

CURSO 2023-2024

SIMULACIÓN TEÓRICA DE LA INTERACCIÓN DE FÁRMACOS CON ADN

TRABAJO DE FIN DE GRADO
Grado en Química

Autora: Olga Martín Vállez

Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Contenido

1.	ABSTRACT.....	2
2.	RESUMEN	2
3.	SIMBOLOGÍA Y ABREVIACIONES	3
4.	INTRODUCCIÓN	4
5.	OBJETIVOS	6
6.	PLAN DE TRABAJO.....	7
7.	MÉTODOS TEÓRICOS.....	8
7.1	Dinámica molecular	8
7.1.1	Ecuaciones de movimiento	8
7.1.2	Campos de fuerza.....	9
7.1.3	Condiciones de contorno periódicas	10
7.1.4	Termostatos y baróstatos.....	11
7.1.5	MM/GBSA.....	11
7.2	Teoría del funcional de la densidad	12
7.3	<i>Docking</i>	13
8.	RESULTADOS.....	14
8.1	Detalles computacionales.....	14
8.1.1	Teoría del funcional de la densidad	15
8.1.2	Dinámica molecular	15
8.1.3	<i>Docking</i>	16
8.2	Set up de la dinámica molecular	17
8.3	Energías de interacción del <i>docking</i>	18
8.4	Energías de interacción de la dinámica molecular.....	19
8.5	Descomposición por residuos de la energía de interacción	21
9.	CONCLUSIONES	24
10.	BIBLIOGRAFÍA	25

1. ABSTRACT

This thesis explores the interaction between two photosensitizers, tetraphenylethylene and porphyrin, with deoxyribonucleic acid strands through computational simulations, focusing on photodynamic therapy for cancer treatment. Using techniques such as molecular dynamics and docking, specific interactions between these photosensitizers and alternated adenine-thymine (*double strand*, ds-(AT)₈) and guanine-cytosine (ds-(GC)₈) sequences were modeled. The results showed that porphyrin has greater efficacy forming stable complexes with deoxyribonucleic acid, due to its flat structure that facilitates strong π - π interactions. In contrast, tetraphenylethylene, despite its potential for efficient generation of reactive oxygen species under aggregation conditions, showed less stability when interacting with deoxyribonucleic acid. This study highlights the importance of the molecular structure of photosensitizers in the effectiveness of photodynamic therapy, providing a solid foundation for future research in the design of more effective anticancer treatments.

2. RESUMEN

Este trabajo de fin de grado explora la interacción entre dos fotosensibilizadores, el tetrafeniletileno y la porfirina, con cadenas de ácido desoxirribonucleico mediante simulaciones computacionales, enfocado en la terapia fotodinámica para el tratamiento del cáncer. Utilizando técnicas como dinámica molecular clásica y *docking*, se modelaron interacciones específicas entre estos fotosensibilizadores y secuencias alternadas de adenina-timina (cadena *double strand*, ds-(AT)₈) y guanina-citosina (ds-(GC)₈). Los resultados demostraron que la porfirina presenta una mayor eficacia en la formación de complejos estables con el ácido desoxirribonucleico, debido a su estructura plana que facilita interacciones fuertes de tipo π - π . En contraste, el tetrafeniletileno, a pesar de su potencial en la generación eficiente de especies reactivas de oxígeno bajo condiciones de agregación, mostró menor estabilidad cuando interacciona con el ácido desoxirribonucleico. Este estudio subraya la relevancia de la estructura molecular de los fotosensibilizadores en la efectividad de la terapia fotodinámica, proporcionando una base sólida para futuras investigaciones en el diseño de tratamientos anticancerígenos más efectivos.

3. SIMBOLOGÍA Y ABREVIACIONES

SIMBOLOGÍA	
p_i	momento lineal del átomo i
t	tiempo
V	energía potencial
q_i	coordenadas del átomo i
T_i	energía cinética del átomo i
Δt	incremento del tiempo
m	masa
v_i	velocidad del átomo i
k_b	constante de fuerza del enlace
k_a	constante de fuerza del ángulo
d_0	distancia de equilibrio entre los átomos que interactúan
θ_0	ángulo de equilibrio entre los átomos que interactúan
d	distancia entre los átomos que interactúan
θ	ángulo entre los átomos que interactúan
k_t	barrera de energía entre mínimos de la curva del potencial de torsión
n	número de mínimos en el potencial de torsión
ω	ángulo diedro en el potencial de torsión

γ	ángulo que determina la posición del mínimo en el potencial de torsión
Q_i y Q_j	cargas de los átomos i y j
ϵ	constante de permitividad en el vacío
d_{ij}	distancia entre los átomos i y j
ϵ_{ij}	profundidad del potencial
σ_{ij}	distancia entre los átomos i y j cuando la energía potencial es nula en el potencial de Lennard-Jones
ρ	densidad electrónica
$\Psi_i(r)$	orbitales moleculares
$\Phi_\alpha(r)$	orbitales atómicos
c_α	coeficientes que acompañan a cada orbital atómico en la función de onda electrónica
c	valor total de la función de puntuación para una determinada conformación de moléculas
i y j	índices que representan pares de átomos en el sistema
x_i y x_j	tipos de los átomos i y j respectivamente
$f_{x_i x_j}$	función de interacción entre los átomos i y j

ABREVIACIONES	
PDT	<i>photodynamic therapy</i>
PS	<i>photosensitizer</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
AIE	<i>aggregation-induced emission</i>
TPE	tetrafeniletileno
ACQ	<i>aggregation caused quenching</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
ds	<i>double strand</i>
MD	<i>molecular dynamics</i>
MM/GBSA	<i>molecular mechanics generalized-Born surface area</i>
DFT	<i>density functional theory</i>
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
MM	<i>molecular mechanics</i>
GB	<i>generalized Born</i>
SA	<i>surface area</i>
NAB	<i>nucleic acid builder</i>
pmemd	<i>particle mesh Ewald molecular dynamics</i>
RMSD	<i>root mean squared deviation</i>

4. INTRODUCCIÓN

El cáncer se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células anómalas, capaces de invadir tejidos y propagarse a otras partes del cuerpo, proceso conocido como metástasis [1]. Tradicionalmente, se han empleado tratamientos como la quimioterapia y la radioterapia, pero actualmente se está investigando la terapia fotodinámica (*photodynamic therapy*, PDT, en inglés) como una alternativa antitumoral [2].

La PDT es un método basado en el uso de fotosensibilizadores (*photosensitizers*, PS, en inglés) combinados con luz, que los activa y desencadena reacciones que producen especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS, en inglés), las cuales son capaces de destruir células tumorales [1]. Su origen se remonta a las civilizaciones antiguas, como los egipcios, los indios o los chinos, que usaban la luz solar para tratar varias enfermedades como la psoriasis, el vitiligo o el cáncer de piel. A lo largo de los años se han hecho cada vez más descubrimientos acerca de la importancia de la exposición del cuerpo a la luz para fines de salud [2].

Durante la evolución de la PDT se han hecho grandes desarrollos sobre los PS que se han ido usando durante distintas etapas. Inicialmente, se emplearon PS tradicionales como la porfirina o derivados (hematoporfirina), que, aunque eran efectivos, presentaban limitaciones como baja eficiencia de generación de ROS en estados agregados y penetración tisular limitada [3]. Esto ha llevado a la exploración de alternativas más eficientes y versátiles como los PS basados en agregación-inducida por emisión (*aggregation-induced emission*, AIE, en inglés). Los PS basados en AIE, como el tetrafeniletieno (TPE), representan una innovación significativa, pues no sufren el efecto de extinción causado por la agregación (*aggregation caused quenching*, ACQ, en inglés), típico de los PS tradicionales. Estos compuestos presentan un aumento de la fluorescencia y la eficiencia de generación de ROS cuando están en estado agregado. Esto los hace especialmente útiles para aplicaciones donde los PS pueden agregarse, como en entornos tumorales [3].

Como se ha mencionado, los PS, activados por luz, pueden inducir la destrucción de células tumorales mediante reacciones químicas específicas. El mecanismo de este proceso, representado en la Figura 1, radica en la absorción de luz por el PS, que es excitado del estado singlete fundamental (S_0) a un estado singlete excitado (S_n), cuyo tiempo de vida es mínimo. Este estado singlete excitado puede experimentar un proceso no radiante denominado cruce intersistemas para dar un estado triplete excitado (T_n), más estable, a través de la conversión de espín del electrón en el orbital de mayor energía. Además, en este estado triplete excitado, existen tres tipos de reacciones que pueden tener lugar (Figura 1) [4]:

- Reacción tipo I: El estado excitado del PS reacciona directamente con un sustrato, como la membrana celular o una molécula, y experimenta reacciones de abstracción de átomos de hidrógeno o transferencia de electrones, generando radicales libres e iones radicales. Estos radicales reaccionan con el oxígeno molecular, produciendo ROS, que causan daño oxidativo que puede llevar a lesiones biológicas.
- Reacción de tipo II: La transferencia de energía desde el PS en estado triplete al oxígeno molecular que hay en el ambiente, forma oxígeno singlete (1O_2), altamente reactivo, que puede interactuar con numerosos sustratos biológicos, induciendo daño oxidativo y, en última instancia, la muerte celular.
- Reacción de tipo III: Esta reacción implica interacciones entre el PS en su estado triplete y radicales libres ya presentes, lo que lleva a efectos citotóxicos directos en las estructuras celulares sin la necesidad de oxígeno. Este tipo es menos común y puede ser útil en tejidos donde la concentración de oxígeno es anormalmente baja y las reacciones de tipo I y II son menos efectivas [5].

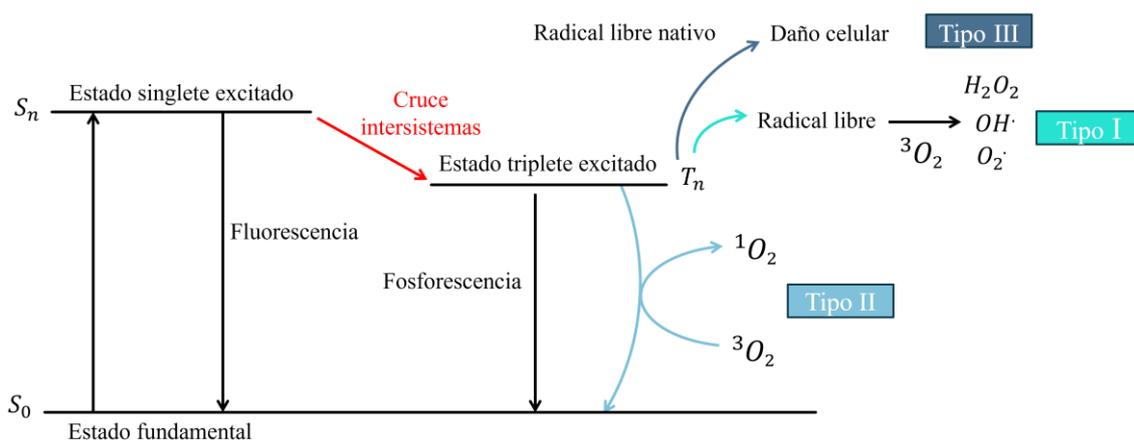


Figura 1. Diagrama esquemático de los tres tipos de mecanismos en la PDT.

El oxígeno juega un papel crucial en esta terapia, variando significativamente su concentración según la ubicación del tumor. En tumores que se encuentran en zonas profundas de la piel existe una falta de oxígeno, por tanto, puede ser un factor limitante para este tipo de tratamiento ya que no se producirían suficientes ROS. Este factor da pie a la investigación de posibles métodos para el aumento de oxígeno en estas zonas tumorales, por ejemplo, el uso de portadores de oxígeno, como la hemoglobina [1]. En términos generales, la PDT se considera una estrategia efectiva para complementar otros tratamientos contra el cáncer debido a su mecanismo único. Al combinarla con radioterapia o quimioterapia, los resultados suelen ser superiores a los obtenidos con cada tratamiento por separado [2].

En este trabajo de fin de grado se realizará modelización computacional de dos PS: el TPE, un PS basado en AIE; y la porfirina, un PS tradicional, cuyas estructuras se representan en la Figura 2A,B. Al introducir dichos fármacos en el corriente sanguíneo, estos entran en las células tumorales, y pueden generar interacciones con el ácido desoxirribonucleico (ADN) de estas células [3]. Además, se centrará en el estudio del tipo de interacciones que se generan entre los PS (ligandos) y las cadenas de ADN (receptores), calculando y caracterizando sus energías de interacción y comparándolas entre ellas.

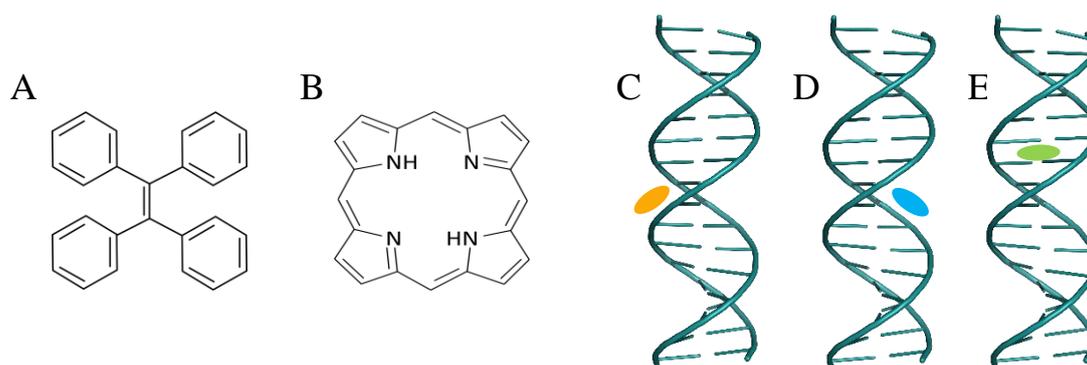


Figura 2. Estructuras (A) del TPE y (B) de la porfirina. Interacción del PS con el ADN en (C) el surco menor, (D) el surco mayor e (E) intercalada.

Cabe destacar que se utilizarán dos secuencias de ADN diferentes de doble hélice, cada una con 16 nucleobases por cada hélice: la primera será una secuencia de 8 pares de adeninas y timinas alternadas (cadena *double strand*, ds-(AT)₈); y la segunda será una secuencia de 8 pares de guaninas y citosinas alternadas (ds-(GC)₈). Se prepararán simulaciones combinando las dos cadenas de ADN con los dos PS, y para cada uno de estos cuatro sistemas, las tres posiciones de interacción (Figura 2C-E), dando un total de 12 sistemas.

5. OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es la modelización computacional de la interacción entre dos PS (TPE y porfirina) y dos cadenas de ADN (ds-(AT)₈ y ds-(GC)₈). Para alcanzar este objetivo general, se intentarán conseguir los siguientes objetivos específicos:

- Aprender a utilizar el sistema operativo Linux y sus comandos.
- Obtención de conocimientos acerca de técnicas computacionales clásicas y distintos paquetes de software mediante seminarios, tutorías y lectura bibliográfica.
- Simulación computacional de los 12 sistemas mencionados anteriormente mediante dinámica molecular (*molecular dynamics*, MD, en inglés) y *docking*.

- Cálculo y caracterización de las energías de interacción entre los dos fármacos y las secuencias de ADN mediante el método MM/GBSA (*molecular mechanics generalized-Born surface area*).

6. PLAN DE TRABAJO

Semanas 1-5: Búsqueda bibliográfica sobre la relevancia biológica del proyecto, la PDT, los PS y sobre los métodos computacionales empleados a lo largo del trabajo: teoría del funcional de la densidad (*density functional theory*, DFT, en inglés), MD y MM/GBSA.

Semanas 2 y 3: Aprendizaje de los comandos del sistema operativo Linux y uso de diferentes programas necesarios para la simulación y visualización de los sistemas. Principalmente: *AMBER* [6], para simulación de MD; *Visual Molecular Dynamics (VMD)* [7] y *PyMOL* [8] para visualización de moléculas; y *AutoDock Vina* [9] [10] para las simulaciones de *docking*.

Semanas 4-6: Construcción de la estructura de los PS con el programa *GaussView* [11] y su optimización geométrica mediante el programa *Gaussian* [12]. Una vez generados los sistemas, es necesario solvatarlos usando las herramientas de *AMBER* [6] y su posterior simulación mediante MD.

Durante estas primeras semanas, además, estuve compaginando el proyecto con unas clases y tutoriales grupales organizadas por el grupo de investigación donde nos explicaron la MD y Química Cuántica.

Semana 7: Realizar un análisis de *clustering* para obtener una geometría representativa de toda la trayectoria. Esta geometría se utilizará para la simulación de *docking*, y obtener las posiciones más estables de los ligandos en los distintos sitios de interacción con el ADN.

Semanas 7 y 8: A partir de las geometrías del *docking*, llevar a cabo simulaciones de MD en los distintos sitios de interacción ligando/ADN.

Semanas 9-12: Mediante el método MM/GBSA calcular las energías de interacción entre los PS y las nucleobases del ADN a partir de las dinámicas del punto anterior.

Semanas 13-15: Conclusión general del proyecto y redacción del trabajo de fin de grado.

Semana 16: Preparación de la presentación final.

7. MÉTODOS TEÓRICOS

7.1 Dinámica molecular

Se utiliza el método de MD clásica para las simulaciones, tanto de la cadena sola de ADN, como para la cadena con ligando incorporado. Estos sistemas, compuestos por miles de átomos, requieren tiempos de simulación largos, alcanzando varios cientos de nanosegundos, por tanto, debido a su complejidad y tamaño, el empleo de métodos cuánticos no resulta factible. Este tipo de simulaciones permiten una comprensión profunda de las propiedades de los sistemas moleculares ofreciendo una trayectoria detallada del sistema a lo largo del tiempo [13].

7.1.1 Ecuaciones de movimiento

Estas trayectorias se obtienen a través de la integración numérica de las ecuaciones de Newton, o alternativamente, utilizando las ecuaciones de movimiento de Hamilton (ecuaciones 1 y 2), que ofrecen una perspectiva más amplia, utilizando energía potencial y cinética para describir el estado del sistema [14]:

$$\frac{dp_i}{dt} = -\frac{dV}{dq_i} \quad (1)$$

$$\frac{dq_i}{dt} = \frac{dT_i}{dp_i} \quad (2)$$

en donde p_i representa el momento lineal del átomo i , t es el tiempo, V representa la energía potencial del sistema, q_i son las coordenadas del átomo i y T_i la energía cinética del átomo i [14].

Para la resolución de estas ecuaciones es necesario conocer la energía potencial, función que depende de las coordenadas del sistema. Dado que no conocemos las coordenadas de los átomos, las ecuaciones 1 y 2 no tienen solución exacta y las resolvemos numéricamente utilizando el algoritmo de Verlet [15], que permite calcular las posiciones de los átomos en cada paso temporal utilizando información sobre sus posiciones y velocidades anteriores.

$$q(t + \Delta t) = q_i(t) + \Delta t \cdot v_i(t) - \frac{\Delta t^2}{2m} \frac{dV(t)}{dq_i} \quad (3)$$

$$v(t + \Delta t) = v_i(t) - \frac{\Delta t}{2m} \left(\frac{dV(t + \Delta t)}{dq_i} + \frac{dV(t)}{dq_i} \right) \quad (4)$$

Siendo Δt el incremento del tiempo, m es la masa de la partícula y v_i la velocidad del átomo i . Las soluciones a las ecuaciones 3 y 4 requieren el cálculo computacional del gradiente de la energía

potencial $\left(\frac{dV(t)}{dq}\right)$. En la MD clásica se utilizan campos de fuerza (*force fields*, en inglés) para definir este gradiente de la energía potencial.

7.1.2 Campos de fuerza

Los campos de fuerza son modelos matemáticos que describen las interacciones entre partículas en un sistema. Incluyen términos para modelar interacciones tanto enlazantes (por ejemplo, distancias de enlaces, ángulos y diedros) como no enlazantes (por ejemplo, interacciones electrostáticas y de van der Waals) [13]. La elección del campo de fuerza adecuado es crucial para obtener resultados precisos y relevantes. En la ecuación 5 se recoge el potencial global del sistema:

$$V_{total} = \sum_{i=1}^{N_{enlace}} V_{enlace} + \sum_{i=1}^{N_{ángulo}} V_{ángulo} + \sum_{i=1}^{N_{diedro}} V_{diedro} + \sum_{i=1}^{N_{no\ enlazantes}} V_{no\ enlazantes} \quad (5)$$

Dentro de las interacciones enlazantes, las interacciones entre átomos separados por uno o dos enlaces (interacciones angulares) se pueden describir mediante potenciales armónicos. En cambio, las interacciones de diedro, o de torsión, se describen por potenciales de Fourier. Por otro lado, las interacciones no enlazantes se dividen en tres componentes: las interacciones de Coulomb, las interacciones de van der Waals y las interacciones de repulsión. Tanto las interacciones de van der Waals como las de repulsión están modeladas por el potencial de Lennard-Jones, por tanto, si se reescribe la ecuación 5 se obtiene la siguiente ecuación:

$$V_{total} = \sum_{i=1}^{N_{enlace}} \frac{1}{2} k_b (d - d_0)^2 + \sum_{i=1}^{N_{ángulo}} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{i=1}^{N_{diedro}} k_t (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \quad (6)$$

$$+ \sum_{i>j}^{N_{no\ enlazantes}} \frac{Q_i Q_j}{4\pi\epsilon d_{ij}} + 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{d_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{d_{ij}}\right)^6 \right]$$

donde, en los dos primeros términos de la ecuación 6, tanto k_b como k_a son constantes de fuerza del enlace y del ángulo respectivamente; d_0 y θ_0 son la distancia y el ángulo de equilibrio entre los átomos que interactúan; d y θ son la distancia y el ángulo entre estos. En el tercer término, k_t es la barrera de energía entre mínimos de la curva del potencial; n es el número de mínimos; ω es ángulo diedro; γ ángulo que determina la posición del mínimo. Por último, en el término que define las interacciones no enlazantes, Q_i y Q_j representan las cargas de los átomos i y j ; ϵ es la constante de permitividad en el vacío; d_{ij} es la distancia entre los átomos i y j , ϵ_{ij} es la profundidad del potencial y σ_{ij} es la distancia entre los átomos i y j cuando la energía potencial es nula en el potencial de Lennard-Jones.

Por otra parte, los términos que dependen de las cargas (en este caso el potencial de Coulomb) es uno de los más importantes y necesarios de calcular ya que, este término engloba alrededor del 90% de la energía de interacción, por tanto, las cargas atómicas serán los parámetros principales que se obtienen mediante el método DFT que se explicará en el apartado 7.2.

7.1.3 Condiciones de contorno periódicas

Para simular propiedades de materiales en el límite termodinámico, se utilizan condiciones de contorno periódicas (*periodic boundary conditions*, en inglés). Estas se refieren a cómo se modela el entorno fuera de la región inmediata de interés en una simulación de MD y son esenciales para representar sistemas infinitos dentro de un espacio computacional finito. Además, son las más utilizadas, replicando la caja de simulación en todas direcciones para simular un sistema infinito, lo que asegura que las moléculas que salen de una caja entran por el lado opuesto, manteniendo el número de átomos constante (conservación de materia) y eliminando los efectos de borde [14]. Para poder definir las interacciones no enlazantes se aplica un radio límite denominado *cutoff*, por debajo del cual se van a calcular las fuerzas como la de Coulomb, van der Waals o de repulsión.

Volviendo a la ecuación 6, se puede deducir que la interacción del potencial de Coulomb decae de forma r_{ij}^{-1} , en cambio, las fuerzas de van der Waals decaen de forma r_{ij}^{-6} , como se representa en la Figura 3. Esto significa que, las fuerzas de van der Waals se aproximan a cero muy rápido y, por otro lado, las interacciones de Coulomb disminuyen muy lentamente con la distancia generando una discontinuidad en la energía potencial al aplicar el *cutoff*.

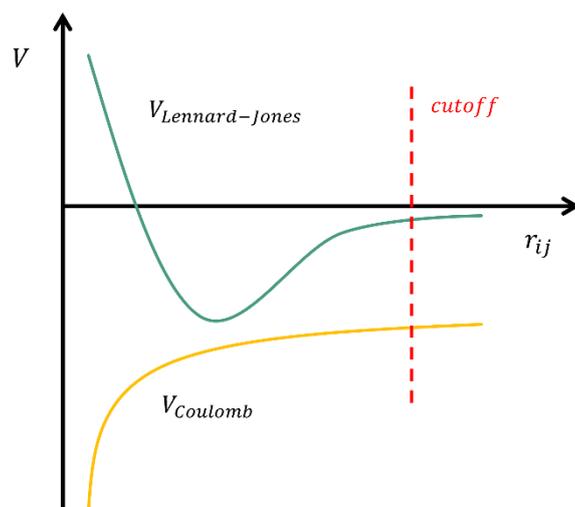


Figura 3. Funciones del potencial electrostático y de van der Waals.

Para evitar esta discontinuidad se utiliza el método de Ewald, que consiste en aplicar de manera artificial densidades de carga alrededor de las cargas del sistema. Estas densidades son de carga opuesta

a los iones que rodea para apantallar las interacciones modificando las de largo alcance para convertirlas en corto alcance, de manera que ya no habría problema con el *cutoff*.

7.1.4 Termostatos y baróstatos

Uno de los objetivos de la MD es mantener una temperatura constante durante la simulación. Para ello, se utilizan termostatos, que ajustan las ecuaciones de movimiento de Newton mediante variaciones del momento lineal (o velocidades) para mantener la energía térmica del sistema, esencial para replicar condiciones experimentales de laboratorio [7]. Existen distintos tipos de termostatos: de rescalado de velocidad, de Berendsen o el de Andersen, y se diferencian en la forma en la que varían el momento.

Por otro lado, es necesario controlar la presión del sistema para simular condiciones de presión constantes utilizando baróstatos. Estos ajustan el volumen del sistema para mantener la presión deseada, crucial para imitar condiciones experimentales. Existen distintos tipos de baróstatos, siendo uno de los más utilizados el baróstato de Berendsen [7].

7.1.5 MM/GBSA

Después de hacer las simulaciones de MD de los sistemas (PS con ADN), se calcula la energía libre de interacción usando el método MM/GBSA. Este combina la mecánica molecular (*molecular mechanics*, MM, en inglés) con modelos de solvatación, específicamente el modelo de Born generalizado (*generalized Born*, GB, en inglés) y el cálculo del área superficial (*surface area*, SA, en inglés) para estimar la energía libre de interacción entre ligandos y receptores [16]. El funcionamiento de este método consiste en seleccionar geometrías de la MD y calcular sus energías libres. Posteriormente se realiza un promedio de todas estas geometrías obteniendo la energía libre de interacción del sistema, tal y como se indica en la ecuación 7:

$$\Delta G = \langle E_{gas} + E_{solvatación} \rangle \quad (7)$$

La energía libre de interacción (ΔG) se calcula como el sumatorio de las energías de interacción del sistema en fase gas (E_{gas}) y las energías de solvatación ($E_{solvatación}$). La primera se obtiene a partir del campo de fuerzas, en particular, a partir de las energías de Coulomb (E_C) y las energías de van der Waals (E_{LJ}). Para la segunda, este método asume que tiene dos contribuciones: la contribución polar (E_{polar}), que describe la interacción electroestática entre el soluto y el disolvente y se calcula con el modelo GB; y la contribución no polar ($E_{no\ polar}$), que describe la energía que hay que aplicar para hacer una cavidad en el disolvente y meter el soluto. Esta última se calcula con el término SA, una

ecuación empírica que depende del área superficial del soluto [9]. Reescribiendo la ecuación 7 se obtiene la siguiente:

$$\Delta G = \langle E_C + E_{LJ} + E_{polar} + E_{no\ polar} \rangle \quad (8)$$

Cada una de las energías en la ecuación 8 se calculan restando, a la energía del complejo (ligando/ADN), la energía del ligando solo junto con la energía del ADN solo, como se indica en la ecuación 9:

$$E = E_{complejo} - (E_{ligando} + E_{ADN}) \quad (9)$$

7.2 Teoría del funcional de la densidad

El método DFT es necesario tanto para optimizar las estructuras de porfirina y TPE, como para calcular las cargas de ambos ligandos. Esta teoría se centra en el concepto de que la energía electrónica de un sistema puede ser expresada directamente como un funcional de la densidad electrónica $\rho(x,y,z)$, una función de 3 variables, en lugar de depender de la función de onda de los electrones [17]. Esta perspectiva se basa en los teoremas de Hohenberg y Kohn, que demuestran que la densidad electrónica contiene toda la información necesaria para determinar completamente las propiedades electrónicas del sistema [18]. Este enfoque simplifica los cálculos reduciendo, en un primer momento, el problema multidimensional de la función de onda a un problema tridimensional de densidad. Sin embargo, la formulación DFT aplicada a sistemas moleculares, en donde la densidad se calcula a partir de los orbitales moleculares, sigue siendo un problema multidimensional.

El desarrollo del modelo DFT se centra en expresar todos los componentes de la energía como funcionales de la densidad electrónica, dividiendo a la energía en tres contribuciones: la energía cinética de los electrones ($T_e(\rho)$), la repulsión electrónica ($V_{ee}(\rho)$) y la atracción entre los núcleos y los electrones ($V_{Ne}(\rho)$), siendo la energía de repulsión internuclear ($V_{NN}(\rho)$) una constante y la energía cinética nuclear nula dentro del marco de la aproximación de Born-Oppenheimer (ecuación 10) [17].

$$E_e(\rho) = T_e(\rho) + V_{ee}(\rho) + V_{Ne}(\rho) + V_{NN}(\rho)(cte) \quad (10)$$

La densidad electrónica también determina de manera unívoca el potencial externo al que están sometidos los electrones, que representa generalmente la energía de interacción entre los electrones y los núcleos, quedando una energía electrónica expresada de la siguiente manera:

$$E_e(\rho) = T_e(\rho) + E_{ee}(\rho) + E_{ext}(\rho) \quad (11)$$

Es necesario calcular la densidad que dará la energía más baja mediante el teorema variacional. Sin embargo, existe un problema ya que la relación entre $T_e(\rho)$ y la densidad electrónica no se conoce y, por tanto, no se puede obtener la energía de forma exacta. La aproximación para resolver este problema se logra a través de la propuesta de Kohn y Sham, que sugiere crear un sistema de referencia donde los electrones no interactúan, es decir, se crea un sistema en el cual $E_{ee}(\rho) = 0$ (ecuación 12) [18] [17].

$$\text{sistema de referencia} \rightarrow E_{e,r}(\rho) = T_{e,r}(\rho) + E_{ext,r}(\rho) \quad (12)$$

Además, la diferencia entre el sistema real y sistema de referencia (ecuación 13) es lo que se denomina energía de correlación e intercambio (E_{xc}) y se calcula mediante funcionales parametrizados para poder reproducir esta diferencia (B3LYP, BLYP, PBE...).

$$E_{xc}(\rho) = E_e(\rho) - E_{e,r}(\rho) \quad (13)$$

Para construir la densidad electrónica total del sistema es necesario conocer los orbitales moleculares, que a su vez se calculan mediante la combinación lineal de orbitales atómicos:

$$\rho = |\Psi_i(r)|^2 = \left| \sum_{\alpha} c_{\alpha} \Phi_{\alpha}(r) \right|^2 \quad (14)$$

donde ρ es la densidad eléctrica, $\Psi_i(r)$ son los orbitales moleculares, las funciones $\Phi_{\alpha}(r)$ representan a los orbitales atómicos y c_{α} son los coeficientes que acompañan a cada orbital atómico.

El general, el objetivo principal del método DFT es encontrar los coeficientes que darán los orbitales moleculares que, a su vez, darán la densidad que minimiza la energía, con una precisión razonable y un coste computacional manejable.

7.3 Docking

Una vez equilibradas las cadenas de ADN se utiliza el método de *docking* para calcular la energía de interacción del PS con la cadena de ADN en distintos sitios de interacción. El *docking* es un método computacional utilizado para predecir la unión no covalente entre macromoléculas (receptor) y una pequeña molécula (ligando). Generalmente se asume que el receptor es rígido y que las longitudes covalentes y ángulos no cambian, aunque se permite la rotación en ciertos enlaces covalentes activos [19] [10]. El objetivo de este método consiste en mover de forma aleatoria el ligando alrededor del receptor (Figura 4) de manera que determina la energía libre de unión en cada una de las posiciones y, por tanto, puede determinar el sitio de interacción más favorable mediante la resolución de la función de puntuación (*scoring function*, en inglés) (ecuación 15) [10].

$$c = \sum_{i < j} f_{x_i x_j}(d_{ij}) \quad (15)$$

La ecuación 15 es esencial para evaluar cómo de bien se ajusta un ligando al sitio activo de una macromolécula. En esta ecuación, c es el valor total de la *scoring function* para una determinada pose entre el ligando y el receptor, i y j son índices que representan pares de átomos en el sistema, x_i y x_j son los tipos de los átomos i y j respectivamente, $f_{x_i x_j}$ es una función de interacción entre los átomos i y j [10]. Las interacciones específicas que contribuyen a la *scoring function* incluyen términos estéricos, hidrofóbicos y de puente de hidrógeno, diseñados para calcular de manera efectiva la energía libre de unión, que es un indicador crucial de la afinidad entre el receptor y el ligando en el proceso de *docking*.

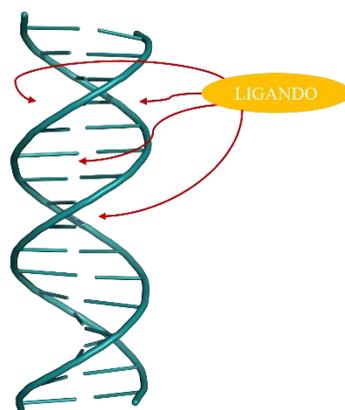


Figura 4. Movimiento aleatorio del *docking* para encontrar las posiciones de unión ligando/ADN.

8. RESULTADOS

8.1 Detalles computacionales

En este trabajo de fin de grado se utiliza el método DFT para la optimización y el cálculo de cargas de los PS. También se hace uso del método MD para equilibrar los sistemas, inicialmente de la cadena de ADN sola y posteriormente, de la cadena con el ligando en posición intercalada para generar el *pocket*. Después, con los sistemas equilibrados con MD, se utilizará la geometría representativa que se obtiene con el *clustering* y se hará *docking* para encontrar las posiciones: intercalada, surco menor y surco mayor. Como último paso, se volverá a equilibrar el sistema mediante MD y se realizará MM/GBSA para calcular las energías de interacción del ligando con el ADN.

8.1.1 Teoría del funcional de la densidad

Se comienza el proyecto construyendo tanto la molécula de porfirina como el TPE con ayuda del programa *GaussView* [11] y optimizando su geometría mediante el método DFT con el programa *Gaussian* [12]. Una vez las geometrías han sido optimizadas, se calculan las cargas electrostáticas de las moléculas al mismo nivel de teoría. Se ha utilizado el funcional B3LYP [20] para definir la energía de correlación e intercambio (E_{xc}) que dará pie al cálculo de la densidad necesaria para obtener la mínima energía de los sistemas. Los orbitales atómicos se describen con la base 6-31G*. Las cargas son necesarias para llevar a cabo posteriormente las simulaciones de MD, ya que se utilizarán en el campo de fuerzas para el cálculo de la energía de interacción de Coulomb entre los PS y las cadenas de ADN.

8.1.2 Dinámica molecular

Una vez construidos y optimizados los PS, se construyen dos sistemas con las distintas cadenas de ADN (ds-(AT)₈ y ds-(GC)₈), utilizando el módulo de *AMBER NAB (nucleic acid builder)* [6]. Además, es necesario solvatar el sistema y neutralizarlo con iones de Na⁺ utilizando el módulo de *AMBER tleap* [6], ya que queremos realizar las simulaciones en condiciones similares a las fisiológicas. Una vez solvatados los dos sistemas de ADN, se realizan las simulaciones de MD, para poder estudiar la evolución del sistema a lo largo del tiempo, mediante la resolución de las ecuaciones de Hamilton, y equilibrar los sistemas. Se volverá a hacer MD con los sistemas ligando/receptor, colocando el ligando en la posición intercalada, para generar un *pocket*, es decir, un hueco entre las bases centrales de la cadena de ADN para que el ligando pueda quedarse en esa posición durante las simulaciones de *docking*, y posteriormente poder calcular la energía de interacción.

Para obtener una simulación mediante MD adecuada, es necesario seguir una serie de pasos mencionados a continuación [6]:

1. **Minimización de la energía:** Etapa destinada a encontrar un mínimo local de energía, reduciendo las tensiones iniciales del sistema debidas a una posible mala geometría inicial. Para este proyecto se realiza una minimización de 10.000 pasos.
2. **Calentamiento:** Período durante el cual el sistema se relaja hacia un estado de equilibrio termodinámico. En este caso es de tipo NVT, es decir, se hace un calentamiento hasta 300 K del sistema para estar en condiciones normales, utilizando un termostato Langevin. Una vez alcanzada esta temperatura, se mantiene constante junto con el volumen y el número de átomos.

Además, el calentamiento contiene 500.000 pasos de 0,002 ps cada uno dando un tiempo total de simulación de 1 ns.

3. **Equilibrado y Producción:** Fase en la que se recopilan datos para su posterior análisis. En esta última etapa, también se realiza en los momentos iniciales de la simulación un equilibrado de la densidad y de la geometría del sistema en la misma simulación. En total, esta simulación dura 500 ns siendo 0,002 ps el tiempo de cada paso (250.000.000 pasos en total) y se realiza una simulación con el conjunto NPT en el que se mantiene constantes la temperatura (con termostato Langevin), la presión (con baróstato de tipo Berendsen) y el número de partículas.

En general, para todo el protocolo, se aplica *cutoff* de 12 Å para las interacciones no enlazantes (mencionado en el punto 7.1.3). También que se utiliza el método *particle mesh Ewald molecular dynamics* (pmemd) [6], para calcular las interacciones de Coulomb, y el algoritmo SHAKE, que congela los enlaces que tienen hidrógeno (vibraciones de alta frecuencia), lo que permite aumentar el tamaño de paso a 2 fs, haciendo las simulaciones más eficientes.

Debido a que la geometría del sistema puede variar durante la producción de la MD, se realiza *clustering* para obtener una geometría representativa de cada sistema estudiado. En este caso, se realiza a partir de los resultados de RMSD, cuando este está convergido, y solo se obtiene un *cluster* porque la distancia especificada entre estos es muy grande, por tanto, solo existe un *cluster* del cual se sacará la geometría que se utilizará para el resto del estudio. Con esta geometría se procede a realizar *docking*, para encontrar las posiciones del ligando: intercalado, en el surco menor y en el surco mayor.

Después del *docking*, se realizan 4 MD de 5 ns cada una con distintas restricciones en el ligando (cambiando su constante de fuerza progresivamente: 5,0; 2,5; 1,0 y 0,5), que servirán para descartar los sistemas en los cuales el ligando se disocia de la cadena, es decir, el ligando no es estable en dicha posición. Con aquellos sistemas en los que el ligando no se haya disociado de la cadena de ADN, se realizará una última MD de 500 ns para equilibrar por completo el sistema, y serán estos sistemas los que se analizarán en detalle para caracterizar las interacciones PS/ADN.

8.1.3 *Docking*

Previo al cálculo de las energías del *docking* se utiliza el programa de *AutoDock Tools* [21], en el que se crea una “caja” que engloba todo el sistema (receptor/ligando) por la que se moverá la molécula a la hora de hacer *blind docking*, es decir, acoplamiento del ligando a toda la superficie del ADN sin ningún conocimiento previo de la zona objetivo, de manera que pueda encontrar las 3 posiciones de interés. En concreto, se han realizado 10 simulaciones de *docking* con 20 poses cada uno, obteniendo

un total de 200 poses. A partir de las geometrías más estables que se obtienen de estas simulaciones, se vuelve a realizar MD (mencionado en el apartado anterior) ya que el método de *docking* no es lo suficientemente exacto para calcular las energías de interacción.

8.2 Set up de la dinámica molecular

Durante las tres etapas de la MD (minimización de la energía, calentamiento y producción) se ha calculado la evolución de varias propiedades para asegurarnos del buen comportamiento del sistema. En la Figura 5 se muestran los resultados del sistema con la cadena ds-(AT)₈ sin ligando a modo de ejemplo, pero todas las demás simulaciones tienen un comportamiento similar.

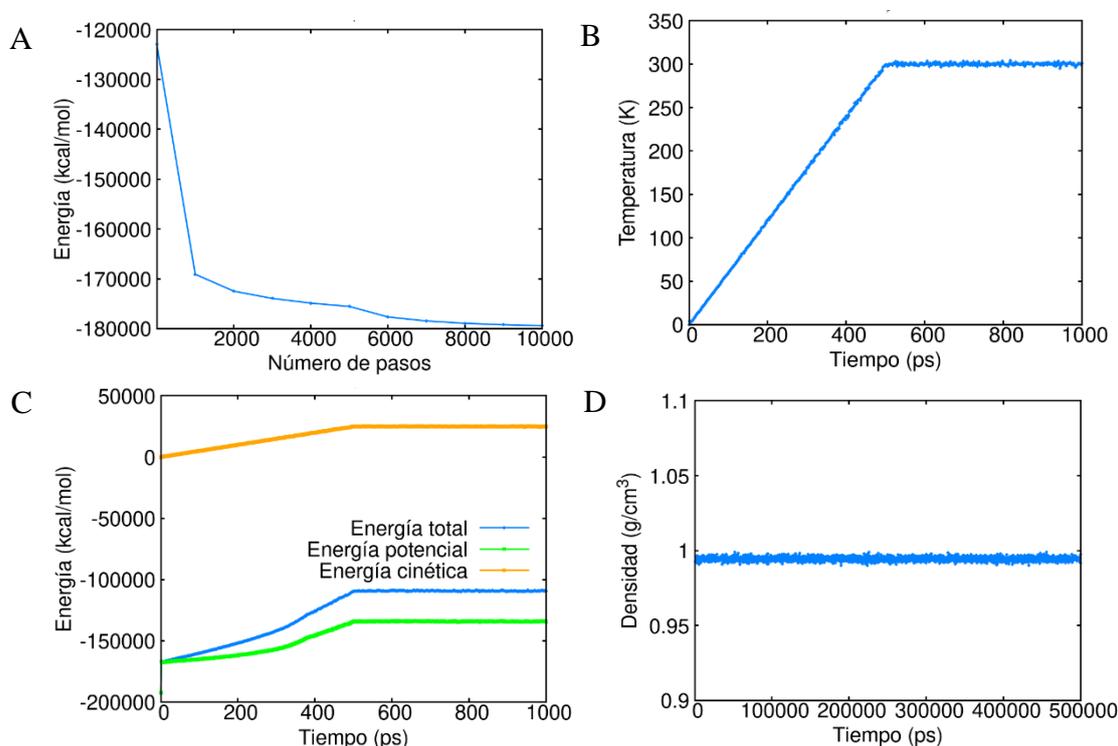


Figura 5. (A) Variación de la energía total a lo largo de la minimización. Evolución temporal (B) de la temperatura y (C) de las energías durante la etapa de calentamiento en los primeros 1000 ps, y (D) de la densidad a lo largo de la producción.

En la Figura 5A se puede observar que el sistema llega a un mínimo de energía después de 10.000 pasos de minimización. Después de la minimización, el sistema se calienta durante los primeros 500 ps hasta 300 K donde se alcanza la temperatura deseada y posteriormente se mantiene constante (Figura 5B). Además, en la Figura 5C se aprecia un aumento de energías hasta los 500 ps, coincidiendo con el aumento de temperatura, y después se mantiene estable. Una vez alcanzada la temperatura deseada, se pasa a la etapa de equilibrado y producción, de 500 ns de duración (Figura 5D), en donde se observa que la densidad se mantiene alrededor de 1 g/cm³ aproximadamente, debido a que el sistema está solvatado en agua.

Para concluir que nuestro sistema está en equilibrio y poder analizar las distintas propiedades, debemos comprobar que la estructura ha convergido. Para ello, se calcula la desviación del valor cuadrático medio (*root mean squared deviation*, RMSD, en inglés) como la diferencia cuadrática entre la geometría de cada paso de la dinámica con respecto a la primera geometría, que se toma como referencia. Como se puede observar en la Figura 6, las oscilaciones en la geometría no son muy importantes y oscilan alrededor de un valor constante. Por tanto, se puede concluir que la geometría del sistema está convergida.

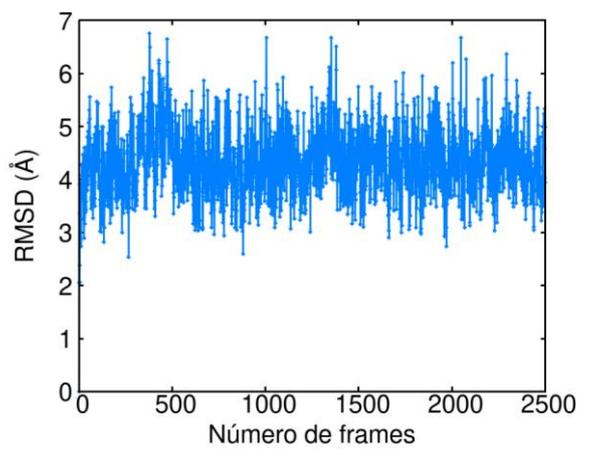


Figura 6. Variación del RMSD durante 2.500 frames en la etapa de producción.

Estos pasos realizados con el sistema ds-(AT)₈, se repiten con la cadena ds-(GC)₈ y se vuelven a llevar a cabo una vez creados los sistemas de ambas cadenas de ADN junto con los dos PS, con ayuda del programa *PyMOL* [8].

8.3 Energías de interacción del *docking*

Se realiza *docking* utilizando la estructura del ADN con el *pocket* obtenida de la dinámica explicada en el punto 8.1.2, para encontrar las posiciones de interacción ligando/receptor y se elige, de cada posición, la geometría con la mínima energía de interacción, dando los resultados que se representan en la Tabla 1.

Tabla 1. Energías de interacción en kcal/mol de los sistemas ADN/ligando con el ligando en las tres posiciones de interés calculadas con el método de *docking*.

	AT-porfirina	AT-TPE	GC-porfirina	GC-TPE
Intercalada	-9,8	-6,3	-9,0	-7,6
Surco mayor	-7,2	-5,6	-7,7	-6,4
Surco menor	-6,8	-6,4	-7,1	-6,2

Comparando los ligandos, se observa que los sistemas más estables son aquellos que contienen el ligando porfirina, ya que esta es una molécula con geometría plana y por tanto puede generar mayor

interacción con la cadena. En cuanto a las distintas posiciones, se puede ver que para el PS porfirina la posición intercalada es más estable debido al apilamiento (*stacking*, en inglés), interacciones π - π entre anillos aromáticos planos, que se generan entre el ligando y las bases nitrogenadas, como se representa en la Figura 2E. Tanto la posición del surco mayor, como la del surco menor (Figura 2C,D), generan interacciones de puentes de hidrógeno, visualizadas con el programa *PyMOL* [8], que son menos fuertes que el *stacking*, siendo la interacción del surco mayor un poco más fuerte para los sistemas AT-porfirina, GC-porfirina y GC-TPE.

En el sistema AT-TPE la situación es diferente, siendo la posición del surco menor ligeramente de menor energía (-6,4 kcal/mol) frente a la posición intercalada (-6,3 kcal/mol). Esto se debe a que, al hacer la simulación de *docking*, no se encontró una geometría en la que se pudiese observar que el ligando TPE estuviese completamente intercalado en la cadena ds-(AT)₈, por tanto, se cogió la geometría más intercalada posible. Al hacer la MD, posteriormente, se observó que el ligando se disoció de la cadena, mostrando que el sistema no era estable debido probablemente a la geometría no planar del TPE, que genera interacciones de *stacking* más débiles con las nucleobases que lo rodean.

8.4 Energías de interacción de la dinámica molecular

Después de las simulaciones MD de todos los sistemas con cada posición, se descartaron aquellos en los que el ligando se había disociado de la cadena, ya que significa que el sistema no es estable. Además, para los complejos PS/ADN que sí fueron estables (AT-porfirina, GC-porfirina y GC-TPE intercalados), se calcularon las energías de interacción ligando/receptor mediante el método MM/GBSA, dando los siguientes resultados:

Tabla 2. Energías de interacción en kcal/mol de los sistemas ADN/ligando en posición intercalada calculadas con el método de MM/GBSA.

	AT-porfirina	GC-porfirina	GC-TPE
E_{gas}	-37,0	-38,3	-29,9
$E_{\text{van der Waals}}$	-43,8	-45,5	-31,2
$E_{\text{electroestática}}$	5,8	7,2	1,3
$E_{\text{solvatación}}$	5,1	3,8	16,5
E_{polar}	8,1	6,8	19,7
$E_{\text{no polar}}$	-2,9	-2,9	-3,2
ΔG_{TOTAL}	-31,9	-34,5	-13,4

La energía libre total del sistema se calcula mediante la suma de la energía interna en fase gas y la energía de solvatación, como se ha mencionado en el punto 7.1.5 (método MM/GBSA). Si se analizan estas por separado:

La energía en fase gas, E_{gas} , en general, tiene una contribución mucho mayor por parte de la energía de van der Waals que de la energía electrostática. Esto se debe a que predominan las interacciones de *stacking* al estar el ligando en posición intercalada en los 3 sistemas. Estas interacciones son principalmente de tipo no electrostático, y se clasifican como interacciones de van der Waals, dentro de las cuales se incluyen las fuerzas de dispersión (interacciones dipolo inducido-dipolo inducido). Para el cálculo de esta energía de interacción en las simulaciones se utiliza el potencial de Lennard-Jones (E_{LJ} , mencionado en el punto 7.1.5), que describe tanto la atracción a larga distancia (por fuerzas de dispersión) como la repulsión a corta distancia (por fuerzas estéricas). Por otra parte, la energía electrostática también contribuye, en menor medida, ya que también existen interacciones entre las cargas permanentes del sistema que también contribuyen a la estabilidad del apilamiento y se calculan a partir del potencial de Coulomb o electrostático (E_C , mencionado en el punto 7.1.5).

Comparando ambos ligandos (porfirina y TPE) con la misma cadena (ds-(GC)₈), existe una diferencia entre las energías de interacción en fase gas de los sistemas, siendo la del GC-porfirina (-38,3 kcal/mol) menor que la del GC-TPE (-29,9 kcal/mol), dado que la molécula de TPE no es plana y presenta interacciones menos fuertes con la cadena de ADN que la porfirina. Si se observan las energías de las distintas cadenas (ds-(AT)₈ y ds-(GC)₈) con el mismo ligando (porfirina), no existe una diferencia significativa (-37,0 y -38,3 kcal/mol), probablemente debido al tamaño similar de los sistemas aromáticos de los pares de bases GC y AT.

Analizando la energía de solvatación, $E_{\text{solvatación}}$, podemos distinguir dos tipos de contribuciones: polar y no polar, y ambas se calculan como se indica en la ecuación 9 del punto 7.1.5.

La contribución polar es la energía asociada a la pérdida de solvatación que se genera cuando se forma el complejo ligando/ADN con respecto a los monómeros solvatados de manera individual. En este caso, los valores de E_{polar} son todos positivos y resalta el valor del sistema GC-TPE (19,7 kcal/mol) ya que, por el mayor tamaño del TPE, este tiene mayor número de interacciones con el agua cuando se encuentra aislado. Por tanto, cuando la TPE interacciona con el ADN, la energía de solvatación que se pierde es mayor. Normalmente, cabría esperar que el ligando de porfirina tuviese una energía de contribución polar mayor porque, aun siendo de menor tamaño que el TPE, puede tener más puentes de hidrógeno con el agua al tener más heteroátomos, pero en el caso de este estudio se observa que

ocurre lo contrario, y que el tamaño contribuye más que los puentes de hidrógeno. Esto también se ve reflejado en el resultado total de la energía de solvatación (16,5 kcal/mol) siendo el de este sistema mucho mayor, es decir, más desfavorable que el resto.

En cuanto a la contribución no polar, representa la diferencia de energía, entre el complejo y los monómeros aislados, que hay que aportar para generar la cavidad en el disolvente para introducir las moléculas (ecuación 9 explicada en el apartado 7.1.5). Puesto que cuando se forma el complejo ligando/ADN la cavidad es más pequeña que la suma de las cavidades de los monómeros por separado, la energía necesaria para formar la cavidad del complejo es menor, y la energía necesaria de la contribución no polar es más baja. En general no existen grandes diferencias entre los sistemas, pero por el mismo razonamiento anterior, el sistema con el ligando de TPE necesitará menos energía (-3,2 kcal/mol) debido a su tamaño.

En general, la energía de solvatación es más desfavorable para el sistema GC-TPE (16,5 kcal/mol) por el ligando, a continuación, sería el sistema AT-porfirina (5,1 kcal/mol) y, por último, el sistema GC-porfirina (3,8 kcal/mol), con la menor energía.

Se concluye con la comparación de las energías libres totales, que el sistema GC-TPE (-13,4 kcal/mol) es el menos estable debido al impedimento del ligando y que, entre los sistemas con porfirina, el más estable es el sistema GC-porfirina (-34,5 kcal/mol) porque la guanina es la base más polar y, así, interacciona más fuerte con el PS.

8.5 Descomposición por residuos de la energía de interacción

Durante esta parte del proyecto se obtuvo, en un primer análisis, el número de contactos entre los residuos de la cadena y el ligando utilizando el módulo de *AMBER cpptraj* [6], y en un segundo análisis, las energías de interacción entre aquellos residuos que se encontraban a menos de 7 Å de distancia utilizando el método MM/GBSA.

Analizando las estructuras de los tres sistemas se pueden distinguir cuatro bases nitrogenadas (residuos) que interaccionan más fuerte con el PS cuando está intercalado, y se encuentran rodeando a este como se representa en la Figura 7.

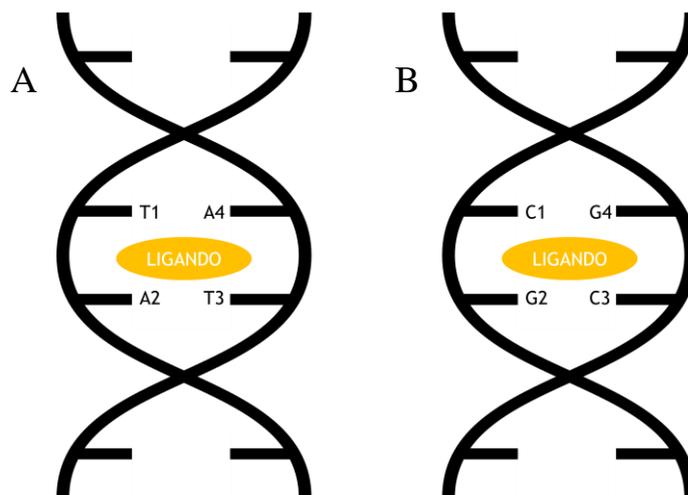


Figura 7. Numeración de los 4 residuos de las dos cadenas de ADN que rodean a las PS en (A) la cadena ds-(AT)₈ y (B) la cadena ds-(GC)₈.

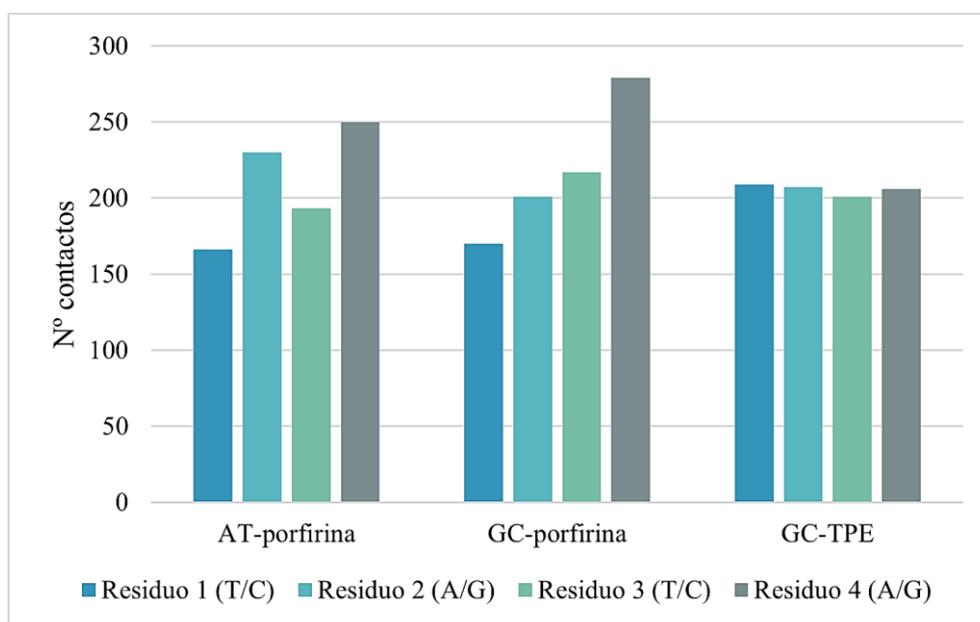


Figura 8. Representación gráfica del número de contactos entre los ligandos y los cuatro residuos más cercanos (T=timina; C=citosina; A=adenina y G=guanina) para cada sistema.

Como se observa en la Figura 8, los sistemas con ligando porfirina (AT-porfirina y GC-porfirina) tienen mayor número de contactos con el residuo 4. En el caso del sistema AT-porfirina, el residuo 4 es una base nitrogenada de adenina y, en el caso del sistema GC-porfirina, es una guanina, como se puede ver en la Figura 7. Las estructuras de ambos residuos (adenina y guanina) son más grandes que sus bases complementarias (timina y citosina), por tanto, es factible que tengan mayor número de contactos con el ligando al tener más superficie de interacción. Un mayor número de contactos debería implicar que la interacción con estas nucleobases es mayor. Para corroborar esto, se analiza la energía libre de interacción ligando/residuo (Tabla 3).

Tabla 3. Energía de interacción en kcal/mol entre el ligando y los cuatro residuos principales que lo rodean (numerados como se indica en la Figura 7).

RESIDUOS	AT-porfirina				GC-porfirina				GC-TPE			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E_{gas}	-4,4	-4,4	-3,9	-6,7	-3,9	-6,3	-5,3	-5,3	-4,0	-3,6	-3,9	-2,7
$E_{\text{van der Waals}}$	-4,2	-5,2	-4,2	-6,3	-4,1	-5,1	-5,3	-6,3	-3,9	-4,2	-2,9	-3,2
$E_{\text{electrónica}}$	-0,2	0,8	0,3	-0,5	0,2	-1,3	0,0	1,0	-0,1	0,6	-1,1	0,4
$E_{\text{solvatación}}$	-2,9	-2,9	-2,8	-2,6	-2,3	-2,1	-2,8	-4,7	-2,2	-2,9	-1,8	-2,9
E_{polar}	-0,6	-0,3	-0,5	0,6	-0,1	0,5	0,1	-1,3	0,3	-0,4	0,7	-0,6
$E_{\text{no polar}}$	-2,3	-2,6	-2,3	-3,2	-2,2	-2,6	-2,9	-3,4	-2,5	-2,5	-2,5	-2,3
ΔG_{TOTAL}	-7,2	-7,3	-7,1	-9,3	-6,2	-8,4	-8,0	-10,0	-6,3	-6,6	-5,7	-5,7

Analizando los datos de la energía libre total, se puede observar que coinciden con los resultados del número de contactos de la Figura 8, teniendo los sistemas AT-porfirina y GC-porfirina energías más estables con el residuo 4 (-9,3 y -10,0 kcal/mol, respectivamente).

Comparando los datos de la energía de interacción PS/ADN en fase gas, se puede ver que la energía de van der Waals domina frente a la energía electrostática, siendo esta última positiva o negativa pero siempre menor (en valor absoluto) que la de van der Waals, debido al predominio del *stacking*, como se ha mencionado en el apartado anterior. Por otra parte, la energía de solvatación en general es pequeña, destacando el valor del sistema GC-porfirina con el residuo 4 (-4,7 kcal/mol) siendo más favorable que el resto de los sistemas.

En la Figura 9A,B se representan ambos sistemas de ADN con ligando de porfirina, y se observa como el ligando de porfirina se encuentra de forma paralela al residuo 4, generando interacciones π - π entre los anillos aromáticos. En el caso del sistema GC-TPE (Figura 9C), las energías libres de interacción entre los 4 residuos son muy similares, y aunque el residuo 2 (guanina) tiene menor energía (-6,6 kcal/mol), no se puede considerar una diferencia significativa frente al resto (-5,7 y 6,3 kcal/mol). Como se ha comentado antes, el motivo de que no tenga mayor interacción con un residuo en concreto

puede ser debido a la estructura no plana del TPE, representada en la Figura 9C, que genera una interacción de *stacking* más débil que la porfirina.

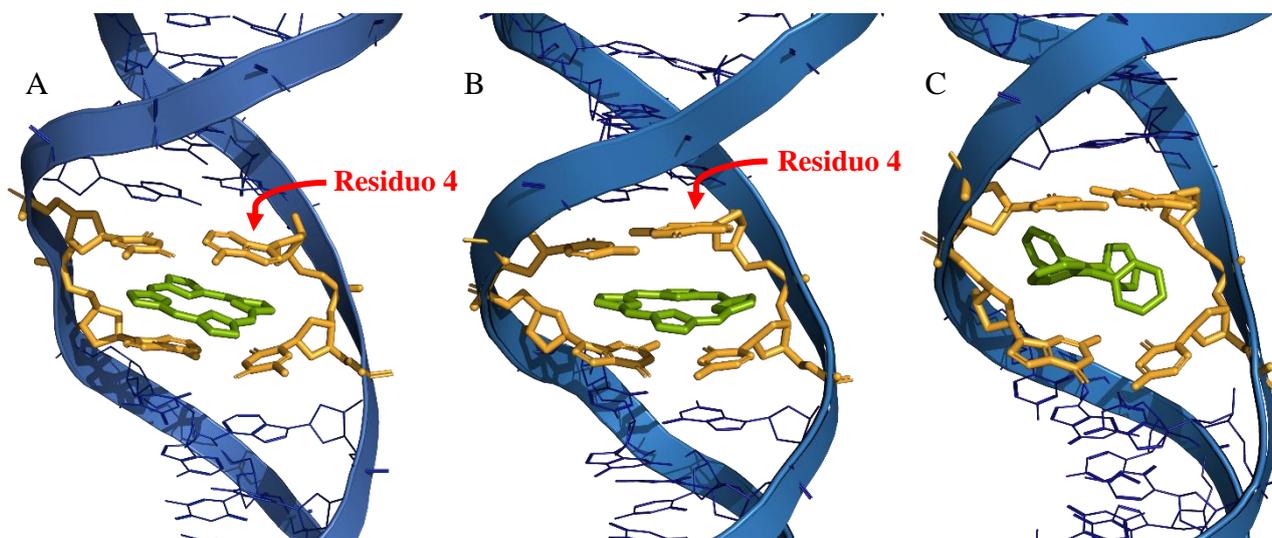


Figura 9. Representación estructural de la interacción ligando/residuo de los sistemas a analizar: (A) sistema AT-porfirina, (B) sistema GC-porfirina y (C) sistema GC-TPE. Los residuos están colocados de la misma manera que se numeran en la Figura 7.

9. CONCLUSIONES

El estudio computacional detallado de la interacción entre dos PS, TPE y porfirina, con secuencias específicas de ADN, ds-(AT)₈ y ds-(GC)₈, ha revelado diferencias significativas en sus mecanismos de unión. La porfirina, con su estructura plana, mostró una mayor afinidad por el ADN, favoreciendo interacciones más estables, especialmente en configuraciones intercaladas que facilitan interacciones de tipo π - π . Por otro lado, el TPE, muy prometedor en PDT debido a sus propiedades de emisión mejoradas, presentó dificultades en la formación de complejos estables debido a su conformación menos plana. Además, al ser la posición de intercalación la más estable, las interacciones de van der Waals son más fuertes que las electrostáticas, quedando las posiciones de los surcos mayor y menor fuera de estudio al no ser estables en los sistemas. Este estudio subraya la importancia de considerar la estructura molecular de los PS en el diseño de terapias basadas en PDT, donde la eficiencia de interacción con el ADN puede influir directamente en la efectividad clínica del tratamiento. Además, este estudio demuestra cómo las técnicas de simulación computacional pueden ser herramientas valiosas para predecir las interacciones entre fármacos y ADN, lo cual es esencial para avanzar en la creación de tratamientos médicos más específicos y potentes.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] José H. Correia, José A. Rodrigues, Sara Pimenta and Tao Dong and Zhaochu Yang, «Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions» *Pharmaceutics*, vol. 13, pp. 1332 , **2021**.
- [2] Gurcan Gunaydin, M. Emre Gedik and Seylan Ayan, «Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer–A Review of the Current Clinical Status» *Front. Chem.*, vol. 9, pp. 686303, **2021**.
- [3] Shuai Wang, Xiao Wang, Liangmin Yu and Mingliang Sun, «Progress and trends of photodynamic therapy: From traditional photosensitizers to AIE-based photosensitize,» *ELSEVIER*, vol. 34, pp. 102254, **2021**.
- [4] Kathrin M. Scherer, Roger H. Bisby, Stanley W. Botchway and Anthony W. Parker, «New Approaches to Photodynamic Therapy from Type I, II and III to Type IV Using One or More Photons» *AntiCancer Agents in Medicinal Chemistry*, vol. 0, pp. 1-21, **2016**.
- [5] Qichao Yao, Jiangli Fan, Saran Long, Jianjun Du, Kun Shao and Xiaojun Peng, « The concept and examples of type-III photosensitizers for cancer photodynamic therapy» *Elsevier Inc.*, vol. 8, pp. 197-209, **2021**.
- [6] D.A. Case, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, D. Ghoreishi, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, D. Greene, R. Harris, N. Homeyer, Y. Huang, S. Izadi, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, D.J. Mermelstein, K.M. Merz, Y. Miao, G. Monard, C. Nguyen, H. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, F. Pan, R. Qi, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C.L. Simmerling, J. Smith, R. SalomonFerrer, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, H. Wei, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, D.M. York and P.A. Kollman, «AMBER 2018», **2018**.
- [7] W Humphrey, A Dalke and K Schulten, «VMD - Visual Molecular Dynamics» *J. Molec. Graphics*, vol. 14, pp. 33-38, **1996**.
- [8] Schrödinger, LLC and Warren DeLano, «PyMOL» **2020**.
- [9] Eberhardt J., Santos-Martins D., Tillack A.F. and Forli S., «AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings» *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 61, pp. 3891-3898, **2021**.
- [10] Oleg Trott and Arthur J. Olson, «AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading» *Journal of computational chemistry*, vol. 31, pp. 455-561, **2010**.

- [11] Roy Dennington, Todd A. Keith and John M. Millam, «GaussView, Version 6.1» *Semichem Inc., Shawnee Mission*, **2016**.
- [12] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, «Gaussian 16, Revision C.01» *Gaussian, Inc., Wallingford CT*, **2016**.
- [13] Stewart A. Adcock and J. Andrew McCammon, «Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins» *Chem. Rev*, vol. 106, pp. 1589-1615, **2006**.
- [14] Efrem Braun, Justin Gilmer, Heather B. Mayes, David L. Mobley, Jacob I. Monroe, Samarjeet Prasad and Daniel M. Zuckerman, «Best Practices for Foundations in Molecular Simulations» *Living Journal os Computational Molecular Science*, vol. 1, pp. 1-28, **2018**.
- [15] Michael P. Allen, «Introduction to Molecular Dynamics Simulation» *John von Neumann Institute for Computing*, vol. 23, pp.1-28, **2004**.
- [16] Samuel Genheden and Ulf Ryde, «The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities» *Informa UK*, vol. 10, pp. 449-461, **2015**.
- [17] Ira N. Levine, *Quantum Chemistry*, New York: 7th Edition, Pearson Education, **2014**.
- [18] Kieron Burke and Lucas O. Wagner, «DFT in a Nutshell» *Int. J. of Quantum Chem.*, vol. 113, pp. 96-101, **2013**.
- [19] Vsevolod Yu Tanchuk, Volodymyr O. Tanin, Andriy I. Vovk and Gennady Poda, «A New, Improved Hybrid Scoring Function for Molecular Docking and Scoring Based on AutoDock and AutoDock Vina» *Chem Biol Drug Des*, vol. 87, pp. 618-625, **2016**.
- [20] D. Becke, «Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange» *J. Chem. Phys.*, vol. 98, pp. 5648-5652, **1993**.
- [21] Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., and Olson, A. J., «AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility» *Journal of Computational Chemistry*, vol. 30, pp. 2785-2791, **2009**.