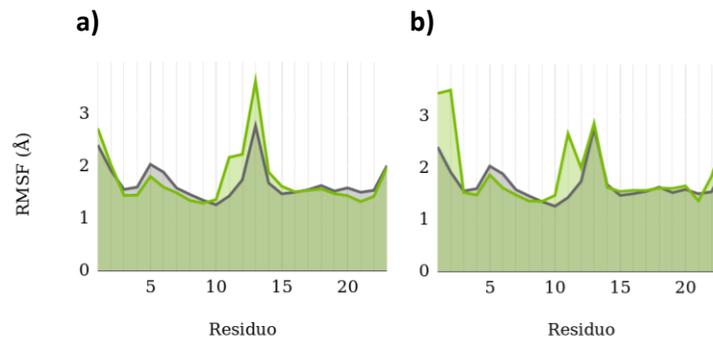
Combinando los tres candidatos elegidos por medio de los cálculos de MM/GBSA antes descritos, se construyeron dos aptámeros con doble mutación: 11T>PSU/12T>U y 11T>1MP/12T>U. Para estos sistemas también se llevaron a cabo cálculos de dinámica molecular de 100 ns, RMSD, RMSF y MM/GBSA utilizando los mismos protocolos anteriormente empleados.

Las gráficas de RMSD de ambos mutantes muestran que se alcanza el equilibrio, con respecto al nativo. También mostraron cambios conformacionales mínimos a lo largo de la dinámica (Figura 19). De igual forma, el comportamiento en la fluctuación de sus 23 residuos demuestra la estabilización de ambas estructuras (Figura 20). Finalmente, en los valores de energía libre calculados por MM/GBSA, presentados en la Tabla 3, se observa que de las dos dobles mutantes solamente el sistema 11T>PSU/12T>U resultó en una energía significativamente menor a la del nativo.

Para un análisis posterior, solo se presentan los resultados para los mutantes que presentaron una energía libre menor que la del sistema nativo: 11T>PSU, 11T>1MP, 12T>U y 11T>PSU/12T>U.



**Figura 19.** RMSD de los sistemas con dobles mutantes. (a) Sistema 11T>1MP/12T>U, (b) Sistema 11T>PSU/12T>U



**Figura 20.** RMSF de los sistemas con dobles mutantes. (a) Sistema 11T>1MP/12T>U, (b) Sistema 11T>PSU/12T>U.

**Tabla 3.** Energías libres y sus componentes calculados por MM/GBSA de los aptámeros con dobles mutaciones.

Mutación	$\Delta E_{vdw}$ (Kcal/mol)	$\Delta E_{ele}$ (Kcal/mol)	$\Delta E_{gb}$ (Kcal/mol)	$\Delta E_{surf}$ (Kcal/mol)	$\Delta G_{gas}$ (Kcal/mol)	$\Delta G_{solv}$ (Kcal/mol)	$\Delta G_{unión}$ (Kcal/mol)	$\Delta(\Delta G_{unión})$ (Kcal/mol)
Nativo	-23.61	-250.54	257.22	-3.01	-274.16	254.21	-19.95	0.00
<b>T11, T12</b> PSU, U	-25.88	-394.93	-394.93	-3.76	-420.82	386.64	-34.17	<b>-14.22</b>
<b>T11, T12</b> 1MP, U	-28.71	-139.74	161.60	-3.86	-168.46	157.73	-10.73	10.47

## 5.5. Identificando el evento de unión

"... creo que a medida que los métodos de la química estructural se aplican a problemas fisiológicos se encontrará que la importancia del enlace de hidrógeno para la fisiología es mayor que la de cualquier otra característica estructural única." -Linus Pauling, 1931

Para el propósito de nuestro estudio, es necesario descartar cualquier evento vinculante que no tenga lugar en la región de bucle del aptámero por dos razones principales: 1) en 2015, Rhinehardt *et al.* demostraron mediante simulaciones de dinámicas moleculares que el aptámero anti-MUC1 se une específicamente a la región del bucle del epítipo MUC-1 y 2) para que este aptámero sea utilizado como un nano-vehículo para terapias dirigidas contra el cáncer, debe estar covalentemente unido a un fármaco en los extremos 3' y/o 5'. La cantidad de enlaces de hidrógeno formados entre el aptámero anti-MUC1 y el epítipo MUC-1 juega un papel importante para identificar el evento de unión (Rhinehardt, Srinivas and Mohan, 2015).

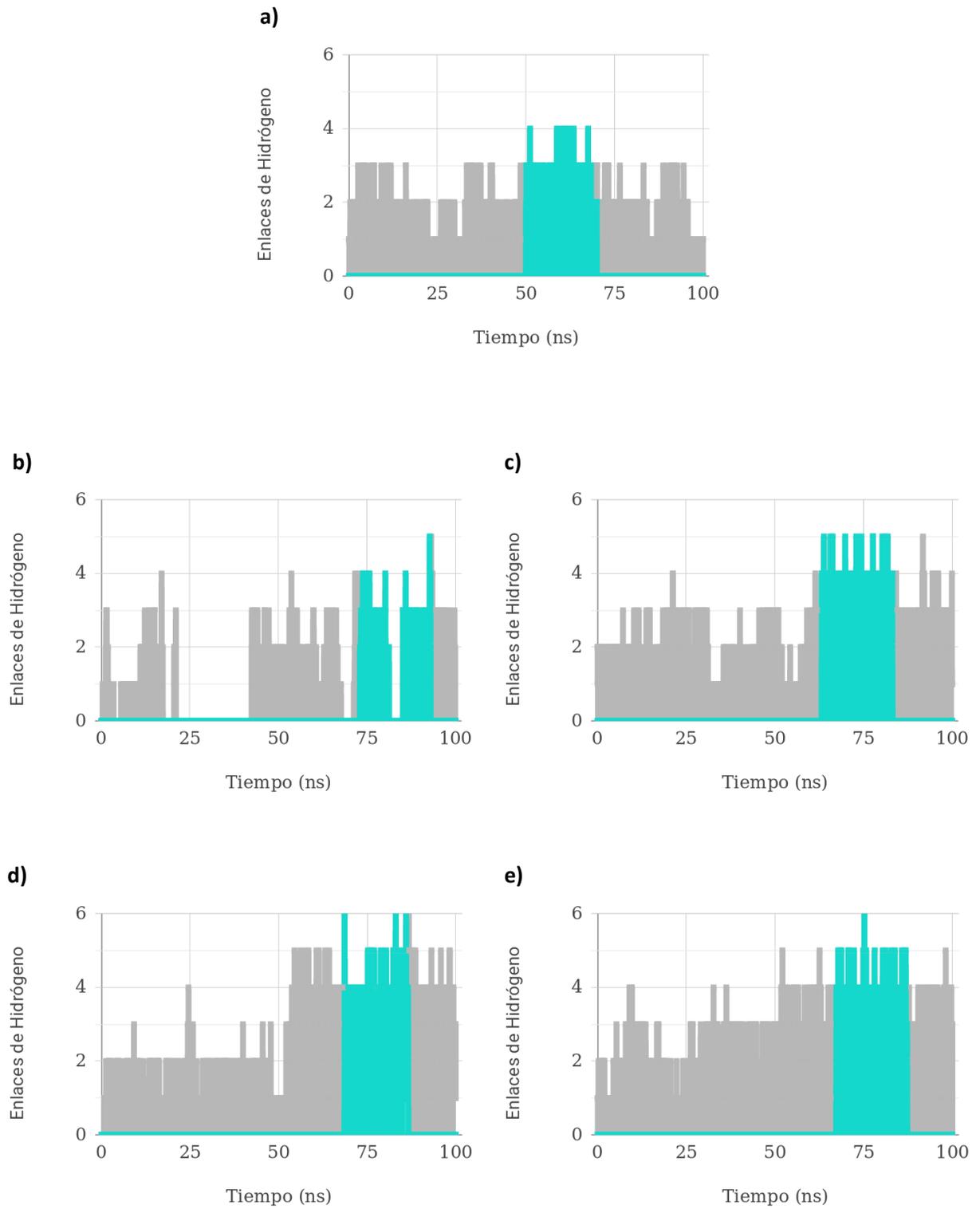
Para lograr nuestros objetivos de comparar las afinidades entre las moléculas durante los eventos adecuados, se cuantificó la cantidad de enlaces de hidrógeno formados entre el epítipo MUC-1 y solamente la región de bucle del aptámero a lo largo de las trayectorias de 100 ns. Para cada trayectoria de los candidatos, se eligió como nuestro "evento de unión" al intervalo de 20 ns con la mayor población

de enlaces de hidrógeno (Figura 21). En la Tabla 4 resume un análisis detallado de los enlaces de hidrógeno específicos recurrentes a lo largo de cada evento de unión.

Nuestros estudios evidenciaron que existe una relación directa entre la formación de enlaces de hidrógeno y la energía libre del sistema. De la Figura 22 se puede observar que la energía electrostática disminuye conforme los enlaces de hidrógeno aumentan. En el caso contrario, la energía de desolvatación incrementa junto con el aumento de enlaces de hidrógeno. Esto se debe a que es necesario desplazar a las moléculas de agua para que los complejos puedan formar enlaces de hidrógeno. En consecuencia, el total de la sumatoria de todos los componentes de la energía disminuirá si las interacciones son lo suficientemente grandes y estables como para remover a todas las moléculas de agua que se interponen en el sitio de unión. Este es el caso del nativo, donde la energía total disminuye según aumentan sus enlaces de hidrógeno (Figura 23).

## **5.6 Habilidades de unión: interacciones, energía libre y cambios estructurales**

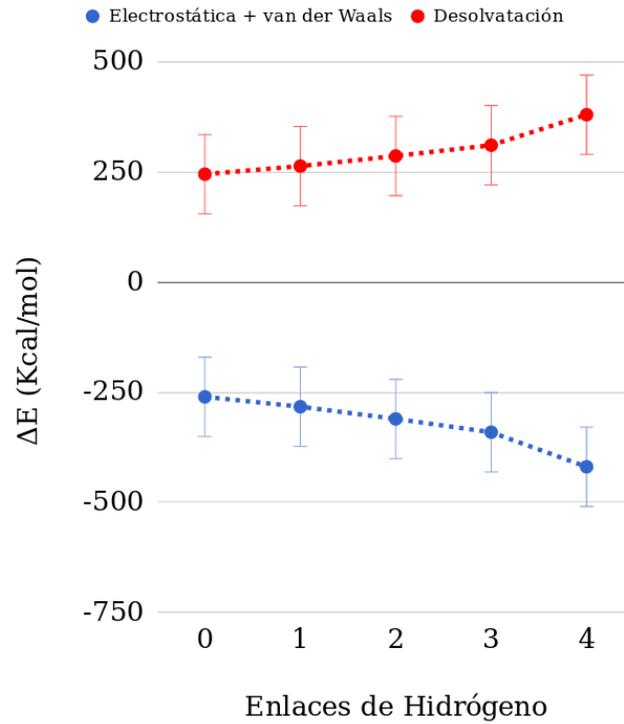
Las interacciones específicas a lo largo de los eventos de unión de los sistemas candidatos se evaluaron utilizando la interfaz de visualización VMD. Se seleccionaron 3 *frames* para el análisis: a 0, 10 y 20 ns (Figura 24). Además, para cada trayectoria de 20 ns se realizaron cálculos de distancia y de energías libres de unión. Los resultados se muestran en las Figura 25 y la Tabla 5, respectivamente. Finalmente, se analizaron los cambios estructurales expresados en las estructuras de los aptámeros a consecuencia de sus mutaciones (Figura 26).



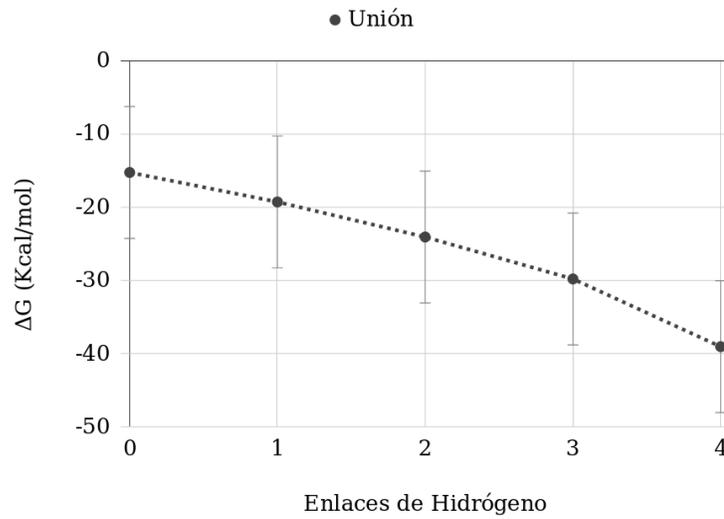
**Figura 21.** Monitoreo de enlaces de hidrógeno y selección del evento de unión para el sistema (a) nativo, (b) 11T>PSU, (c) 11T>1MP, (d) 12T>U y (e) 11T>PSU/12T>U.

**Tabla 4:** Descripción detallada de la formación de enlaces de hidrógeno durante los eventos de interacción.

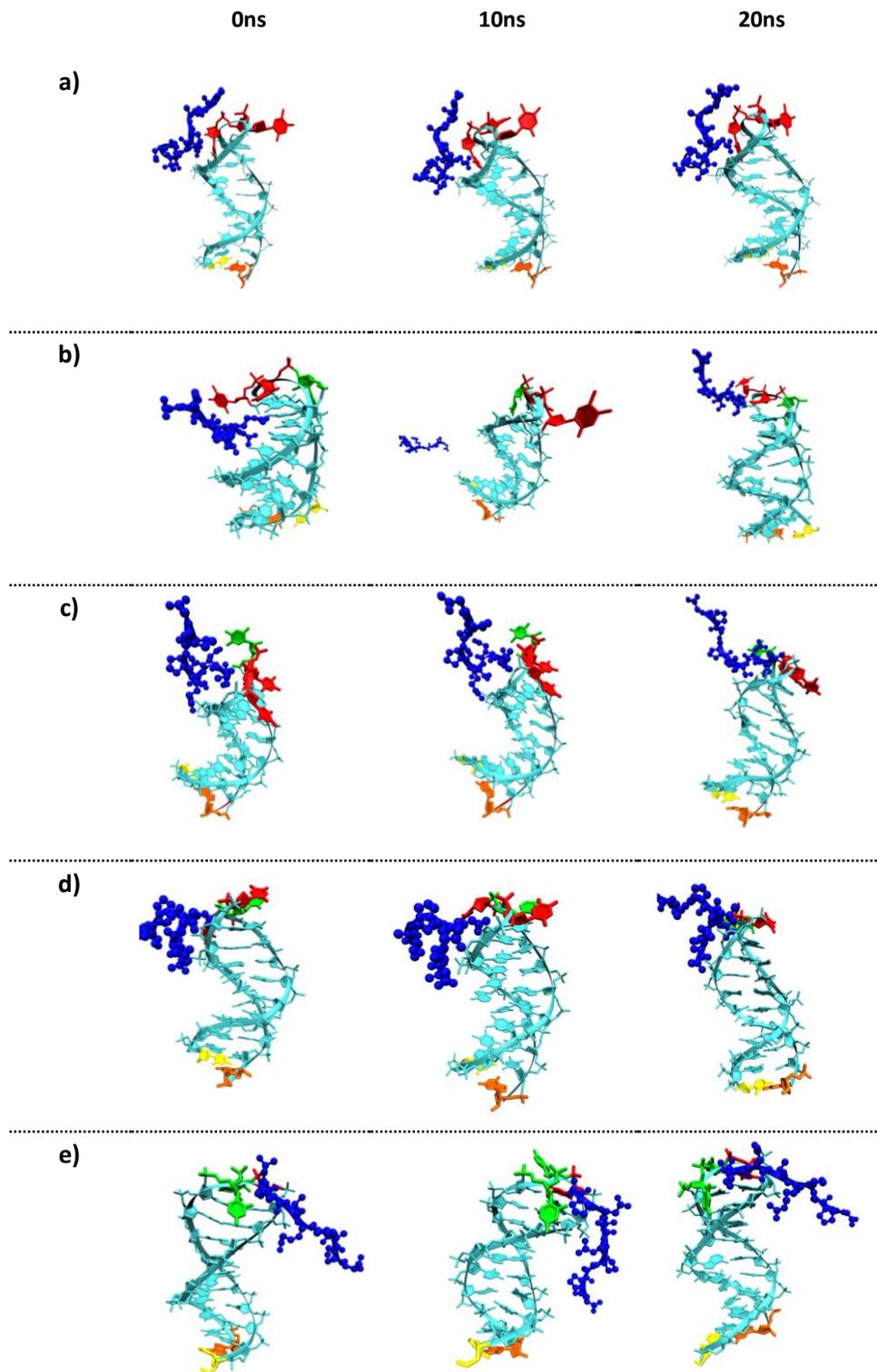
Sistema	Descripción de enlaces de hidrógeno
Nativo	Cadena lateral de la timina-11 con la cadena lateral de la arginina-5 Cadena lateral de la timina-11 con la cadena principal de la glicina-14 Cadena lateral de la timina-17 con la cadena principal de la alanina-1 Cadena lateral de la timina-17 con la cadena lateral de la arginina-5 Cadena lateral de la timina-17 con la cadena lateral de la treonina-4
11T>PSU	Cadena lateral de la timina-12 con cadena lateral de la arginina-5 Cadena lateral de la timina-13 con la cadena lateral arginina-5 Cadena lateral de la timina-13 con la cadena lateral de ácido aspártico-3 Cadena lateral de la timina-13 con la cadena principal del ácido aspártico-3 Cadena lateral de la glicina-14 con la cadena principal de la alanina-1 Cadena lateral de la glicina-14 con la cadena lateral de la arginina-5 Cadena lateral de la glicina-15 con la cadena lateral de la arginina 5
11T>1MP	Cadena lateral de la 1-metilpseudouridina-11 con la cadena lateral del ácido aspártico-3 Cadena lateral de la timina-13 con la cadena principal de la alanina-1 Cadena lateral de la glicina-14 con la cadena principal de la alanina-1 Cadena lateral de la glicina-15 con la cadena lateral de la arginina-5 Cadena lateral de la glicina-15 con la cadena lateral de la treonina-4 Cadena lateral de la adenina-16 con la cadena lateral de la arginina-5 Cadena lateral de la adenina-16 con la cadena lateral de la treonina-4
12T>U	Cadena lateral del uracilo-11 con la cadena principal de la alanina-1 Cadena lateral de la timina-12 con la cadena lateral de la arginina-5 Cadena lateral de la glicina-14 con la cadena lateral de la arginina-5 Cadena lateral de la glicina-15 con la cadena lateral de la arginina-5 Cadena lateral de la glicina-15 con la cadena principal del ácido aspártico-3 Cadena lateral de la glicina-15 con la cadena lateral de la treonina-4 Cadena lateral de la glicina-15 con la cadena principal de la treonina-4 Cadena lateral de la adenina-16 con la cadena principal de la alanina-1
11T>PSU/ 12T>U	Cadena lateral de la Pseudouridina-11 con la cadena lateral de la arginina-5 Cadena lateral de la pseudouridina-11 con la cadena principal de la glicina-9 Cadena lateral del uracilo-12 con la cadena lateral de la arginina-5 Cadena lateral del uracilo-12 con la cadena lateral de la treonina-4 Cadena lateral de la timina-13 con la cadena lateral de la arginina-15 Cadena lateral de la glicina-14 con la cadena lateral de la arginina-5 Cadena lateral de la glicina-15 con la cadena principal de la alanina-1



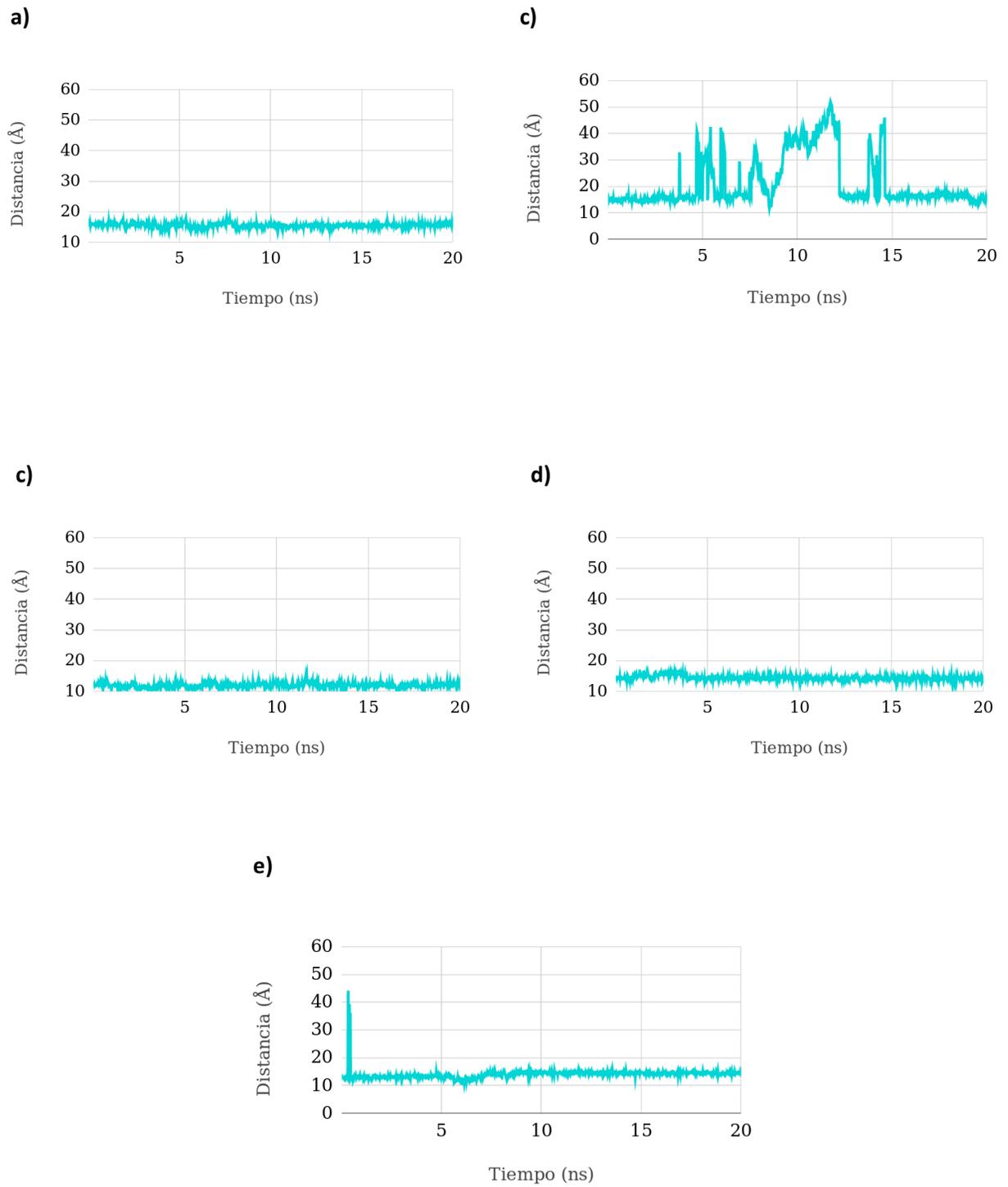
**Figura 22.** Relación entre los componentes de la energía libre y los enlaces de hidrógeno formados durante la dinámica molecular del sistema nativo. (Azul) Energía de desolvatación, (Rojo) Sumatoria de la energía electrostática y la energía de van der Waals.



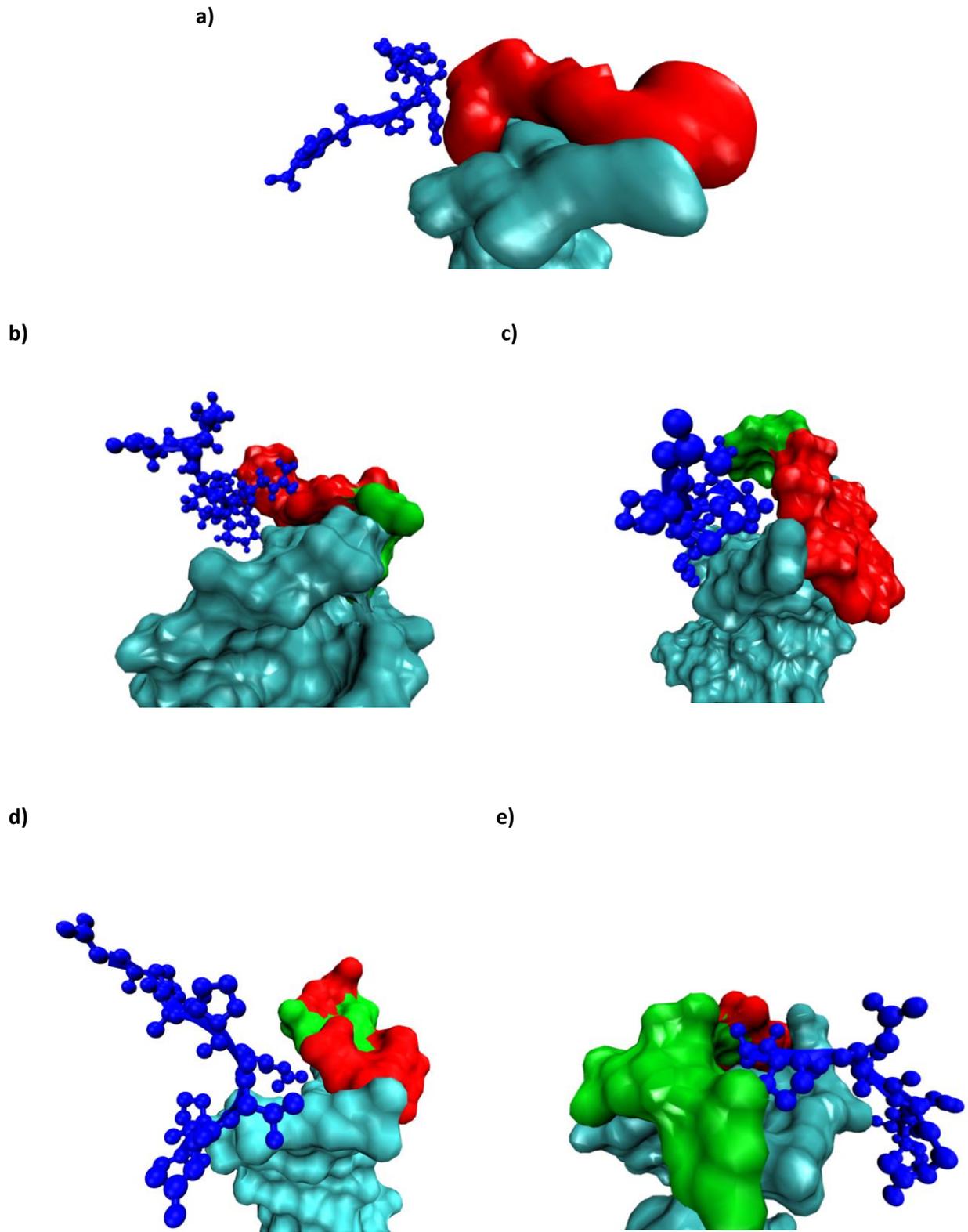
**Figura 23.** Relación entre la energía libre total y los enlaces de hidrógeno formados durante la dinámica molecular del sistema nativo.



**Figura 24:** Frames a 0, 10 y 20 ns del evento de unión del sistema (a) nativo, (b) 11T>PSU, (c) 11T>1MP, (d) 12T>U y (e) 11T>PSU/12T>U. Las mutaciones se resaltan en verde.



**Figura 25.** Gráfica de distancia entre el bucle del aptámero y la arginina 5 del epítipo a lo largo de los 20 ns del evento de unión para el sistema (a) nativo, (b) 11T>PSU, (c) 11T>1MP, (d) 12T>U y (e) 11T>PSU/12T>U.



**Figura 26.** (a) Zona de interacción del aptámero nativo y los surcos formados en la región del bucle de los aptámeros mutados: (b) 11T>PSU, (c) 11T>1MP, (d) 12T>U y (e) 11T>PSU/12T>U. Los nucleótidos mutados se destacan en verde.

**Tabla 5.** Energías libres y sus componentes calculados por MM/GBSA para cada evento de unión de las simulaciones de tipo nativo, 11T> PSU, 11T> 1MP, 12T> U y 11T> PSU/12T> U para el intervalo seleccionado de 20 ns.

Sistema	$\Delta E_{\text{vdw}}$ (Kcal/mol)	$\Delta E_{\text{ele}}$ (Kcal/mol)	$\Delta E_{\text{gb}}$ (Kcal/mol)	$\Delta E_{\text{surf}}$ (Kcal/mol)	$\Delta G_{\text{gas}}$ (Kcal/mol)	$\Delta G_{\text{solv}}$ (Kcal/mol)	$\Delta G_{\text{bind}}$ (Kcal/mol)	$\Delta(\Delta G_{\text{bind}})$ (Kcal/mol)
<b>Nativo</b>	-29.14	-354.28	355.48	-3.73	-383.43	351.75	-31.67	0.00
<b>11T&gt;PSU</b>	-13.30	-335.80	333.10	-2.30	-349.20	330.80	-18.40	13.27
<b>11T&gt;1MP</b>	-24.13	-428.18	418.70	-3.64	-452.31	415.06	-37.25	<b>-5.58</b>
<b>12T&gt;U</b>	-22.05	-396.31	388.73	-3.01	-418.35	385.72	-32.64	<b>-0.97</b>
<b>11T&gt;PSU/12T&gt;U</b>	-25.07	-398.94	392.15	-3.82	-424.01	388.34	-35.67	<b>-4.00</b>

### 5.6.1 Sistema nativo

A lo largo de los 20 ns del evento de unión seleccionado para el sistema nativo, el epítipo formó repetidamente un total de 5 enlaces de hidrógeno. De la Tabla 5, la contribución energética de las interacciones de van der Waals ( $\Delta E_{\text{vdw}}$ ) y electrostáticas ( $\Delta E_{\text{ele}}$ ) son de -29.14 y -354.28 kcal/mol, respectivamente, dando un  $\Delta G_{\text{gas}}$  total de -383.42 kcal/mol. Por otro lado, la energía de desolvatación ( $\Delta G_{\text{solv}}$ ) suma a 351.75 kcal/mol. La suma total da como resultado una energía libre de unión ( $\Delta G_{\text{unión}}$ ) de -31.67 kcal/mol. El  $\Delta G_{\text{unión}}$  del sistema nativo se tomó como referencia, por lo tanto, su  $\Delta(\Delta G_{\text{unión}})$  es de 0. En las Figuras 24 y 25 se puede observar que la interacción entre el aptámero nativo y el epítipo permaneció estable durante el evento de unión. Los resultados para este sistema se apegan a los resultados anteriormente reportados por Rhinehardt *et al.* (2015).

### 5.6.2 Sistema 11T>PSU

El aptámero mutado 11T>PSU formó dos enlaces de hidrógeno más que el sistema nativo. Para evidenciar el efecto de estas nuevas interacciones, se calculó la contribución de energía individual para las interacciones de van der Waals y Electrostáticas (-24.13 y -428.17 kcal/mol, respectivamente). Estos

valores de energía representan una mayor interacción que la encontrada en el sistema nativo. Sin embargo, el término de desolvatación tiene un valor mucho mayor de 415.05 kcal/mol, lo que resulta en un  $\Delta(\Delta G_{\text{unión}})$  positivo de 8.5 kcal/mol. Esto podría atribuirse a un cambio en la dinámica de desolvatación alrededor del epítipo, posiblemente asociado al cambio conformacional que no estaba presente en el aptámero nativo (Figura 26A y 26B). Encontramos la formación de un surco que favorece geoméricamente el sitio de interacción; sin embargo, las interacciones electrostáticas y de van der Waals juntas no fueron lo suficientemente fuertes como para desplazar a las moléculas de agua del sitio de unión. Además, las interacciones entre este mutante y el epítipo fueron muy inestables, las moléculas se separaron constantemente entre sí a lo largo del evento de unión de 20 ns (Figuras 24B y 25B). En general, el aptámero mutado 11T>PSU no presentó mejores capacidades de unión que el aptámero anti-MUC1 nativo.

### 5.6.3 Sistema 11T>1MP

El aptámero mutado 11T>1MP también formó dos enlaces de hidrógeno más que el sistema nativo. Estas interacciones tuvieron un efecto notorio en su energía libre total. En la Tabla 5 se muestra que los valores de energías de interacción de van der Waals y Electrostáticas son de -24.13 y -428.17 kcal/mol. Nuestras simulaciones mostraron que, si bien las interacciones de van der Waals disminuyeron, las interacciones electrostáticas aumentaron significativamente, dando como resultado un  $\Delta G_{\text{gas}}$  total de -452.31 kcal/mol. Las interacciones entre el aptámero y el epítipo se mantuvieron estables durante todo el evento de unión de 20 ns (Figura 24C y 25C). En la Figura 26C se muestra la formación de un surco en la zona de interacción, pero en este sistema, el  $\Delta G_{\text{gas}}$  total fue lo suficientemente fuerte como para desolvatar el sitio de unión, lo que dio como resultado un  $\Delta(\Delta G_{\text{unión}})$  de -5.57 kcal/mol. En general, el aptámero mutado 11T>1MP presentó mejores capacidades de unión que el aptámero anti-MUC1 nativo.

### 5.6.4 Sistema 12T>U

El mutante 12T>U aumentó en tres enlaces de hidrógeno con respecto al sistema nativo. En consecuencia, este sistema tiene interacciones electrostáticas significativamente mayores, con un  $\Delta G_{\text{gas}}$

total de -418.35 kcal/mol. La energía de desolvatación fue más alta que la del sistema nativo, pero aún dio como resultado un  $\Delta(\Delta G_{\text{unión}})$  favorable de -0.97 kcal/mol. Nuestros datos de distancia y el análisis de la trayectoria sugieren que esta mutante tuvo una fuerte interacción durante el evento de unión y también favoreció la formación de un surco en la zona de interacción del aptámero (Figura 26D), que en este caso, ayudó a aumentar el número de enlaces de hidrógeno. El aptámero mutado 12T>U mostró mejores capacidades de unión que el aptámero anti-MUC1 nativo.

### 5.6.5 Sistema 11T> PSU/12T>U

El epítipo MUC-1 y el mutante doble formaron dos enlaces de hidrógeno más que el sistema nativo, dando como resultado interacciones electrostáticas y de van der Waals más elevadas que sumaron un  $\Delta G_{\text{gas}}$  de -424.01 kcal/mol. El  $\Delta G_{\text{solv}}$  suma a un total de 388.35 kcal/mol, lo que llevó a un  $\Delta(\Delta G_{\text{unión}})$  global de -4.00 kcal/mol. El epítipo y el aptámero permanecieron unidos durante toda la trayectoria de 20 ns y se formó un surco muy estrecho en el bucle del aptámero que atrapó estructuralmente al epítipo durante el evento de unión (Figuras 24E, 25E y 26E). El aptámero mutado 11T>PSU/12T>U mostró mejores capacidades de unión que el aptámero anti-MUC1 nativo.

## Capítulo 6. Conclusiones

---

Las terapias dirigidas son actualmente el principal foco de atención en el desarrollo de fármacos contra el cáncer y entre las más prometedoras encontramos a las de nano-vehículos mediados por aptámeros. La capacidad del aptámero de llevar al fármaco directo a la célula cancerosa depende directamente de la afinidad que este tenga por su receptor. En este estudio se hizo uso de técnicas computacionales para mejorar, por medio de mutaciones, las interacciones entre el aptámero anti-MUC1 y el epítipo del receptor de cáncer Mucina 1.

Se construyeron y se simularon por dinámicas moleculares un total de 17 estructuras mutadas del aptámero anti-MUC1 para determinar sus capacidades de interactuar con el epítipo de la Mucina 1. El monitoreo de enlaces de hidrógeno y los cálculos de energía libre por MM/GBSA de los eventos de unión indicaron que tres de los aptámeros mutados, 11T>1MP, 12T>U y 11T>PSU/12T/U, tienen mejores capacidades de unión que el aptámero nativo.

Los tres mostraron una formación de surcos que favoreció estructuralmente la interacción del aptámero-epítipo, así como una mayor cantidad de enlaces de hidrógeno respecto al nativo, dos más para los mutantes 11T>1MP y 11T>PSU/12T/U y tres más para el mutante 12T>U. Además, presentaron interacciones electrostáticas más favorecidas y resultaron en una menor energía de libre de unión global, con un  $\Delta(\Delta G_{\text{bind}})$  de -5.58, -0.97 y -4.00 kcal/mol para 11T>1MP, 12T>U y 11T>PSU/12T/U, respectivamente.

En trabajos futuros, llevaremos a cabo estudios experimentales para elegir al aptámero, de entre los tres candidatos, con mayor afinidad por la Mucina 1 de células cancerosas. Esperamos que este estudio pueda proporcionar información útil para el desarrollo de fármacos terapéuticos contra el cáncer mediados por aptámeros mejorados.

## Literatura Citada

---

- Aitken, M. (2016) Global Oncology Trend Report, IMS Institute for Healthcare Informatics, (June). Available at: [www.theimsinstitute.org](http://www.theimsinstitute.org).
- Baouendi, M., Cognet, J. A. H., Ferreira, C. S. M., Missailidis, S., Coutant, J., Piotto, M., Hantz, E. and Hervé Du Penhoat, C. (2012) Solution structure of a truncated anti-MUC1 DNA aptamer determined by mesoscale modeling and NMR, *FEBS Journal*, 279(3), 479–490. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08440.x.
- Borbás, K. E., Ferreira, C. S. M., Perkins, A., Bruce, J. I. and Missailidis, S. (2007) Design and synthesis of mono- and multimeric targeted radiopharmaceuticals based on novel cyclen ligands coupled to anti-MUC1 aptamers for the diagnostic imaging and targeted radiotherapy of cancer, *Bioconjugate Chemistry*, 18(4), 1205–1212. doi: 10.1021/bc0700741.
- Brannon-Peppas, L. and Blanchette, J. O. (2012) Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 64(SUPPL.), 206–212. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.033.
- Burchell, J. and Taylor-Papadimitriou, J. (1993) Effect of modification of carbohydrate side chains on the reactivity of antibodies with core-protein epitopes of the MUC1 gene product, *Epithelial Cell Biol*, 2(4), 155–162.
- Cai, L., Chen, Z. Z., Chen, M. Y., Tang, H. W. and Pang, D. W. (2013) MUC-1 aptamer-conjugated dye-doped silica nanoparticles for MCF-7 cells detection, *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 34(2), 371–381. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.084.
- Cerchia, L. and de Franciscis, V. (2010) Targeting cancer cells with nucleic acid aptamers, *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 28(10), pp. 517–525. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.07.005.
- CFF (2017). Cancer Facts and Figures, *Cancer Facts and Figures*. doi: 10.1101/gad.1593107.
- Chang, M., Yang, C. and Huang, D. (2011) Supporting information Aptamer-Conjugated DNA Icosahedral Nanoparticles as a Carrier of Doxorubicin for cancer Therapy, (8), 1–10.
- Chari, R. V. J. (2008) Targeted cancer therapy: Conferring specificity to cytotoxic drugs, *Accounts of Chemical Research*, 41(1), pp. 98–107. doi: 10.1021/ar700108g.
- D.A. Case, R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. G., A.W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C., Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I., Omelyan, A. Onufriev, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C.L. Simmerling, W.M. Botello-Smith, J. S. and R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, L. X. and P. A. K. (2016) AMBER 16, University of California, San Francisco.
- Dixit, S. B., Ponomarev, S. Y. and Beveridge, D. L. (2006) Root Mean Square Deviation Probability Analysis of Molecular Dynamics Trajectories on DNA, *J. Chem. Inf. Model.*, 46, pp. 1084–1093. doi: 10.1021/ci0504925.

- Durrant, J. D. and McCammon, J. A. (2011) Molecular dynamics simulations and drug discovery, *BMC Biol*, 9, 71. doi: 1741-7007-9-71 [pii]\r10.1186/1741-7007-9-71.
- Ferreira, C. S. M., Cheung, M. C., Missailidis, S., Bisland, S. and Garipy, J. (2009) Phototoxic aptamers selectively enter and kill epithelial cancer cells, *Nucleic Acids Research*, 37(3),866–876. doi: 10.1093/nar/gkn967.
- Ferreira, C. S. M., Matthews, C. S. and Missailidis, S. (2006) DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: Design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers, *Tumor Biology*, 27(6), 289–301. doi: 10.1159/000096085.
- Genheden, S. and Ryde, U. (2015) Expert Opinion on Drug Discovery The MM / PBSA and MM / GBSA methods to estimate ligand-binding affinities The MM / PBSA and MM / GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*. Informa UK, Ltd., 10(5), doi: 10.1517/17460441.2015.1032936.
- Van Gunsteren, W. F., Dolenc, J. and Mark, A. E. (2008) Molecular simulation as an aid to experimentalists. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(2),149–153. doi: 10.1016/j.sbi.2007.12.007.
- Hansson, T., Oostenbrink, C. and van Gunsteren, W. F. (2002) Molecular dynamics simulations, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12,190. doi: 10.1016/S0959-440X(02)00308-1.
- Herschlag, D. and Pinney, M. (2018) Hydrogen bonds: Simple after all?, *Biochemistry*, p.acs.biochem.8b00217. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00217.
- Huang, M., Shen, A., Ding, J. and Geng, M. (2014) Molecularly targeted cancer therapy: Some lessons from the past decade, *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, 35(1), 41–50. doi: 10.1016/j.tips.2013.11.004.
- Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996) VMD: Visual molecular dynamics, *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- Jones, J. E. (1924) On the Determination of Molecular Fields. II. From the Equation of State of a Gas, *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 106(738), 463–477. doi: 10.1098/rspa.1924.0082.
- Keefe, A. D., Pai, S. and Ellington, A. (2010) Aptamers as therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*. Nature Publishing Group, 9(7), 537–550. doi: 10.1038/nrd3249.
- Kufe, D. W. (2009) Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature reviews. Cancer*. Nature Publishing Group, 9(12), 874–85. doi: 10.1038/nrc2761.
- Levitin, F., Stern, O., Weiss, M., Gil-Henn, C., Ziv, R., Prokocimer, Z., Smorodinsky, N. I., Rubinstein, D. B. and Wreschner, D. H. (2005) The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain, *Journal of Biological Chemistry*, 280(39),33374–33386. doi: 10.1074/jbc.M506047200.

- Levy-Nissenbaum, E., Radovic-Moreno, A. F., Wang, A. Z., Langer, R. and Farokhzad, O. C. (2008) Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery, *Trends in Biotechnology*, 26(8),442–449. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.04.006.
- Li, X., Zhang, W., Liu, L., Zhu, Z., Ouyang, G., An, Y., & Yang, C. J. (2014). In vitro selection of DNA aptamers for metastatic breast cancer cell recognition and tissue imaging. *Analytical chemistry*, 86(13), 6596-6603.
- Martínez-Sáez, N., Castro-López, J., Valero-González, J., Madariaga, D., Compañón, I., Somovilla, V. J., Salvadó, M., Asensio, J. L., Jiménez-Barbero, J., Avenzoza, A., Busto, J. H., Bernardes, G. J. L., Peregrina, J. M., Hurtado-Guerrero, R. and Corzana, F. (2015) Deciphering the Non-Equivalence of Serine and Threonine O-Glycosylation Points: Implications for Molecular Recognition of the Tn Antigen by an anti-MUC1 Antibody, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 54(34), 9830–4. doi: 10.1002/anie.201502813.
- Pichinuk, E., Benhar, I., Jacobi, O., Chalik, M., Weiss, L., Ziv, R., Sympson, C., Karwa, A., Smorodinsky, N. I., Rubinstein, D. B. and Wreschner, D. H. (2012) Antibody targeting of cell-bound MUC1 SEA domain kills tumor cells, *Cancer Research*, 72(13),3324–3336. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0067.
- Poolsup, S. and Kim, C.-Y. (2017) Therapeutic applications of synthetic nucleic acid aptamers, *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 48,180–186. doi: 10.1016/j.copbio.2017.05.004.
- Reshetnikov, R. V, Golovin, V and Kopylov, M. (2010). Comparison of models of thrombin-binding 15-mer DNA aptamer by molecular dynamics simulation. *Biochemistry. Biokhimiia*, 75(8), 1017–24. Doi: 10.1134/S0006297910080109.
- Rhinehardt, K. L., Srinivas, G. and Mohan, R. V. (2015) Molecular dynamics simulation analysis of anti-MUC1 aptamer and mucin 1 peptide binding, *Journal of Physical Chemistry B*, 119(22),6571–6583. doi: 10.1021/acs.jpcc.5b02483.
- Roe, D. R. and Cheatham III, T. E. (2013) PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data, *J Chem Theory Com*, 9(7), 3084–3095. doi: 10.1021/ct400341p.
- Savla, R., Taratula, O., Garbuzenko, O. and Minko, T. (2011) Tumor targeted quantum dot-mucin 1 aptamer-doxorubicin conjugate for imaging and treatment of cancer, *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., 153(1), 16–22. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.02.015.
- Sawyers, C. (2004) Targeted cancer therapy. *Nature*, 432(7015), 294–297. doi: 10.1038/nature03095.
- Shen, Y., Maupetit, J., Derreumaux, P. and Tufféry, P. (2014) Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(10),4745–4758. doi: 10.1021/ct500592m.
- Shibata, M. and Zielinski, T. J. (1992) Computer graphics presentations and analysis of hydrogen bonds from molecular dynamics simulation, *J Mol Graph*, 10(2),88–95.

- Stoltenburg, R., Reinemann, C. and Strehlitz, B. (2007) SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands, *Biomolecular Engineering*, 24(4),381–403. doi: 10.1016/j.bioeng.2007.06.001.
- Szostak, J. W. and Ellington, A. D. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 346,819–822.
- Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., Miles, D. W. and Dalziel, M. (1999) MUC1 and cancer, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1455(2–3), 301–313. doi: 10.1016/S0925-4439(99)00055-1.
- Thévenet, P., Shen, Y., Maupetit, J., Guyon, F., Derreumaux, P. and Tufféry, P. (2012) PEP-FOLD: An updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides, *Nucleic Acids Research*, 40(W1), 288–293. doi: 10.1093/nar/gks419.
- Toh, S. Y. i, Citartan, M., Gopinath, S. C. B. and Tang, T. H. (2015) Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay, *Biosensors & bioelectronics*. Elsevier, 64, 392–403. doi: 10.1016/j.bios.2014.09.026.
- Tuerk, C. and Gold, L. (1990) Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase, *Science*, 249, 505–510.
- Vidal-Limón, A. M., Tafoya, P., Santini, B. L., Contreras, O. E. and Aguila, S. A. (2017) Electron transfer pathways analysis of oxygen tolerant [NiFe]-hydrogenases for hydrogen production: A quantum mechanics/molecular mechanics – statistical coupled analysis, *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(32), 20494–20502. doi: 10.1016/j.ijhydene.2017.07.019.
- Wang, M. D., Shin, D. M., Simons, J. W. and Nie, S. (2007) Nanotechnology for targeted cancer therapy. *Expert review of anticancer therapy*, 7 (6), 833–837. doi: 10.1586/14737140.7.6.833.
- Westbrook, J., Feng, Z., Burkhardt, K. and Berman, H. M. (2003) Validation of Protein Structures for Protein Data Bank *Methods in Enzymology*, 374(1974), 370–385. doi: 10.1016/S0076-6879(03)74017-8.
- Yu, C., Hu, Y., Duan, J., Yuan, W., Wang, C., Xu, H. and Yang, X. Da (2011) Novel aptamer-nanoparticle bioconjugates enhances delivery of anticancer drug to MUC1-positive cancer cells in vitro. *PLoS ONE*, 6(9), 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0024077.
- Zhao, Q., Piyush, T., Chen, C., Hollingsworth, M. A., Hilkens, J., Rhodes, J. M., & Yu, L. G. (2014). MUC1 extracellular domain confers resistance of epithelial cancer cells to anoikis. *Cell death & disease*, 5(10), e1438.

## Apéndice A. Metodología

---

### A.1. Estructura inicial del epítotope MUC-1

Coordenadas en formato pdb del epítotope MUC-1 obtenidas con PEP-FOLD

```

MODEL Epitope MUC-1
ATOM 1 N ALA 1 32.73 24.9 28.02 1 0 N
ATOM 2 CA ALA 1 31.95 24.74 28.5 1 0 C
ATOM 3 CB ALA 1 31.28 23.66 29.58 1 0 C
ATOM 4 C ALA 1 30.56 26 28.93 1 0 C
ATOM 5 O ALA 1 29.34 25.87 28.92 1 0 O
ATOM 6 N PRO 2 31.16 27.06 29.52 1 0 N
ATOM 7 CA PRO 2 30.49 28.37 29.66 1 0 C
ATOM 8 CB PRO 2 31.5 29.24 30.41 1 0 C
ATOM 9 CG PRO 2 32.2 28.23 31.31 1 0 C
ATOM 10 CD PRO 2 32.33 26.99 30.42 1 0 C
ATOM 11 C PRO 2 30.11 28.95 28.29 1 0 C
ATOM 12 O PRO 2 28.97 28.72 27.89 1 0 O
ATOM 13 N ASP 3 31.17 28.03 27.49 1 0 N
ATOM 14 CA ASP 3 31.32 29.95 26.05 1 0 C
ATOM 15 CB ASP 3 32.78 28.99 25.7 1 0 C
ATOM 16 CG ASP 3 33.23 27.64 26.28 1 0 C
ATOM 17 OD1 ASP 3 33.68 27.63 27.46 1 0 O
ATOM 18 OD2 ASP 3 32.89 26.59 25.7 1 0 O
ATOM 19 C ASP 3 30.35 28.74 25 1 0 C
ATOM 20 O ASP 3 30.42 29.07 23.82 1 0 O
ATOM 21 N THR 4 29.66 27.67 25.39 1 0 N
ATOM 22 CA THR 4 28.65 26.97 24.56 1 0 C
ATOM 23 CB THR 4 29.15 25.61 24.04 1 0 C
ATOM 24 OG1 THR 4 29.46 24.71 25.12 1 0 O
ATOM 25 CG2 THR 4 30.33 25.77 23.08 1 0 C
ATOM 26 C THR 4 27.27 26.73 25.2 1 0 C
ATOM 27 O THR 4 26.4 26.09 24.6 1 0 O
ATOM 28 N ARG 5 27.07 27.2 26.43 1 0 N
ATOM 29 CA ARG 5 25.8 27.02 27.17 1 0 C
ATOM 30 CB ARG 5 26.07 26.39 28.54 1 0 C
ATOM 31 CG ARG 5 26.25 24.87 28.45 1 0 C
ATOM 32 CD ARG 5 26.37 24.27 29.85 1 0 C
ATOM 33 NE ARG 5 26.52 22.81 29.76 1 0 N
ATOM 34 CZ ARG 5 26.55 21.96 30.8 1 0 C
ATOM 35 NH1 ARG 5 26.4 22.98 32.06 1 0 N
ATOM 36 NH2 ARG 5 26.77 20.66 30.59 1 0 N
ATOM 37 C ARG 5 25.08 28.37 27.34 1 0 C
ATOM 38 O ARG 5 25.74 29.4 27.2 1 0 O
ATOM 39 N PRO 6 23.76 28.4 27.6 1 0 N
ATOM 40 CA PRO 6 23.03 29.66 27.9 1 0 C
ATOM 41 CB PRO 6 21.55 29.27 27.89 1 0 C
ATOM 42 CG PRO 6 21.56 27.78 28.21 1 0 C
ATOM 43 CD PRO 6 22.82 27.27 27.51 1 0 C
ATOM 44 C PRO 6 23.49 30.32 29.21 1 0 C
ATOM 45 O PRO 6 23.06 29.97 30.3 1 0 O
ATOM 46 N ALA 7 24.59 31.05 29.04 1 0 N
ATOM 47 CA ALA 7 25.29 31.89 30.03 1 0 C
ATOM 48 CB ALA 7 26.53 31.12 30.49 1 0 C
ATOM 49 C ALA 7 25.71 33.21 29.35 1 0 C
ATOM 50 O ALA 7 25.56 33.32 28.13 1 0 O
ATOM 51 N PRO 8 25.04 34.26 30.11 1 0 N
ATOM 52 CA PRO 8 26.62 35.49 29.53 1 0 C
ATOM 53 CB PRO 8 26.3 36.58 30.56 1 0 C
ATOM 54 CG PRO 8 26.28 35.82 31.89 1 0 C
ATOM 55 CD PRO 8 25.66 34.47 31.52 1 0 C
ATOM 56 C PRO 8 28.12 35.32 29.23 1 0 C
ATOM 57 O PRO 8 28.97 35.78 29.99 1 0 O
ATOM 58 N GLY 9 28.39 34.57 28.17 1 0 N
ATOM 59 CA GLY 9 29.73 34.25 27.67 1 0 C
ATOM 60 C GLY 9 29.57 33.15 26.61 1 0 C
ATOM 61 O1 GLY 9 28.55 32.43 26.69 1 0 O
ATOM 62 O2 GLY 9 30.43 33.1 25.71 1 0 O
TER
  
```

## A2. Preparación de los sistemas para dinámica molecular

*Script* para solvatar el sistema y generar los archivos de entrada para la dinámica molecular.

```
1 #Llamar a los campos de fuerza
2   source leaprc.DNA.OL15
3   source leaprc.RNA.YIL
4   source leaprc.modrna08
5   source leaprc.protein.ff14SB
6   source leaprc.water.tip3p
7   MOL = loadpdb pdb_entrada.pdb
8 #Solvatar
9   solvatebox MOL TIP3PBOX 15
10  charge MOL
11 #Neutralizar
12  addions MOL Na+ 0
13 #Guardar pdb
14  savepdb MOL pdb_salida.pdb
15 #Gardar los parametros
16  saveamberparm MOL parametros.prmtop parametros.inpcrd
17 quit
18 /
```

### A.3. Protocolo dinámica molecular

*Script* con los parámetros utilizados para llevar a cabo la minimización de energía potencial utilizando el programa Amber16.

```
1 System minimization:
2 &cntrl
3   imin=1,
4   ntmin=1,
5   nmropt=0,
6   drms=0.1
7   maxcyc=10000,
8   ncyc=5000,
9   ntx=1,
10  irest=0,
11  ntp=100,
12  ntwr=100,
13  iwrap=0,
14  ntf=1,
15  ntb=1,
16  cut=10.0,
17  nsnb=20,
18  igb=0,
19  ibelly=0,
20  ntr=0,
21 &end
22 /
```

*Script* con los parámetros utilizados para llevar a cabo el proceso de calentado utilizando el programa Amber16.

```
1 Heating System
2 &cntrl
3   imin=0,
4   nmropt=1,
5   ntx=1,
6   irest=0,
7   ntpr=500,
8   ntwr=500,
9   ntwx=500,
10  iwrap=1,
11  ntf=2,
12  ntb=1,
13  cut=10.0,
14  nsnb=20,
15  igb=0,
16  ibelly=0,
17  nstlim=250000,
18  nscm=500,
19  dt=0.002,
20  ntt=1,
21  temp0=0.0,
22  tempi=0.0,
23  tautp=0.5
24  ntc=2,
25 &end
26 &wt
27   type='TEMP0',
28   istep1=0,
29   istep2=250000,
30   value1=0.0,
31   value2=300,
32   &end
33 &wt
34 type='END'
35 &end
36 /
```

*Script* con los parámetros utilizados para llevar a cabo el proceso de equilibrado utilizando el programa Amber16.

```
1  equil NVT 5ns
2  &cntrl
3  imin=0,
4  ntp=10000,
5  ntwx=10000,
6  ntwr=10000,
7  iwrap=1,
8  ntx=5,
9  irest=1,
10 ntf= 2,
11 ntb=1,
12 ntc=2,
13 cut=10.0,
14 nstlim=2500000,
15 dt=0.002,
16 nscm=1000,
17 temp0=300.0,
18 ntt=3,
19 gamma_ln=2.0,
20 ig=-1,
21 ioutfm=1,
22 /
```

*Script* con los parámetros utilizados para llevar a cabo la fase de producción de dinámicamolecular utilizando el programa Amber16.

```
1  Production 300 ns
2  &cntrl
3  imin=0,
4  iwrap=1,
5  ntx=5,
6  irest=1,
7  nstlim=50000000,
8  dt=0.002,
9  ntf=2,
10 ntc=2,
11 temp0=300.0,
12 ntp=10000,
13 ntwx=10000,
14 cut=12.0,
15 ntb=2,
16 ntp=1,
17 ntt=3,
18 gamma_ln=2.0,
19 ig=-1,
```

## A.4. Análisis de las trayectorias

*Script* para centrar la trayectoria de la dinámica molecular utilizando el programa CPPTRAJ.

```

1  trajin archivo_de_trayectoria.nc
2  autoimage
3  trajout archivo_de_trayectoria_centrado.nc netcdf
4  /

```

*Script* con los parámetros utilizados para llevar a cabo el análisis de MM/GBSA utilizando AmberTools15.

```

1  Input file for running GB
2  &general
3  startframe=0,
4  endframe=5000,
5  keep_files=0,
6  strip_mask=":WAT:Na+",
7  ligand_mask=":10-32",
8  receptor_mask=":1-9"
9  &gb
10 i gb=5,
11 saltcon=0.150,
12 &decomp
13 idecomp=1,
14 print_res="1-32",
15 dec_verbose=1,
16 /

```

*Script* con los parámetros utilizados para llevar a cabo el análisis de RMSD, RMSF y distancia utilizando el programa CPPTRAJ.

```

1  trajin archivo_de_trayectoria.nc
2  parm archivo_de_parametros.prmtop
3  rms ToFirst :10-32 first out rmsd_out.dat mass
4  atomicfluct out rmsf_out.dat :10-32 byres
5  distance end-to-end :4 :21 out distancia_out.agr
6  /

```

*Script* con los parámetros utilizados para llevar a cabo el análisis de radio de giro utilizando el programa CPPTRAJ.

```
1  trajin archivo_de_trayectoria.nc
2  parm archivo_de_parametros.prmtop
3  reference ../coordenadas_de_referencia.pdb
4  radgyr R1 :10-32 out radgyr.out
5  avg R1 out average.dat
6  /
```