



ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO AMILOIDE DE LOS
ISLOTES PANCREÁTICOS (hIAPP) CON MEMBRANAS HIDROPEROXIDADAS

CESAR SEBASTIAN GARCIA DELGADO

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

PAMPLONA, COLOMBIA

2022

ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO AMILOIDE DE LOS
ISLOTES PANCREÁTICOS (hIAPP) CON MEMBRANAS HIDROPEROXIDADAS

CESAR SEBASTIAN GARCIA DELGADO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
BIÓLOGO

DIRECTOR: Dr. YANIS RICARDO ESPINOSA SILVA

CODIRECTOR: PhD. MARTHA GRISELDA FLÓREZ RANGEL

GRUPO DE INVESTIGACIÓN: BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÉTICA (BIOMOGEN)

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

PAMPLONA, COLOMBIA

2022

Tabla de contenido

Resumen	8
Palabras clave	8
Planteamiento del problema y justificación	10
Marco teórico	13
Polipéptidos Amiloides de los islotes pancreáticos	13
Lípidos oxidados	19
Biología computacional y Dinámica Molecular	21
Objetivos	24
Objetivo general	24
Objetivos específicos	24
Metodología	25
Construcción de los modelos moleculares	25
Definición de los métodos computacionales	27
Generación de las trayectorias por dinámica molecular	30
Resultados y discusión	31

Validación de los modelos.....	31
Interacción péptido-bicapa.....	35
Estructura del péptido	43
Conclusión.....	48
Agradecimientos y dedicatoria.....	48
Referencias.....	49

Tabla de contenido de figuras

Figura 1. <i>Polipéptido Amiloide de los Islotes de Langerhans Humanos, hIAPP</i>	15
Figura 2. <i>Secuencia Lineal de Aminoácidos en IAPP Humano (hIAPP) y IAPP de Rata (rIAPP)</i>	18
Figura 3. <i>Hidroperoxidación Lipídica</i>	20
Figura 4. <i>Estructuras Lipídicas Simuladas por MD</i>	26
Figura 5. <i>Estructura del péptido (hIAPP)</i>	29
Figura 6. <i>Configuración Inicial del Sistema Hidratado de Bicapa Lipídica con la Presencia de hIAPP</i>	29
Figura 7. <i>Localización de las Cadenas Alifáticas de POPCOOH en la Bicapa</i>	32
Figura 8. <i>Área por Lípido</i>	33
Figura 9. <i>Densidades Parciales</i>	34
Figura 10. <i>Función de Distribución Radial</i>	35
Figura 11. <i>Densidades Parciales para los Sistemas hIAPP+POPC y hIAPP+POPCOOH</i>	36
Figura 12. <i>Distancias de hIAPP al Centro de la Bicapa (Z=0)</i>	37
Figura 13. <i>Distancias de hIAPP por Residuos al Centro de la Bicapa (Z=0)</i>	38
Figura 14. <i>Energía Electroestática en la Interacción Péptido-Bicapa</i>	39

Figura 15. <i>Energía Van der Waals en la Interacción Péptido-Bicapa.</i>	41
Figura 16. <i>Puentes de Hidrógeno Formado entre las Regiones de hIAPP y las Bicapas.</i>	42
Figura 17. <i>Formación de Puentes de Hidrógeno entre Cada Residuo de hIAPP y las Bicapas.</i> ·	47
Figura 18. <i>Estructura Secundaria de hIAPP al en el Sistema hIAPP+POPC.</i>	44
Figura 19. <i>Estructura Secundaria de hIAPP en el Sistema hIAPP+POPCOOH.</i>	44
Figura 20. <i>Helicidad de hIAPP al Interaccionar con la Bicapas.</i>	46
Figura 21. <i>Evolución Temporal de la Interacción de hIAPP con la Bicapa de POPC_{OOH}.</i>	47

Tabla de contenido de ecuaciones y tablas

Ecuación 1.....	22
Ecuación 2.....	22
Ecuación 3.....	22
Tabla 1.....	28

Resumen

POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina) es el fosfolípido más abundante en las células β del páncreas. Este lípido presenta una monoinsaturación en una de sus cadenas alifáticas, haciéndolo susceptible a la adición de un grupo hidropéroxido (R-OOH) a causa de la peroxidación lipídica ocasionada por el estrés oxidativo celular. Esta oxidación tiene varios efectos sobre las propiedades fisicoquímicas de la membrana alterando su composición y complejidad.

Las células β tienen la función de secretar insulina y junto con ella la amilina, también conocida como el polipéptido amiloide de los islotes de Langerhans Humanos (hIAPP), principal componente de los depósitos amiloides encontrados en el páncreas de pacientes con diabetes tipo 2 (T2D). Hay evidencias que relacionan la oxidación lipídica con la formación de estructuras β -amiloides o estructuras oligoméricas intermediarias en hIAPP. Se cree que esto es debido a que los nuevos grupos de carga producto de la oxidación lipídica, mejorarían la interacción del péptido con la membrana.

Mediante simulaciones por Dinámica Molecular (MD) se ha analizado la interacción de hIAPP con bicapas de fosfatidilcolina neutras e hidroperoxidadas (POPC y POPC_{OOH}, respectivamente), usando el paquete de simulación Gromacs. Inicialmente se crearon dos modelos de bicapa monolípídicas para POPC y POPC_{OOH}, analizando sus propiedades fisicoquímicas: área por lípido, espesor, densidad y solvatación. Estabilizadas las bicapas, se agregó a hIAPP en la zona acuosa de la caja de simulación en cercanías a la superficie de la bicapa, evaluando la interacción péptido-bicapa durante 500 ns de simulación. Se analizaron las energías de interacción péptido-bicapa, la distancia del péptido al centro de bicapa, la formación de puentes de hidrógeno, además de la influencia de la bicapa en el contenido de estructura

secundaria de hIAPP. Los resultados obtenidos indican que la hidroperoxidación lipídica aumenta el área por lípido, incrementando su solvatación, al tiempo que disminuye el grosor de la bicapa. Además, se favorece la interacción de hIAPP con los lípidos hidroperoxidados, debido a que el grupo R-OOH en la cadena alifática se ubica en la interfase apolar/polar de la bicapa. Así, la interacción primaria de hIAPP se observó inicialmente a través de su región N-terminal, favorecida por las interacciones electrostáticas. Con el paso del tiempo de simulación, el núcleo amiloidogénico (de características hidrofóbicas) ve favorecida sus interacciones de Van der Waals con la bicapa, al tiempo que aumenta su contenido de hélices- α .

Palabras clave: Dinámica Molecular, hIAPP, Interacción péptido bicapa, Peroxidación lipídica, POPC.

Planteamiento del problema y justificación

En el mundo, la diabetes tipo II (T2D, por sus siglas en inglés) constituye una de las primeras causas de muerte dentro del grupo de las enfermedades no transmisibles, siendo responsable del 8,3% de todas las muertes. Por ejemplo, para el año 2011, se presentaron 4,6 millones de muertes por esta causa, lo que representó el 8,3% de la mortalidad global (DANE, 2013), (Gaviria, *et al*, 2013). La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que 422 millones de adultos tenían diabetes en 2014, en comparación con 108 millones registrados en el 1980 (Mathers, *et al*, 2006). En la T2D, el organismo no utiliza adecuadamente la insulina que produce, por tanto, el incremento de la glucemia por encima de los valores ideales provocó 2,2 millones de muertes por efecto del aumento en el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y de otro tipo (Mathers, *et al*, 2006), (OMS, 2016).

En Suramérica la cifra de afectados alcanza los 26 millones de personas, de las cuales el 45,5% no han sido diagnosticadas; uno de cada 11 adultos tiene diabetes y la prevalencia se estima en 9,2%. En el 2010, la T2D se encontraba entre las primeras cinco causas de muerte en Colombia con una considerable morbilidad (Aschner, 2010). La Federación Internacional de Diabetes (IDF) ha estimado que se espera que el número de adultos con T2D en Colombia aumente de 2,14 millones en 2013 a 3,34 millones en 2035 (Barengo, *et al*, 2017), (*The Emerging Risk Factors Collaboration*, 2010). Desde el punto de vista molecular, la etiología de la T2D está relacionada con la conversión del Polipéptido Amiloide de los islotes de Langerhans humanos (hIAPP) soluble a formas insolubles con capacidad de autoagregarse y formar fibras amiloides. En general este proceso se denomina amiloidogénesis e implica la conversión de una

proteína hacia una estructura diferente de su estado nativo que culmina con la formación y deposición de fibras amiloides (Baler, *et al*, 2014), (Wei, *et al*, 2013).

Es interesante notar que tanto T2D como las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la deposición de placas insolubles que constan de fibrillas amiloides ricas en hojas β (Esposito, *et al*, 2006), (Bhattacharya, *et al*, 2011), (Wei, *et al*, 2007). Por otra parte, la cinética de fibrilación (organización y ensamble) y la estabilidad de las fibras son significativamente dependientes de la secuencia de aminoácidos y las condiciones del entorno. De forma tal, que un paso clave en el ensamble de fibras amiloides ocurre bajo condiciones que estabilizan parcialmente conformaciones proteicas entre los estados plegado-desplegado, involucrando la desestabilización de la conformación nativa inducida por cambios en el pH, la temperatura, la fuerza iónica, estrés oxidativo, etc., llevando a la formación de intermediarios proteicos parcialmente plegados (Bhattacharya, *et al*, 2011), (Holm, *et al*, 2007), (Nelson, *et al*, 2005). Estos intermediarios parcialmente plegados pueden sufrir reordenamientos conformacionales mediados por la reorganización de las interacciones intermoleculares no covalentes, i.e., puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, de van der Waals e hidrofóbicas que posteriormente conducen a la oligomerización y formación de fibras (Bhattacharya, *et al*, 2011), (Pedersen, *et al*, 2010).

Actualmente, hay un interés por las modificaciones oxidativas que pueden ocurrir en los fosfolípidos con cadenas alifáticas insaturadas debidas al estrés oxidativo en la célula, relacionando el daño en los lípidos de membrana con la patogénesis de las enfermedades amiloideas, incluyendo la T2D (Kinnunen, *et al*, 2015). Por lo tanto, para comprender la dinámica de agregación amiloide y como las membranas lipídicas oxidadas aceleran el proceso

de formación de estos agregados, se ha planteado estudiar la agregación amiloide de hIAPP (principal componente de los depósitos amiloides encontrados en el páncreas de pacientes con diabetes tipo II) (Jia, *et al*, 2013) en membranas lipídicas hidroperoxidadas, usando modelos computacionales de sistemas ampliamente caracterizados de forma experimental (Gorbenko, *et al*, 2006), (Siani, *et al*, 2016), (Itri, *et al*, 2014), (Riske, *et al*, 2009). Estudios previos indican que “la presencia a largo plazo de lípidos oxidados en la superficie exterior de células β pancreáticas haría a estas vulnerables al ataque amiloidogénico de la IAPP debido al incremento de las cargas negativas de los lípidos de membranas hidroperoxidadas” (Siani, *et al*, 2016). Aunque en la actualidad se conoce la relación existente entre las membranas cargadas negativamente y la formación de estructuras amiloides es poco conocido el papel de los lípidos hidroperoxidados en este fenómeno, que es justamente el foco de esta investigación.

La completa elucidación de los procesos de agregación proteica requieren la identificación de todos los estados conformacionales y las estructuras oligoméricas adoptadas por la cadena polipeptídica. Esto implica la caracterización de cada una de las transiciones en detalle molecular y la identificación de los residuos o regiones de la secuencia que promueven los diversos estados de agregación en relación con la hidroperoxidación de lípidos insaturados (Wei, *et al*, 2007), (Jain, *et al*, 2008), (Chiti, *et al*, 2006). Con el desarrollo del presente estudio, se logró contribuir a la resolución de este último interrogante.

La identificación y caracterización de oligómeros anteriores a la formación de fibrillas bien definidas son de punto clave para comprender la patogénesis de fibras amiloides, ya que existe evidencia fuerte que relaciona los primeros oligómeros formados durante el proceso de agregación con la toxicidad primaria del amiloide (Bhattacharya, *et al*, 2011), (Wei, *et al*, 2007),

(Chiti, *et al*, 2006). Así, los resultados obtenidos en el presente trabajo de grado contribuyen a la comprensión de los procesos que subyacen a la oligomerización y que anteceden a la formación de fibras y esperanzadoramente serán el punto de partida para estudios que aborden la inhibición de la agregación amiloide en T2D y en otras enfermedades que presenten amiloidogénesis. Adicionalmente, gracias al nivel de detalle molecular del presente estudio, las estrategias orientadas al diseño racional de fármacos que permitan la inhibición de la agregación amiloide de proteínas tendrán mejores datos de partida.

Finalmente, este estudio permitió establecer una nueva línea de investigación en el modelado de moléculas de interés biológico, así como brindar nuevas oportunidades de investigación a los estudiantes de Biología de la Universidad de Pamplona, proporcionando las bases para el trabajo interdisciplinario entre el modelado biomolecular, la biología computacional y la medicina.

Marco teórico

El estudio del plegamiento de proteínas es de vital importancia para entender muchos de los procesos biológicos que ocurren en la célula. Al respecto, existen una serie de desórdenes conformacionales en el estado nativo de la proteína responsables de la aparición de patologías como la diabetes tipo II (T2D), las cataratas y desordenes neurodegenerativos como Parkinson, Huntington, Alzheimer y las encefalopatías espongiiformes transmisibles *ej.*, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Baler, *et al*, 2014), (Wei, *et al*, 2013), (Esposito, *et al*, 2006). A continuación, haremos una descripción más detallada de los polipéptidos amiloides en T2D.

Polipéptidos amiloides de los islotes pancreáticos

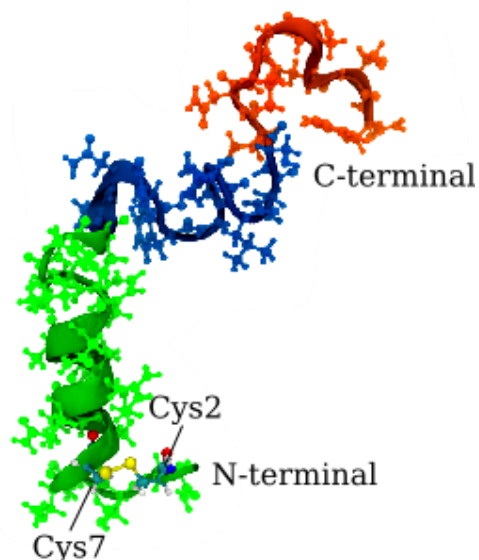
El polipéptido amiloide de los islotes de Langerhans humanos o hIAPP (del inglés: *human islet amyloid polypeptide*), es el principal componente de los depósitos amiloides encontrados en el páncreas de pacientes con diabetes tipo II (T2D) (Jia, *et al*, 2013). hIAPP, es una hormona peptídica de 37 residuos sintetizada por las células β pancreáticas y co-secretada con la insulina (Qian, *et al*, 2016) que desempeña un papel importante en la regulación de la saciedad, el vaciamiento gástrico y el control de la homeostasis de la glucosa y el lactato (O'Brien, *et al*, 1991), (Min, *et al*, 2020). En su forma nativa contiene una amidación en la región C-terminal y un puente disulfuro entre la Cys2 y Cys7 (Guo, *et al*, 2015). Diversos estudios sugieren que los monómeros de hIAPP adoptan predominantemente conformaciones no estructuradas (*random coil* u ovrillo estadístico (Freifelder, 1979, p. 9)) en soluciones acuosas (Reddy, *et al*, 2010), (Williamson, *et al*, 2007), (Vaiana, *et al*, 2009). Sin embargo, en presencia de membranas lipídicas, hIAPP se une a la superficie de la membrana adquiriendo conformaciones α -helicoidales (Guo, *et al*, 2015), (Jayasinghe, *et al*, 2005), (Williams, *et al*, 2010). A medida que aumenta la relación de péptidos unidos a la superficie de la membrana, las hIAPP se transforman cooperativamente desde intermedios α -helicoidales hacia agregados amiloides en hojas β (Jia, *et al*, 2013), (Qian, *et al*, 2016), (Gorbenko, *et al*, 2006), (Siani, *et al*, 2016), (Itri, *et al*, 2014), (Riske, *et al*, 2009), (Jain, *et al*, 2008), (Chiti, *et al*, 2006).

Se ha reportado que la interacción primaria de hIAPP con la membrana es mediada por la región N-terminal comprendida por los residuos 1-19. Los residuos 20-29 conocidos como “núcleo amiloidogénico” (Buchanan, *et al*, 2013), son responsables de la formación primaria de fibras, mientras que los residuos 30-37 de la región C-terminal optimizan la agregación amiloide (Figura 1) (Qian, *et al*, 2016), (Guo, *et al*, 2015), (Engel, *et al.*, 2006), (Kotler, *et al*, 2014), (Brender, *et al*, 2008). Así, se ha demostrado la existencia de una clara interacción entre los

péptidos amiloides y los lípidos de membrana, donde esta última modifica la estructura del péptido y la cinética de formación de fibras (Sparr, *et al*, 2004), (Caillon, *et al*, 2013), al mismo tiempo que la agregación amiloide ocasiona una disrupción en la conformación de la membrana (Sparr, *et al*, 2004), (Zhang, *et al*, 2012), (Khemtémourian, *et al*, 2008), (Seeliger, *et al*, 2012), lo que lleva al daño celular y a una pérdida en masa de células β (componente determinante de la T2D) (Zhang, *et al*, 2017).

Figura 1.

Polipéptido Amiloide de los Islotes de Langerhans Humanos, hIAPP.



Nota: Región N-terminal comprendida por los residuos 1-19 (verde), donde se observa el puente disulfuro formado por la Cys2 y Cys7. Núcleo amiloidogénico, residuos 20-29 (azul). Residuos 30-37 de la región C-terminal (naranja). Estructura obtenida del *Protein Data Bank* (PDB) (Berman, *et al*, 2013) (Código PDB: 5MGQ (Rodríguez, *et al*, 2017)).

Sumado a esto, la formación de fibrillas amiloides posee características semejantes a la de un mecanismo de crecimiento nucleado. El curso temporal de la conversión de un péptido o proteína a su forma fibrilar normalmente incluye una fase de latencia que es seguida por una fase rápida de crecimiento exponencial. La fase de latencia, se supone que es el tiempo necesario para formar núcleos. Una vez que se forma un núcleo, se cree que el crecimiento de fibrillas procede rápidamente por la asociación de monómeros u oligómeros a dicho núcleo. Como muchos otros procesos dependientes de una etapa de nucleación, incluida la cristalización, la adición de especies fibrilares preformadas (protofibras) a una muestra de proteína en condiciones de agregación (“seeding”) hace que la fase de latencia se acorte y/o finalmente se elimine, esto lleva a pensar que la velocidad del proceso de agregación no siempre está limitada por la formación espontánea de núcleos (Jain, *et al*, 2008), (Uversky, *et al*, 2004).

Por otra parte, diversos estudios *in vitro* en modelos de membrana binarios sugieren que la composición lipídica es uno de los factores más influyentes en la agregación de hIAPP, donde, la presencia de membranas con una gran fracción de lípidos aniónicos, principalmente 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (POPS); 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (DOPS); y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo(1'-rac-glicerol) (DOPG) aceleran significativamente el proceso de agregación, en relación a membranas neutras del tipo 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) (Jayasinghe, *et al*, 2005), (Brender, *et al*, 2008), (Caillon, *et al*, 2013), (Khemtmourian, *et al*, 2008), (Zhang, *et al*, 2017). Aunque, existe poca información sobre la composición lipídica de las células β pancreáticas, se ha demostrado que la POPC es la clase de fosfolípidos más abundante, seguido por la fosfatidiletanolamina, la esfingomielina y la POPS (Seeliger, *et al*, 2012). Sumado a esto, se ha observado que el aumento en el porcentaje de

lípidos aniónicos en las membranas de estas células, incrementa la tasa de formación amiloide de hIAPP (Caillon, *et al*, 2013) y el nivel de permeabilización de la membrana (Jo, *et al*, 2007).

Investigaciones previas han mostrado que la disrupción de la membrana por hIAPP consiste en dos procesos ampliamente diferenciados (Kotler, *et al*, 2014), (Sciacca, *et al*, 2012), (Sciacca, *et al*, 2012b). Inmediatamente después de adicionar hIAPP a la membrana, (i) la permeabilidad de esta aumenta mientras su estructura permanece intacta por la formación de un oligómero con propiedades similares a los canales iónicos. (ii) Posteriormente y en correlación con la formación de fibras amiloides, la integridad estructural de la membrana se pierde y esta se fragmenta por la extracción de lípidos desde la membrana celular hacia los agregados amiloides en formación (Kotler, *et al*, 2014), (Sparr, *et al*, 2004), (Khemtémourian, *et al*, 2008), (Zhang, *et al*, 2017), (Kegulian, *et al*, 2015), (Heyl, *et al*, 2010).

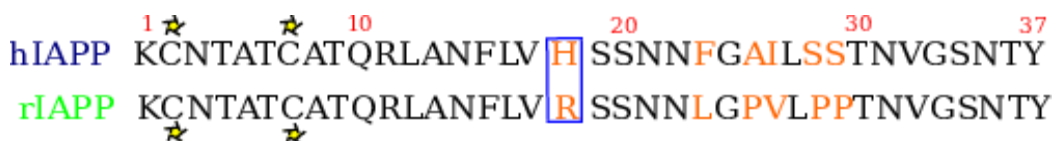
Lo anterior, ha llevado a proponer a los oligómeros α -helicoidales como los intermediarios tóxicos en la formación de fibras (Liu, *et al*, 2017); donde, los lípidos promueven la formación de estas estructuras y al crecer la fibra ocasiona un cambio en la fluidez y curvatura de membrana que influye en la permeabilidad iónica. Esto ocasiona la entrada en exceso de iones calcio extracelulares (Heyl, *et al*, 2010), (Green, *et al*, 2004), conduciendo al estrés oxidativo y al aumento de la apoptosis (Smith, *et al*, 2009).

Otro factor importante en el efecto citotóxico de las células β , son las características moleculares de IAPP. En este sentido, la variante secuencial de la IAPP de rata (rIAPP) es utilizada para indagar en las características moleculares que llevan a la formación de fibras, ya que los seis residuos en los que difiere rIAPP de hIAPP, no le permiten formar fibras amiloides

(Figura 2). Aun cuando rIAPP sea sobreexpresada, tiene poca influencia en las tasas de supervivencia de las células β (Höppener, *et al*, 2000).

Figura 2.

Secuencia Lineal de Aminoácidos en IAPP Humano (hIAPP) y IAPP de Rata (rIAPP).



Nota: Las variantes en las secuencias se indican en naranja. El recuadro azul resalta la mutación puntual His18Arg explicada en el texto. Las estrellas amarillas representan el puente disulfuro entre Cys2 y Cys7.

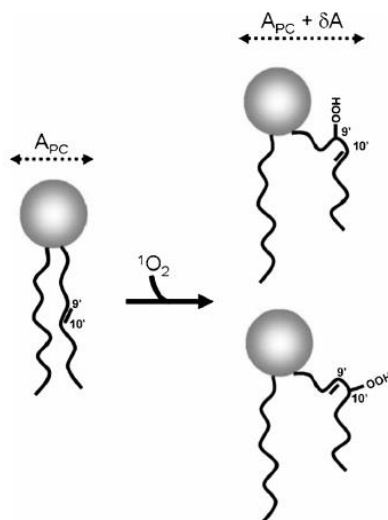
Debido a que IAPP es un polipéptido catiónico donde hIAPP contiene Lys, Arg y un único residuo His, cuya carga neta a pH fisiológico está entre 2 y 4 dependiendo del pK_a en el extremo N-términal y la cadena lateral de la His; la formación amiloide en hIAPP estará acelerada por la interacción con membranas que contengan una alta fracción de lípidos aniónicos. Sin embargo, con tan solo una mutación puntual, His18Arg, en la región N-terminal 1-19 (responsable de la interacción primaria de la IAPP con la membrana) la versión rIAPP, mostró ser significativamente menos tóxica en relación a su homólogo hIAPP (Guo, *et al*, 2015), (Reddy, *et al*, 2010), (Williamson, *et al*, 2007), (Vaiana, *et al*, 2009), (Jayasinghe, *et al*, 2005), (Williams, *et al*, 2010), (Buchanan, *et al*, 2013), (Engel, *et al.*, 2006), (Kotler, *et al*, 2014), (Brender, *et al*, 2008), (Sparr, *et al*, 2004), (Caillon, *et al*, 2013), (Zhang, *et al*, 2012), (Khemtmourian, *et al*, 2008), (Seeliger, *et al*, 2012), (Zhang, *et al*, 2017).

Lípidos oxidados

Como se ha visto hasta ahora, la conversión de proteínas y péptidos a fibras amiloides es acelerada por los lípidos de membrana, los cuales son considerados como puntos de anclaje que median la citotoxicidad de las protofibras amiloides. La condición que prevalece en la fibrilogénesis proteica es la carga negativa de los lípidos de la membrana. Así, el bajo pH en la superficie de membrana por fosfolípidos ácidos, induce su asociación con proteínas positivamente cargadas, al mismo tiempo que anula la repulsión electrostática proteína-proteína y reduce la barrera energética en el paisaje de energía libre, optimizando la agregación amiloide (Gorbenko, *et al*, 2006), (Kinnunen, *et al*, 2015), (Kinnunen, 2009).

Actualmente, hay un gran interés por las modificaciones oxidativas que pueden ocurrir en los fosfolípidos con cadenas alifáticas insaturadas debidas al estrés oxidativo en la célula, relacionando el daño en los lípidos de membrana con la patogénesis de las enfermedades amiloides. Por ejemplo, hay evidencias que indican que la modificación oxidativa de lípidos promueve la formación amiloide en el A β péptido y la α -sinucleína (Kinnunen, *et al*, 2015).

Las membranas biológicas contienen altas cantidades de lípidos y esteroides insaturados que están sujetos a la oxidación química y/o fotoinducida, lo cual conduce a la creación de nuevas especies químicas, que, a pesar de asemejarse a fosfolípidos, tienen un grupo hidrofílico (-OOH) que cuelga de la cadena alifática oxidada en el sitio en donde existió un enlace insaturado. Como consecuencia, estos grupos tienden a migrar hacia la superficie de la bicapa, incrementando el área molecular del lípido (Figura 3). Por tanto, estos nuevos lípidos producto de la oxidación, pueden permanecer en la membrana modificando su composición y complejidad, además de sus propiedades físicas y la fisiología celular (Siani, *et al*, 2016).

Figura 3.*Hidroperoxidación Lipídica.*

Nota: Representación esquemática de la alteración estructural de un lípido insaturado causada por la formación de hidroperóxidos (-OOH). Tomado de (Riske, *et al*, 2009).

Así, los lípidos poliinsaturados pueden comenzar la reacción de oxidación por sí mismos al perder fácilmente un hidrógeno alílico e iniciar una reacción en cadena de sus radicales. Por su parte, los fosfolípidos monoinsaturados y el colesterol necesitan un compuesto altamente oxidante como el radical hidroxilo (OH^\bullet) o el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) para iniciar el proceso de oxidación. De una forma u otra, tanto las reacciones de oxidación fotoinducidas como aquellas químicamente activadas inician con la formación de lípidos hidroperóxidos (Siani, *et al*, 2016), (Itri, *et al*, 2014).

Por consiguiente, la presencia a largo plazo de lípidos oxidados en la superficie exterior de células β pancreáticas haría a estas células vulnerables al ataque amiloidogénico de la IAPP

(presente en altas concentraciones en la superficie celular después de su secreción por parte de estas células) debido al incremento de las cargas negativas de los lípidos de membrana (Siani, *et al*, 2016).

Aunque en la actualidad se conoce la relación existente entre las membranas cargadas negativamente y la formación de estructuras amiloideas, es poco conocido el papel de los lípidos hidroperóxidos en este fenómeno. Hasta ahora, no existe un análisis detallado de la interacción de estas membranas oxidadas con hIAPP, como tampoco la caracterización de las conformaciones estructurales relevantes en el proceso. Por lo tanto, es de vital importancia determinar el rol de los lípidos oxidados en la amiloidogénesis, analizando el papel de la hidroperoxidación en la cinética de agregación amiloide responsable de la diabetes tipo II, que es justamente el foco de investigación en este estudio.

Biología computacional y Dinámica Molecular

El planteamiento metodológico implementado en esta investigación abarca herramientas de biología computacional, que buscan comprender los fenómenos biológicos en sus diversas escalas de interacción, desde moléculas (nanoescala), pasando por células y tejidos (microescala), hasta los ecosistemas y las relaciones filogenéticas y evolutivas de los organismos que los constituyen (mesoescala) (Isea, 2015).

En la presente investigación, se hace uso de las simulaciones computacionales, para entender el comportamiento de las moléculas de interés biológico responsables de la interacción péptido-bicapa en la T2D.

En las simulaciones computacionales existen dos métodos ampliamente usados: el primero es *Monte Carlo* que analiza las energías a distancias cortas en coordenadas aleatorias, y el segundo es la Dinámica Molecular (MD), la cual emplea algoritmos, para evaluar el comportamiento que tienen los sistemas a lo largo del tiempo, tomando en cuenta las bases de la mecánica clásica o molecular, aplicando la segunda ley de Newton.

$$(\vec{F} = m\vec{a}) \text{ (ecuación 1)}$$

El elemento esencial para realizar una simulación por MD es el establecimiento del potencial de interacción a partir del cual se derivarán las fuerzas que determinarán el comportamiento del sistema (Bueren-Calabuig, *et al*, 2014), (Baez. 2013). Lo que permite estimar de forma numérica las condiciones y parámetros que describen sus interacciones (Gromacs, 2020). Así,

$$F_i = \frac{-\delta V}{\delta r_i} \text{ (ecuación 2)}$$

Donde la fuerza F_i que actúa sobre el átomo i de masa m_i se obtiene calculado la derivada de la función del potencial $V(r_1, r_2, \dots, r_N)$. De esta forma, la fuerza sobre cualquier átomo se computa a través del cálculo de la fuerza entre los pares de átomos no-enlazados, más las fuerzas debidas a interacciones enlazantes (Bueren-Calabuig, *et al*, 2014) (Gromacs, 2020).

$$V(r_1, r_2, \dots, r_N) = \sum_{i < j}^N V_{ij} \text{ (ecuación 3)}$$

Inicialmente se atribuyen a los átomos velocidades en una distribución Maxwelliana compatible con una temperatura dada. Se da inicio a la simulación con una serie de pequeños

incrementos de tiempo, y durante cada paso de tiempo transcurrido se calcula la fuerza que actúa sobre cada partícula (Gromacs, 2020).

Durante la ejecución de las simulaciones, las ecuaciones se resuelven simultáneamente en pequeños pasos mientras el sistema evoluciona; cuidando de que la temperatura y la presión permanezcan alrededor de un rango de valores requeridos. Las coordenadas atómicas son registradas a intervalos regulares en el tiempo, lo cual representa la trayectoria del sistema (Gromacs, 2020).

Debido a las funciones que tiene el agua en los organismos, las simulaciones por Dinámica Molecular, tienen en cuenta el solvente en el que se encuentra el sistema. Así, para no despreciar estas interacciones, el solvente puede ser representado de forma implícita o explícita. En el modelo implícito, se acepta la suposición de que las moléculas del solvente pueden ser reemplazadas por un medio de propiedades equivalentes. En contraste, en los solventes explícitos cada molécula cuenta con coordenadas, y constantes de interacción que dan una aproximación más realista de las interacciones con el solvente.

Además, durante las simulaciones de MD, se otorgan condiciones periódicas de contorno (PBC por sus siglas en inglés), por lo que el sistema se encuentra rodeado de replicas en todas las direcciones que otorgan al sistema la condición aparente de estar en un solvente infinito, para que de este modo no se desprecie información (Bueren-Calabuig, *et al*, 2014), (Sepúlveda, *et al*, 2007).

Por otra parte, se deben controlar otras variables características, como la presión, temperatura y energía, lo que hace necesario implementar condiciones isobáricas e isotérmicas, modificando los algoritmos de movimiento, mediante el uso de termostatos y baróstatos, esto es

entendido como someter al sistema a un baño térmico o a un acople de presión (Bueren-Calabuig, *et al*, 2014), (Baez, *et al*, 2013).

Para las simulaciones de Dinámica Molecular, se utilizó el paquete de simulación GROMACS (*GRO*ningen *MA*chine for *C*hemical *S*imulations), el cual es de código abierto y está diseñado principalmente para biomoléculas como lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos. Contando, además, con un amplio tipo de herramientas para la preparación y análisis de trayectorias (Kohnke, *et al*, 2020). Con el uso de este software es posible realizar la preparación del estado inicial, que incluye la construcción del sistema, la solvatación, y la aplicación de un campo de fuerza; seguido de una minimización, que tiene como finalidad encontrar un mínimo de energía en la estructura inicial desde la cual se puede comenzar la integración numérica de las ecuaciones de movimiento. Con esto, se puede realizar una equilibración que lleve al sistema a un estado termodinámico apropiado, usando termostatos y baróstatos según sea requerido. Por último, la fase producción, donde se comienza a recolectar los datos necesarios para el análisis (Braun *et al.*, 2019), (Lemkul, 2019).

Objetivos

Objetivo general

Contribuir a la mejor comprensión del efecto de los lípidos hidroperoxidados en la amiloidogénesis del Polipéptido Amiloide de los islotes de Langerhans humanos, hIAPP.

Objetivos específicos

- Analizar la interacción de hIAPP con los lípidos hidroperoxidados de membrana, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC_{OOH}).

- Identificar los residuos en la secuencia polipeptídica de hIAPP que promueven la interacción lípido hidroxperoxidado-proteína.

Metodología

Para comprender la dinámica de la agregación amiloide y cómo las membranas lipídicas hidroxperoxidadas aceleran el proceso de formación de estos agregados, se analizó el evento inicial que desencadena el proceso de agregación, *i.e.*, la interacción péptido-membrana. Planteándose así el estudio de la interacción del péptido amiloide o hIAPP con bicapas lipídicas neutras e hidroxperoxidadas a partir de modelos computacionales de sistemas caracterizados experimentalmente (Gorbenko, *et al*, 2006), (Siani, *et al*, 2016), (Itri, *et al*, 2014), (Riske, *et al*, 2009).

En esta investigación se usó el paquete de simulación GROMACS 2020 (Kohnke, *et al*, 2020), (van der Spoel, *et al*, 2005), el campo de fuerza CHARMM36 (Huang, *et al*, 2013), el modelo de agua TIP3P (Jorgensen, *et al*, 1983), y el programa de modelado molecular y visualización de estructuras VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (Humphrey, *et al*, 1996), planteando un diseño metodológico estructurado en 3 fases: (i) Construcción de los modelos moleculares; (ii) Definición de los Métodos Computacionales; y (iii) Generación de las trayectorias por dinámica molecular. A continuación, se detalla cada una de estas fases:

Construcción de los modelos moleculares

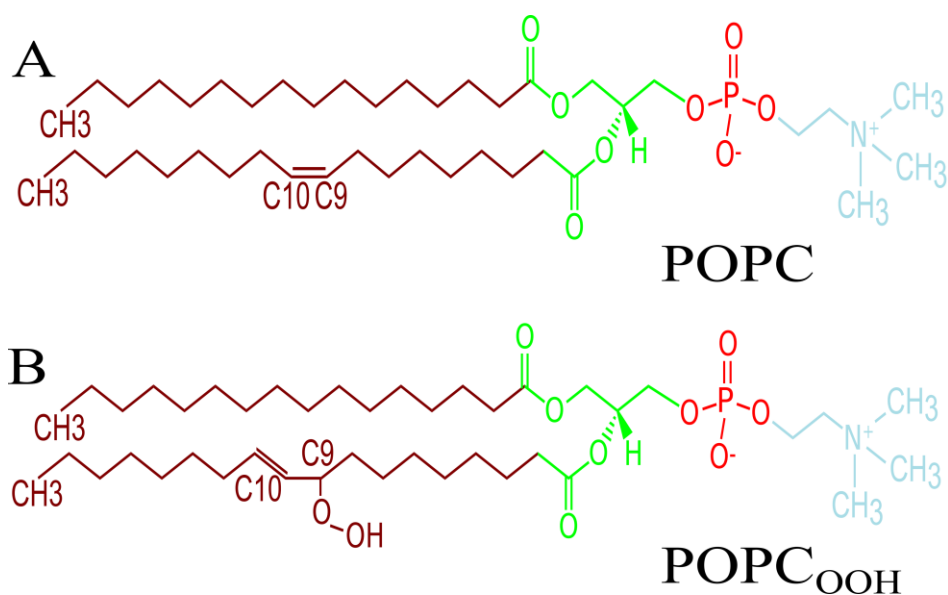
Las simulaciones se llevaron a cabo tomando en cuenta cada uno de los átomos disponibles en el sistema (*all atoms*), usando algoritmos de integración en el tiempo que dan información de la evolución temporal del sistema. Este tipo de estrategias son referidas como

simulaciones por Dinámica Molecular (MD). Inicialmente, se crearon las topologías moleculares (parámetros que dan cuenta de la posición, masa y carga de las moléculas a simular) que describieron los lípidos de membrana (Figura 4):

- lípido neutro: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) (Figura 4A)
- el lípido oxidado: POPC hidroperoxidado (POPC_{OOH}) (Figura 4B)

Figura 4.

Estructuras Lipídicas Simuladas por MD.



Nota: (A) Lípido neutro (POPC) y (B) lípido hidroperoxidado (POPC_{OOH}). La diferencia entre estos radica en la oxidación de la cadena alifática insaturada de POPC. La carga neta de los dos modelos lipídicos es igual a cero.

Como coordenadas de inicio para hIAPP se usó la estructura resuelta por Resonancia Magnética Nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) que reposa en el *Protein Data Bank* (PDB) bajo el código 5MGQ (Rodríguez, *et al*, 2017) (Figura 1).

Las bicapas estuvieron compuestas de 82 lípidos por capa (164 en total), y su construcción se llevó a cabo mediante el constructor de membranas CHARMM-GUI (Jo, *et al*, 2008) para POPC y el software PACKMOL en POPC_{OOH} (Martínez, *et al*, 2009). La bicapa de POPC_{OOH} se obtuvo del trabajo previo del que deriva el presente estudio (Espinosa *et al.*, 2022) la cual cuenta con una modificación en la instauración del C9, debido a la hidroxidación lipídica (Figura 4). Los sistemas fueron hidratados con el solvente explícito TIP3P (Jorgensen, *et al*, 1983), adicionando 13.078 moléculas de agua en el sistema de bicapa POPC y 13.232 moléculas de agua en el sistema de bicapa POPC_{OOH}. Los dos sistemas estuvieron compuestos de bicapas monolipídicas: POPC y POPC_{OOH}.

Definición de los Métodos Computacionales

Inicialmente, los sistemas fueron optimizados siguiendo un proceso de minimización de energía de un estado, usando el algoritmo *steepest descent* durante 5000 pasos, restringiendo la posición inicial del átomo de fósforo en el lípido, con una constante de fuerza de $1000 \text{ kJ/mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$, en todas las direcciones cartesianas. La finalidad de este método fue optimizar la geometría del sistema y la distancia de las interacciones atómicas, evitando así conformaciones de alta energía que puedan ocasionar errores en las simulaciones.

Posterior a la minimización, y siguiendo el proceso de seis pasos planteado por Jo *et al* (2007), los sistemas fueron acoplados a un baño de temperatura ($T = 303.15 \text{ K}$) y presión (1 bar), usando el termostato y el baróstato de *Berendsen* (Berendsen, *et al*, 1984), donde la restricción

de posición sobre los átomos de la bicapa se fue relajando hasta los $0 \text{ kJ/mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ (Tabla 1). Este proceso es conocido como la equilibración del sistema y lo que se busca con esto es equilibrar e hidratar correctamente las bicapas lipídicas sin modificar bruscamente el volumen del sistema. Las constantes del tiempo de acople para el termostato y el baróstato fueron de $\tau_t = 0,1$ y $\tau_p = 1,0$ ps respectivamente. Al finalizar el proceso un nanosegundo de simulación fue agregado a los sistemas antes de las corridas de estabilización.

Tabla 1.

Pasos para la Equilibración de los Sistemas de Bicapa POPC y POPC_{OOH}

Pasos	Ensamble	Pasos de integración (fs)	Tiempo de simulación (ps)	Constante de restricción armónica ($\text{kJ/mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$)
1	NVT	1	125	1000
2	NVT	1	125	400
3	NpT	1	125	400
4	NpT	2	500	200
5	NpT	2	500	40
6	NpT	2	500	-

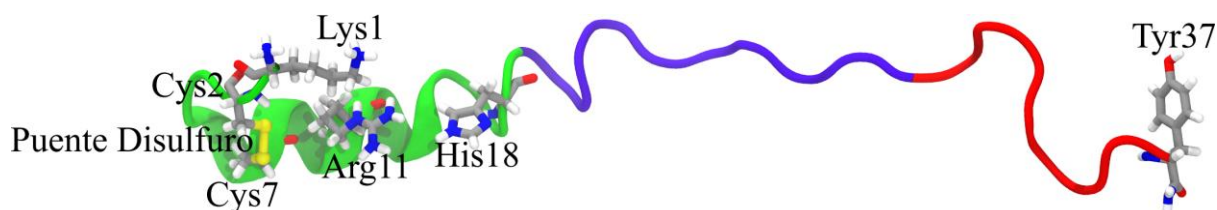
Seguidamente, los sistemas de bicapa fueron simulados por 100 ns para su estabilización antes de la inclusión de hIAPP. Los resultados de la estabilización y las propiedades fisicoquímicas obtenidas en las bicapas modelo de POPC y POPC_{OOH} se presentan en el apartado de Resultados y Discusión.

Una vez se estabilizadas las bicapas, se agregó el péptido (hIAPP) a una distancia de 40 Å del centro de la bicapa. En el modelo, hIAPP cuenta con su longitud completa de 37 aminoácidos, su N-terminal cargado (NH^{+3}), su C-terminal aminado y los residuos de Cys2 y Cys7 están formando un puente disulfuro. Estas características son esenciales para la actividad biológica del hIAPP (Roberts, *et al*, 1989). La simulación del péptido se realizó en condiciones

de pH neutro, por lo que las cadenas lateral de Lys1 y Arg11 fueron protonadas, mientras que el residuo de His18 solo se protonó N_ϵ . Es decir, una carga neutra para His18, y una carga total para el péptido de +3 (Figura 5). La carga del sistema fue neutralizada agregando 3 contraiones de Cl^- .

Figura 5.

Estructura del péptido (hIAPP).

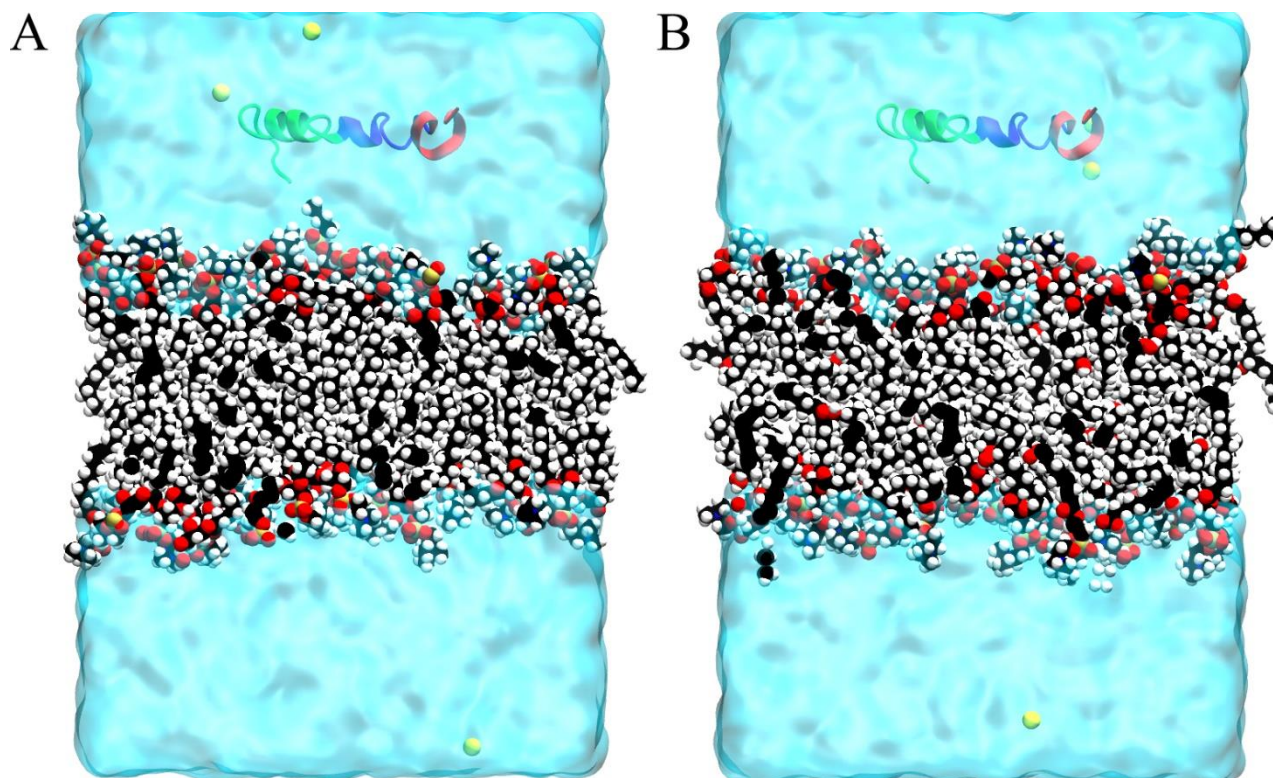


Nota: Estructura resuelta por RMN. El enlace disulfuro entre los residuos Cys2 y Cys7, C-terminal aminado, el N-terminal cargado (NH_3^+), la histidina con una carga neutra y la Lys1 y Arg11 protonadas en sus cadenas laterales. En verde: N-terminal, en violeta: Núcleo amiloidogénico y en rojo: C-terminal

Establecido el sistema péptido-bicapa, se realizó una segunda minimización por *steepest descent* y se restringieron las posiciones atómicas del esqueleto peptídico (*Backbone*) en su posición inicial, utilizando un potencial armónico de $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ en todas las direcciones cartesianas. Posteriormente los sistemas péptido-bicapa, se equilibraron durante 1 ns en el ensamble NpT a 1 bar y 303.15 K, manteniendo la restricción de posición (Figura 6).

Figura 6.

Configuración Inicial del Sistema Hidratado de Bicapa Lipídica con la Presencia de hIAPP.



Nota: (A) POPC, (B) POPC_{OOH}. El agua en color cian traslucido (modelo TIP3P), el oxígeno es representando en esferas rojas, los aniones de cloro (Cl⁻) en amarillo. El péptido se encuentra representado por regiones el N-terminal (residuos 1 al 19) en verde, el núcleo amiloidogénico (residuos 20 al 29) en violeta y el C-terminal (residuos 30 al 37) en rojo. hIAPP fue agregado en la región acuosa de la caja de simulación paralelo a la superficie de la bicapa a una distancia de 40 Å del centro de la misma.

Generación de las trayectorias por Dinámica Molecular

Al igual que en los sistemas de bicapa, en los sistemas péptido-bicapa, las interacciones de Lennard-Jones fueron calculadas dentro de un radio de corte de 1,2 nm. Para el cálculo de las fuerzas electrostáticas se utilizó el método de *Particle-Mesh Ewald* (PME) (Abraham, *et al*, 2011). El paso de integración en las simulaciones fue de 2 fs, manteniendo las restricciones

topológicas para la longitud de los enlaces lipídicos y proteicos usando el algoritmo LINCS (Hess, *et al*, 1997). En las simulaciones se utilizaron condiciones periódicas de contorno en todas las direcciones. Las trayectorias generadas fueron guardadas cada 20 ps.

Además de los habituales programas de análisis con que cuenta el paquete GROMACS, otro programa usado para complementar los estudios de proteínas es el DSSP (*Define Secondary Structure of Proteins*). Este algoritmo funciona reconociendo patrones geométricos y puentes de hidrógeno extraídos de una configuración 3D de la proteína a estudiar. DSSP identifica como puente de hidrógeno a un enlace no-covalente cuya energía sea ≤ -2.092 kJ/mol al tiempo que se forman estructuras elementales como giros y puentes. De modo que para la formación de estructuras secundarias es necesaria la repetición de dichos patrones elementales. Por ejemplo, la repetición de los giros da paso a la formación de las hélices- α , mientras que la repetición de los puentes forma escaleras, las que a su vez darán paso a las hojas- β (Kabsch, *et al*, 1983).

Todos los cálculos se llevaron a cabo en Unidades de Procesamiento Gráfico (GPU), lo cual fue posible gracias a la colaboración del Dr. Carlos Manuel Carlevaro del Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos, en La Plata – Argentina.

Resultados y Discusión

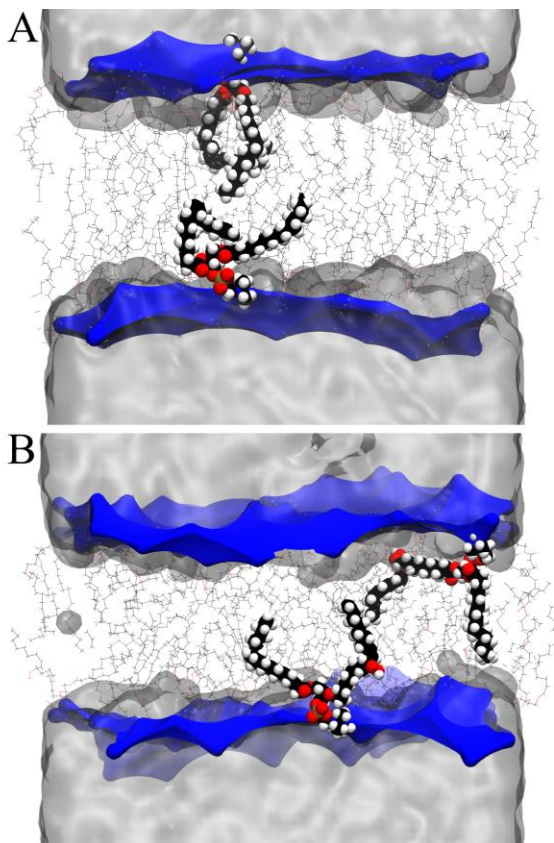
Validación de los modelos

Previo al análisis de la interacción péptido-bicapa, se realizó la validación de los modelos de bicapa para los lípidos de POPC y POPC_{OOH}. Para esto analizaron las propiedades fisicoquímicas: de área por lípido, espesor, densidad y solvatación (descrita por la función de la distribución radial, $g(r)$).

Uno de los cambios más notables en los lípidos hidropoxidados, es la elevación de las cadenas alifáticas con el grupo funcional R-OOH (Figura 7), causando, un incremento del 19,53% en el área por lípido de POPC_{OOH} ($77,1 \pm 2,0 \text{ \AA}^2$) en comparación con POPC ($64,5 \pm 1,1 \text{ \AA}^2$) (Figura 8). Estos valores son similares a los reportados experimentalmente y mediante modelos *in silico* (Kučerka, *et al*, 2006), (Jójárt, *et al*, 2006). Al respecto, De Rosa *et al* (De Rosa, *et al*, 2018) reportan valores similares a los aquí presentados, al trabajar en vesículas unilamelares grandes (LUVs, por sus siglas en inglés) con mezclas lipídicas de POPC:POPC_{OOH}, observando valores en el área de $65,4 \pm 0,4 \text{ \AA}^2$ para LUVs de POPC y de $78 \pm 2 \text{ \AA}^2$ cuando los LUVs tienen todos sus lípidos hidropoxidados.

Figura 7.

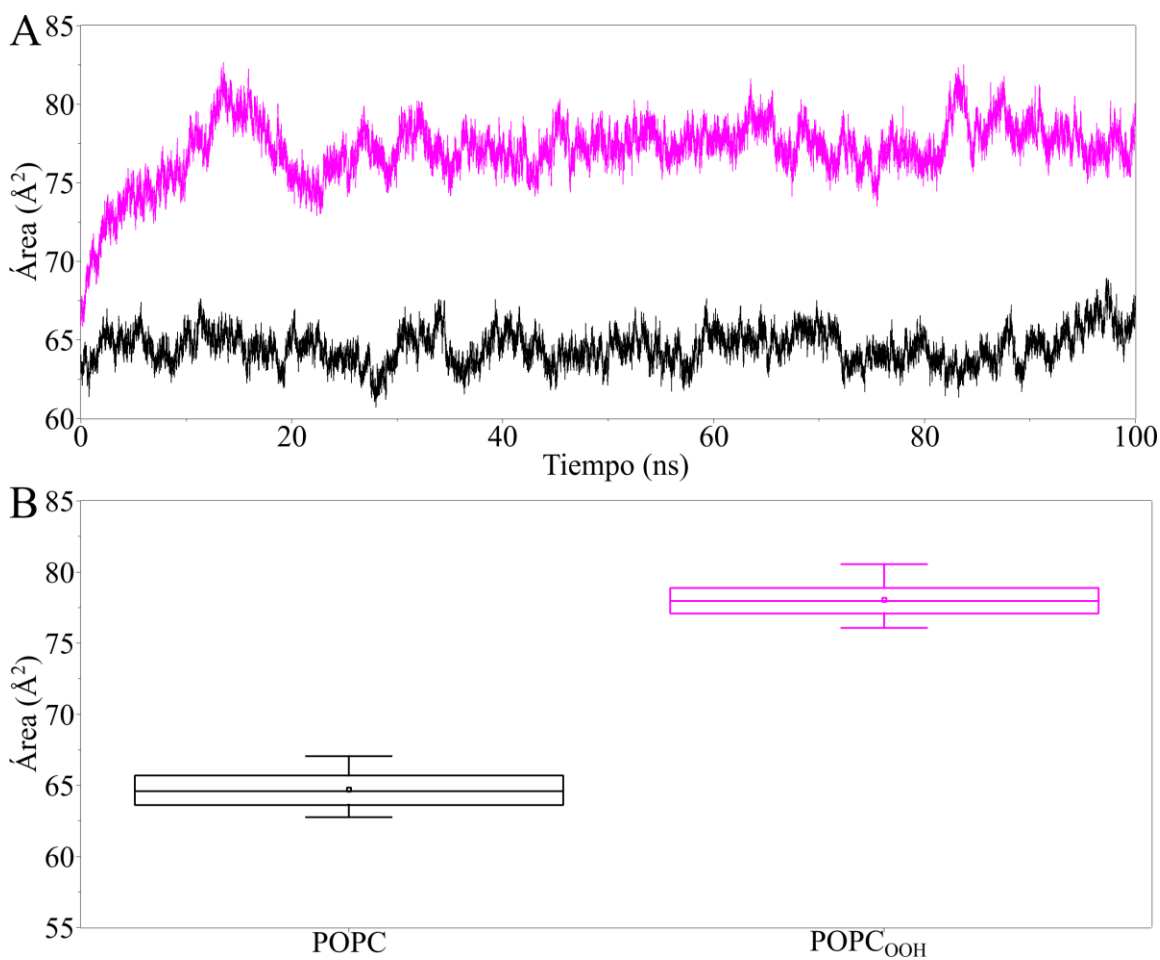
Localización de las Cadenas Alifáticas de POPC_{OOH} en la Bicapa.



Nota: (A) POPC, (B) POPC_{OOH}. El agua se encuentra sombreada en color gris, el nitrógeno está representado por la superficie azul. Las esferas rojas, naranjas, negras y blancas corresponden a los átomos de oxígeno, fósforo, carbono e hidrógeno, respectivamente. Nótese en (B) el grupo hidroperoxidado en el C9 de las cadenas alifáticas.

Figura 8.

Área por Lípido.

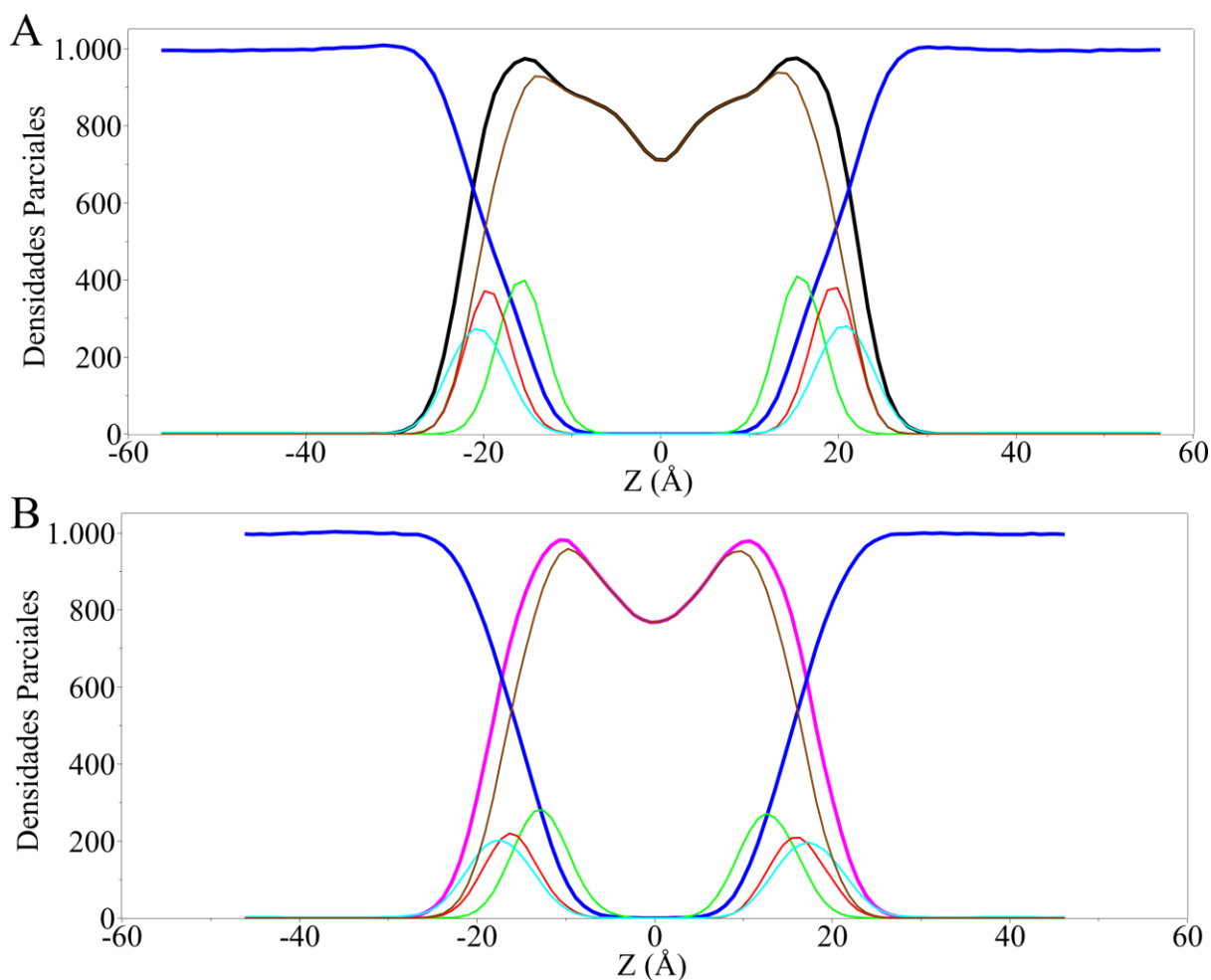


Nota: En color negro está representado POPC y en color magenta POPC_{OOH}. (A) Cambios en el área por lípido, durante 100 ns de simulación, (B) Diagrama de caja sobre los últimos 20 ns de simulación observados en (A).

Las alteraciones en el área lipídica, ocasionan una disminución en el espesor de la bicapa de aproximadamente 17,97% en POPC_{OOH} (34,52 Å) respecto a POPC (42,08 Å). En estudios por dispersión de rayos X de ángulos bajos (SAXS por sus siglas en inglés), indican que el espesor de la bicapa lipídica disminuye con el incremento de POPC_{OOH} (Scanavachi, *et al*, 2021), llegando a descender hasta en un 20% en relación a su variante no oxidada (De Rosa, *et al*, 2018) (Figura 9).

Figura 9.

Densidades Parciales.



Nota: El cálculo fue realizado tomando al centro de la bicapa como punto de referencia, $Z = 0$ Å.

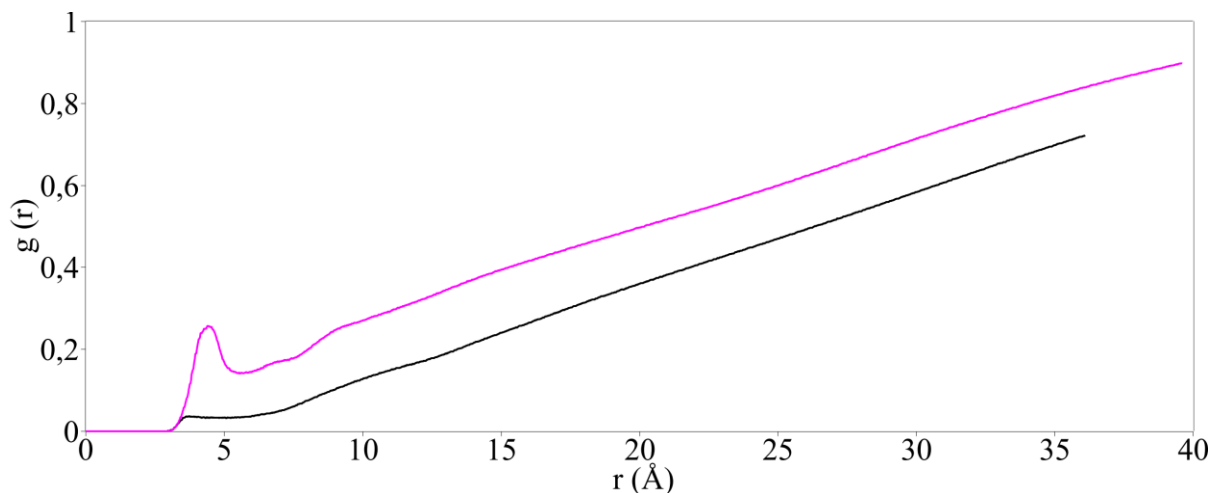
(A) Bicapa de POPC (línea negra), (B) bicapa de POPC_{OOH} (línea magenta). En azul: agua, en azul

claro: grupo colina, en rojo: grupo fosfato, en verde: grupo glicerol, y en marrón: las cadenas acilo. Los átomos que conforman cada uno de los grupos se muestran en la Figura 4.

Finalmente, la solvatación, alrededor del grupo hidroperóxido se ve incrementada. Esto es evidenciado a partir del cálculo de la $g(r)$ (Figura 10) al rededor del C9 en la cadena alifática (Figura 4). Así la posición preferencial del grupo hidroperóxido (R-OOH), causa una elevación en la cadena alifática hacia la interfase apolar/polar de la bicapa, gracias al carácter hidrofílico del R-OOH (Figura 7) (Weber, *et al*, 2014), (Wong-ekkabut, *et al*, 2007), (Guo, *et al*, 2016), (van der Paal, *et al*, 2016), (De Rosa, *et al*, 2018), (Jurkiewicz, *et al*, 2012), (Siani, *et al*, 2016), (Jia, *et al*, 2013), (Junqueira, *et al*, 2021), (Scanavachi, *et al*, 2021).

Figura 10.

Función de Distribución Radial.



Nota: El cálculo fue realizado sobre el átomo de oxígeno en las moléculas de agua cerca al carbono C9. En color negro POPC y en color magenta POPC_{OOH}.

Interacción péptido-bicapa

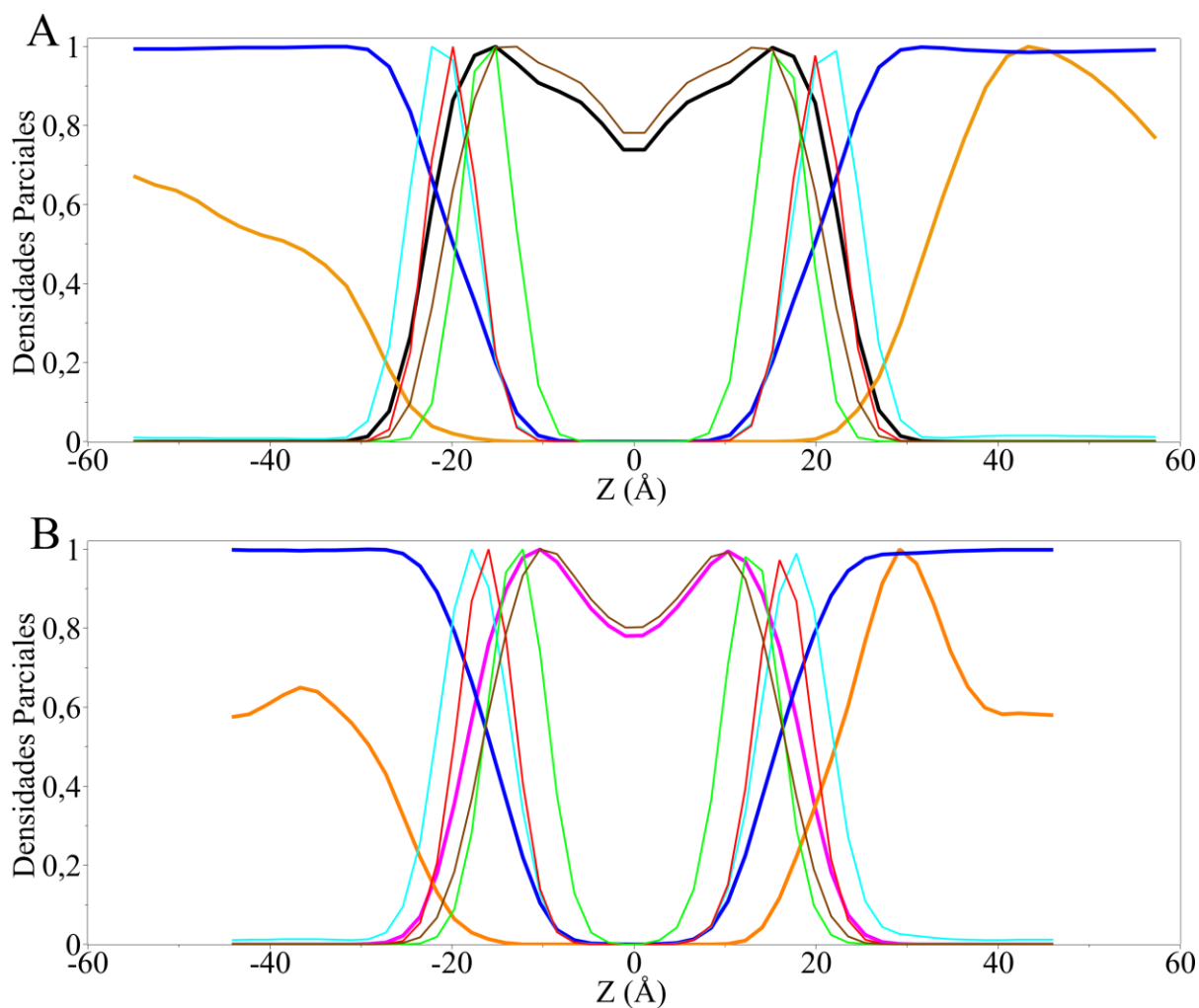
Para el estudio de la interacción entre el péptido y las bicapas, se analizaron las densidades de los sistemas péptido-bicapa (hIAPP+POPC y hIAPP+POPC_{OOH}) las distancias del

péptido al centro de las bicapas (por regiones y por cada aminoácido), las energías de interacción electrostáticas y de Van der Waals, además de la formación de puentes de hidrógeno.

En el análisis de densidad, hIAPP+POPC_{OOH}, se observa una disminución en el espesor de la bicapa, además de una mayor interacción del hIAPP con los grupos colina, fosfato y glicerol, contrario a lo observado en el perfil de densidad del sistema hIAPP+POPC, donde el péptido muestra una preferencia por las moléculas de agua (Figura 11).

Figura 11.

Densidades Parciales para los Sistemas hIAPP+POPC y hIAPP+POPC_{OOH}.



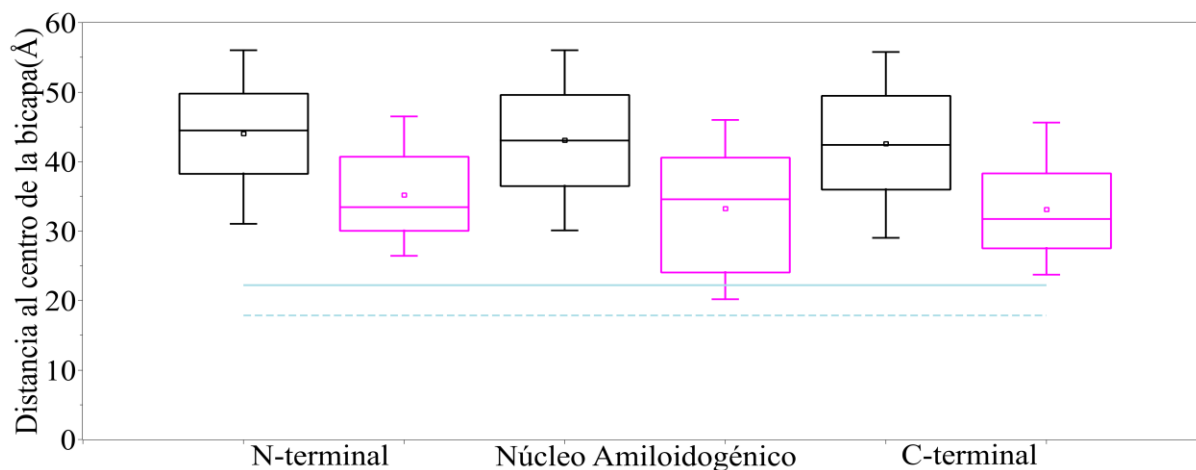
Nota: El cálculo se realizó sobre los 500 ns de trayectoria, tomando al centro de la bicapa como

punto de referencia $Z = 0 \text{ \AA}$. (A) hIAPP+POPC, (B) hIAPP+POPC_{OOH}. En negro: POPC, en magenta: POPC_{OOH}, en naranja: hIAPP, en azul: agua, en azul claro: grupo colina, en rojo: grupo fosfato, en verde: grupo glicerol, y en marrón: las cadenas acilo.

Para el análisis de distancia al centro de la bicapa (Figura 12), inicialmente el péptido ha sido dividido en: N-terminal, núcleo amiloidogénico, y C-terminal (Ver figura 5), según su papel en la interacción con la membrana y la formación de agregados β -amiloides. Así se observa que en hIAPP +POPC_{OOH} el péptido tiende a conformaciones más cercanas a la bicapa (Figura 12), siendo el núcleo amiloidogénico la región más cercana a la misma, en contraste con las regiones N-terminal y C-terminal. Por otra parte, en hIAPP+POPC el acercamiento del péptido a la bicapa no es evidente, reforzando lo observado en el análisis de la Figura 11, donde el péptido muestra una mayor preferencia por el solvente.

Figura 12.

Distancias de hIAPP al Centro de la Bicapa ($Z=0$).

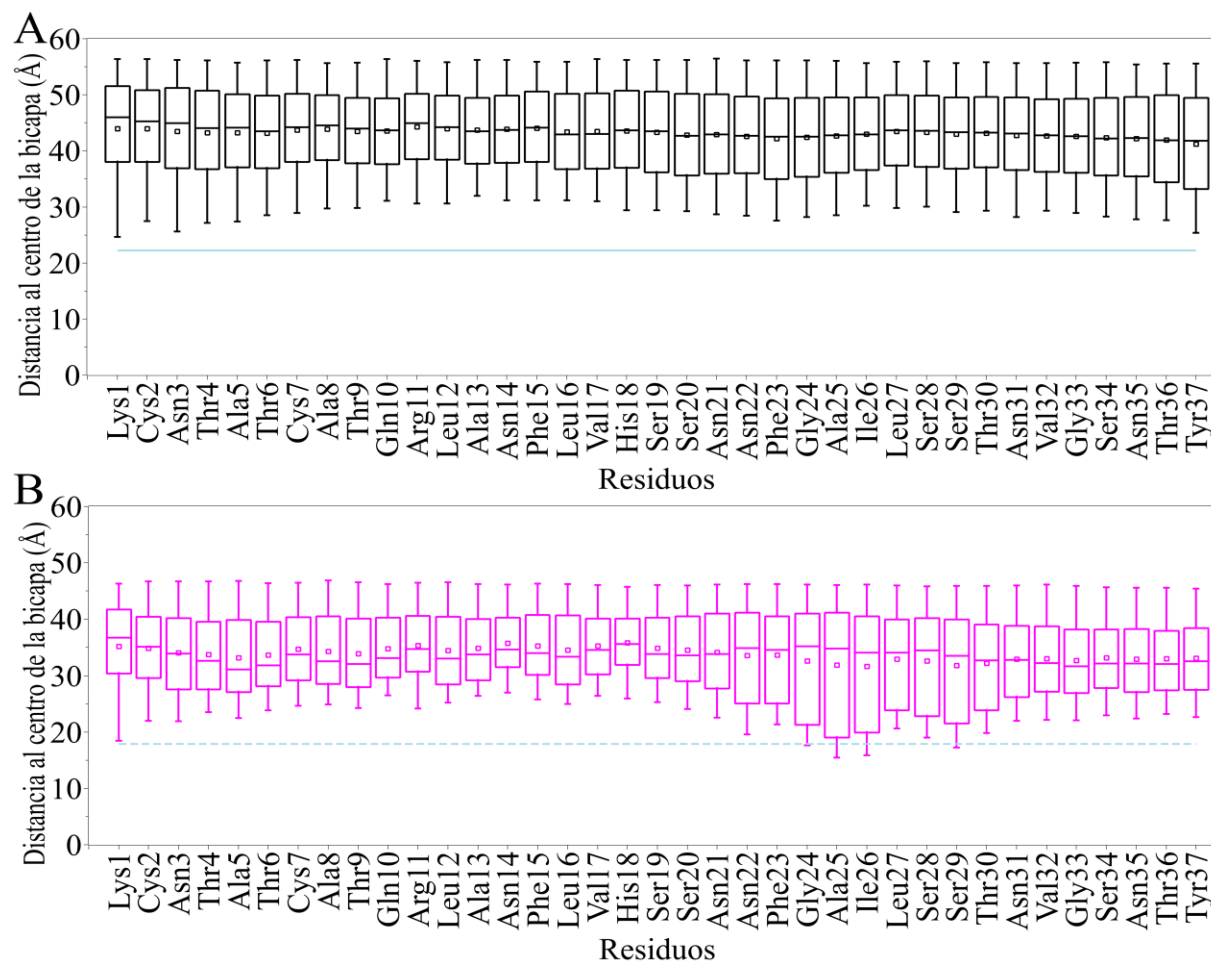


Nota: Distancia por regiones en hIAPP+POPC (negro) en hIAPP+POPC_{OOH} (magenta), la línea sólida y punteada en color azul claro, da una idea de la posición del nitrógeno en el grupo colina de la bicapa de POPC y POPC_{OOH}, respectivamente.

Al analizar la distancia de cada uno de los aminoácidos en hIAPP (Figura 13A y 13B) al centro de la bicapa, se observa que los residuos del péptido que más se acercan a la superficie de la bicapa de POPC son Lys1, Asn3 y Tyr 37. Sin embargo, durante el 50% del tiempo de simulación (segundo cuartil) la distancia de estos residuos a la superficie de la bicapa varía considerablemente. Sin embargo, en hIAPP+POPC_{OOH} tanto la cantidad de residuos que se acercan a la bicapa como su tiempo de residencia es mayor. Notándose principalmente en los residuos de la región N-terminal y el núcleo amiloidogénico (especialmente los residuos del 23 al 27 o región FGAIL).

Figura 13.

Distancias de hIAPP por Residuos al Centro de la Bicapa (Z=0).



Nota: Distancia por residuos en hIAPP+POPC (A) en hIAPP+POPC_{OOH} (B), la línea sólida y punteada en color azul claro, da una idea de la posición del nitrógeno en el grupo colina de la bicapa de POPC y POPC_{OOH}, respectivamente.

La energía de interacción péptido-bicapa (Figuras 14 y 15), muestra que el grupo de carga aportado por la hidroxidación, favorece la interacción péptido-bicapa.

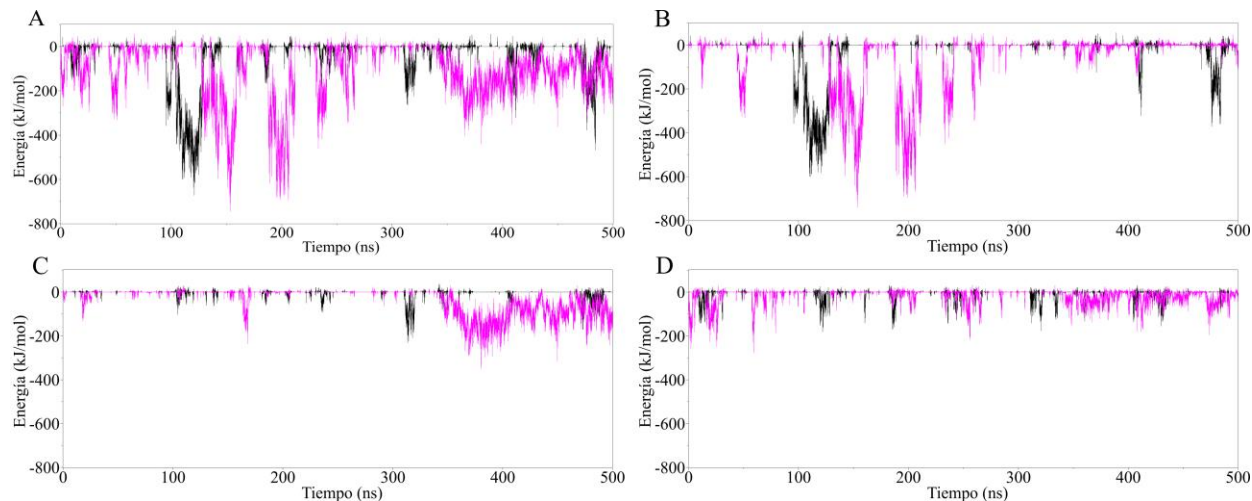
Al analizar la energía electrostática se observa que cuando hIAPP interactúa con la bicapa hidroxidada esta interacción es mayor en contraste con la bicapa neutra (Figura 14A). Cuando el análisis de la interacción se realiza entre las bicapas y cada una de las regiones de hIAPP, resalta que en la región del N-terminal de hIAPP+POPC (Figura 14B) hay una interacción primaria entre los 100 y los 150 ns con un mínimo de energía cercano a los -600 kJ/mol. Por su parte, en la región N-terminal de hIAPP+POPC_{OOH}, esta interacción comienza un poco más tarde, siendo más estable a lo largo del tiempo (desde 120 a 215 ns aproximadamente) y alcanzando una energía mínima de -743 kJ/mol.

El núcleo amiloidogénico en hIAPP+POPC, (Figura 14C) muestra una menor interacción en relación con la región N-terminal, pero mayor sí es comparada con la región C-terminal, llegando a un mínimo de -225 kJ/mol a los 315 ns de simulación. En hIAPP+POPC_{OOH}, la interacción con el núcleo amiloidogénico se da mayoritariamente en los últimos 150 ns de simulación, con un mínimo de energía de -350 kJ/mol observado a los 380 ns.

Finalmente, la región C-terminal (Figura 14D), muestra la menor interacción con las bicapas, debido tal vez a los movimientos estocásticos en esta región, que hacen menos estable su interacción con la bicapa.

Figura 14.

Energía Electrostática en la Interacción Péptido-Bicapa.



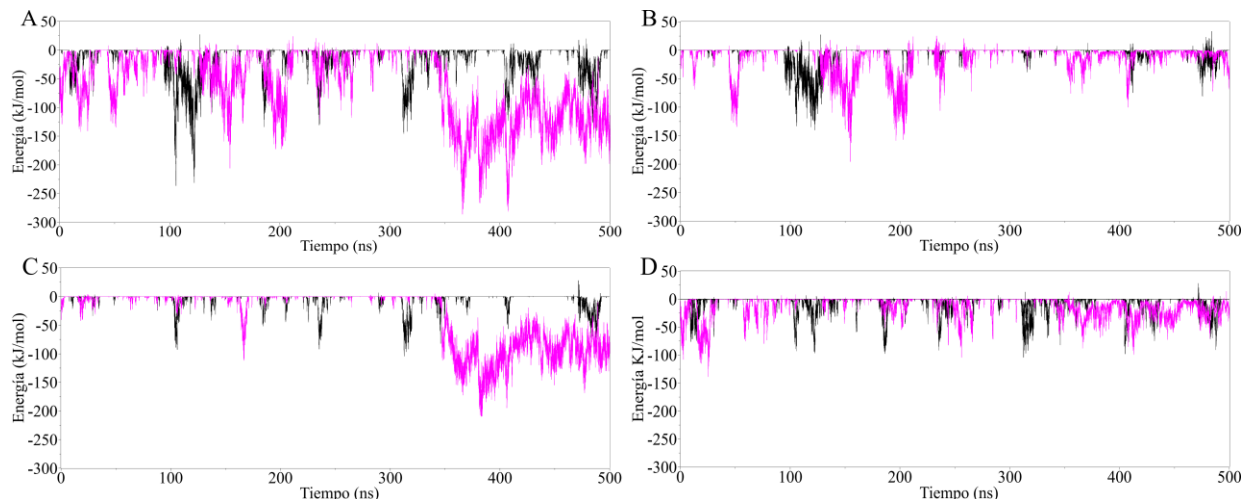
Nota: (A) péptido completo, (B) N-terminal, (C) núcleo amiloidogénico y (D) C-terminal. En negro hIAPP+POPC y en magenta hIAPP+POPC_{OOH}

Por otro lado, la energía de Van Der Waals, demuestran que la interacción del péptido es mayor cuándo la bicapa esta hidroperoxidada (Figura 15A). Para hIAPP+POPC se observa un mínimo de energía de -236 kJ/mol a los 100 ns. Mientras que para hIAPP+POPC_{OOH} el mínimo se observa a los 360 ns de simulación con -285 kJ/mol. Es de observar además que el intervalo temporal de interacción en hIAPP+POPC_{OOH} se extiende de ~ 320 ns hasta los 500 ns.

Al examinar las interacciones de Van der Waals por cada región, es evidente que para la región N-terminal (Figura 15B), de hIAPP+POPC la mayor interacción se da en el intervalo de los 93 ns a 145 ns, observándose un mínimo de -140 kJ/mol a los 120 ns. Por su parte en hIAPP+POPC_{OOH} la interacción más estable ocurre entre los 125 ns y 272 ns, con un mínimo de -192 kJ/mol a los 155 ns de simulación. Para el núcleo amiloidogénico (Figura 15C), la interacción se da fuertemente en los últimos 150 ns de simulación de hIAPP+POPC_{OOH} con un mínimo de -205 kJ/mol, mientras que para hIAPP+POPC la interacción no es estable con un mínimo de -100 kJ/mol a los 300 ns de trayectoria. Finalmente, la región del C-terminal (Figura 15D), la interacción del péptido con la bicapa es inestable a lo largo del tiempo.

Figura 15.

Energía Van der Waals en la Interacción Péptido-Bicapa.



Nota: (A) péptido completo, (B) N-terminal, (C) núcleo amiloidogénico y (D) C-terminal. En negro hIAPP+POPC y en magenta hIAPP+POPC_{OOH}

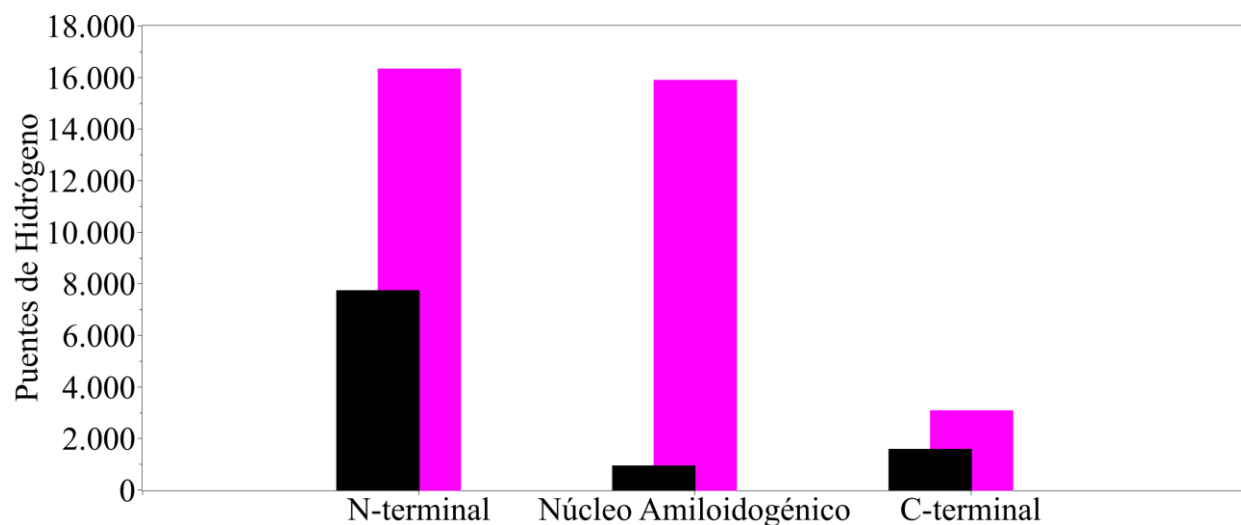
En síntesis, la energía electrostática de interacción péptido-bicapa es más favorable cuando la interacción se da por la región N-terminal de hIAPP, siendo esta más estable en presencia de lípidos hidropoxidados. La energía de interacciones de Van Der Waals es más favorable cuando la interacción se da entre la bicapa y el núcleo amiloidogénico. Así mismo, aunque en hIAPP+POPC_{OOH} la contribución de ambos términos energéticos es evidente, la interacción electrostática es más fuerte. Además, es interesante notar, que la interacción de la región N-terminal en hIAPP se da durante los primeros 250 ns de simulación, mientras que, la interacción del núcleo amiloidogénico con la bicapa ocurre durante los 200 ns finales. Esto demuestra que la interacción temprana del péptido con la membrana ocurre por la región N-terminal y está mediada por la interacción electrostática (Qian, *et al*, 2016), (Guo, *et al*, 2015), (Engel, *et al.*, 2006), (Kotler, *et al*, 2014), (Brender, *et al*, 2008), (Buchanan, *et al*, 2013), (Li *et al.*, 2018). Una vez el péptido es anclado a la bicapa hidropoxidada la interacción del núcleo

amiloidogénico con esta es más lenta y mediada por las interacciones de Van Der Waals, lo que es de esperar dada la naturaleza hidrofóbica de los residuos que conforman esta región.

Finalmente, para analizar la estabilidad de la interacción, se calcularon los puentes de hidrógeno (HBs) formados entre el hIAPP y las bicapas. Este análisis fue realizado por regiones (Figura 16) y por cada uno de los aminoácidos que conforman el péptido (Figura 17). El análisis por regiones muestra que hIAPP+POPC_{OOH} tiende a formar una mayor cantidad de puentes de hidrógeno, resaltando las regiones del N-terminal y el núcleo amiloidogénico. Contrastando con esto, el análisis por residuos muestra, que en hIAPP+POPC_{OOH}, los residuos involucrados mayoritariamente en la formación de los puentes de hidrógeno son la Lys1, Arg11, Asn22, Ala25 y Ser29. Al tiempo que en hIAPP+POPC la mayor formación de estos se da por el residuo Lys1.

Figura 16.

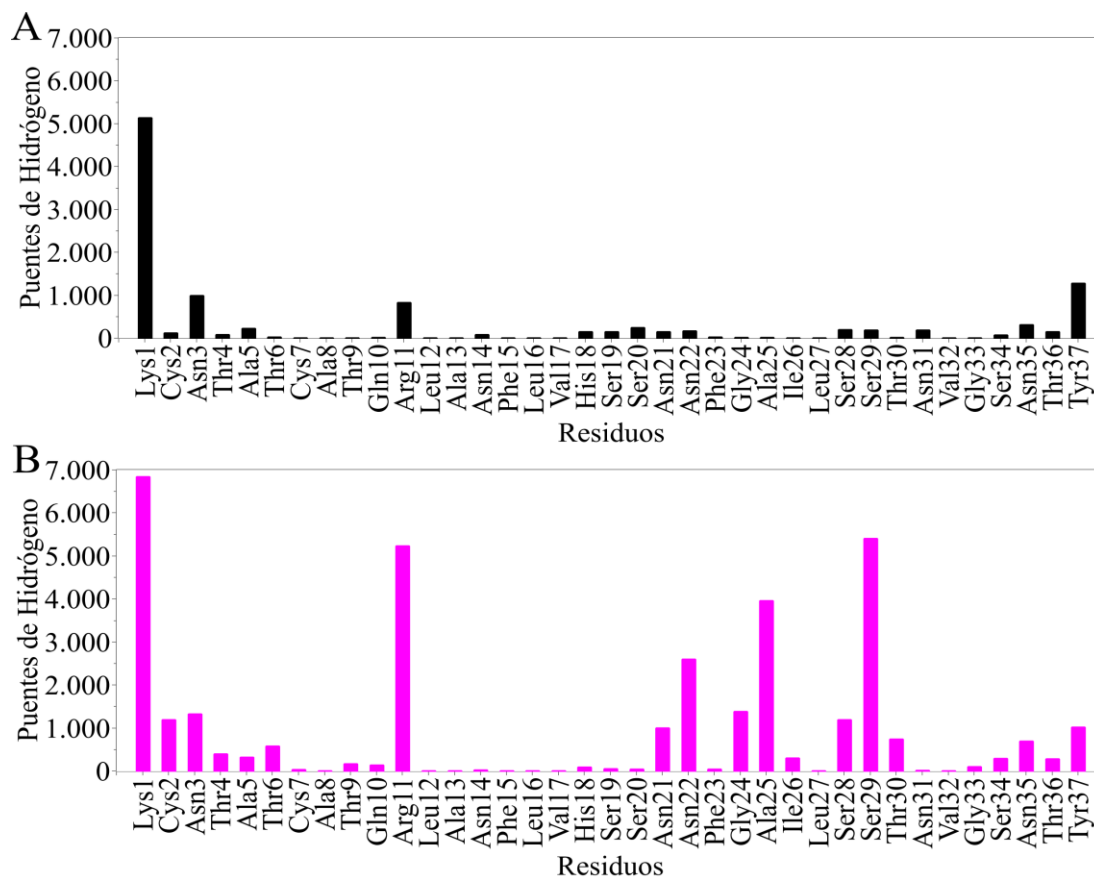
Puentes de Hidrógeno Formado entre las Regiones de hIAPP y las Bicapas.



Nota: Para este cálculo el radio de corte entre el donador-aceptor de HBs fue de 3,5 Å, con un ángulo de 150° para el hidrógeno-donador-aceptor. En negro hIAPP+POPC y en magenta hIAPP+POPC_{OOH}

Figura 17.

Formación de Puentes de Hidrógeno entre Cada Residuo de hIAPP y las Bicapas.



Nota: para este cálculo el radio de corte entre el donador-aceptor de HBs fue de 3,5 Å, con un ángulo de 150° para el hidrógeno-donador-aceptor. En negro hIAPP+POPC y en magenta hIAPP+POPC_{OOH}

Estructura del péptido

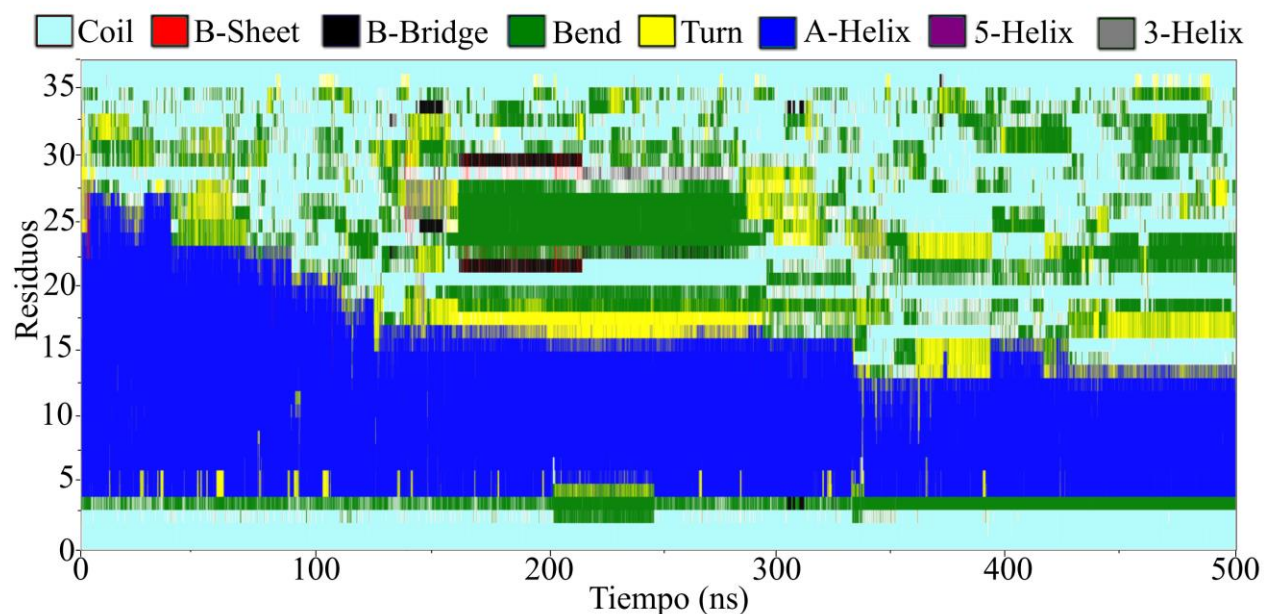
Para evaluar si la interacción de hIAPP con las bicapas lipídicas modifica la estructura peptídica, se ha analizado el contenido de estructura secundaria en hIAPP, mediante el programa DSSP y además del porcentaje de helicidad.

En hIAPP+POPC (Figura 18) se observa que durante los primeros 100 ns de simulación se forma una única hélice conformada por los residuos Ala5 a Phe23, seguido de una pérdida en

el contenido helicoidal que se extiende hasta el final de la trayectoria con tan solo los residuos Ala5 a Ala13 formando la hélice- α .

Figura 18.

Estructura Secundaria de hIAPP al en el Sistema hIAPP+POPC.

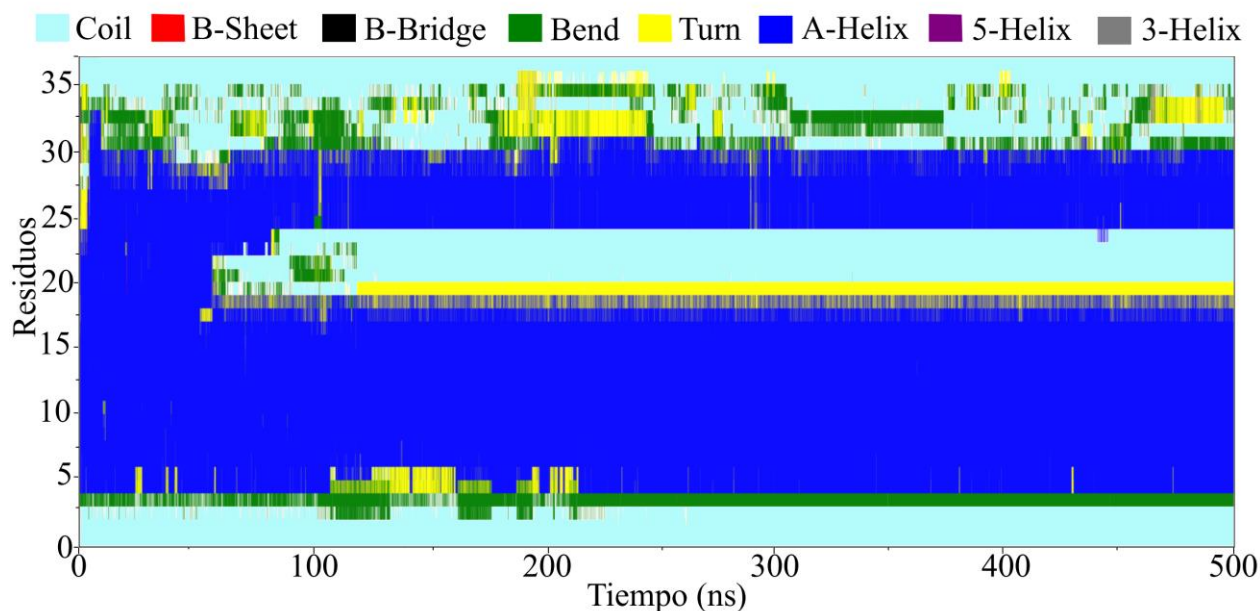


Nota: Definición la estructura secundaria. En color cían: coil, en rojo: hojas- β , en negro: puentes- β , en verde: flexiones, en amarillo: giro, en azul: hélice- α , en morado: hélice-5 y en gris: hélice-3₁₀

Para hIAPP+POPC_{OOH} (Figura 19) se muestra una mayor tendencia a la formación de hélices- α . Durante los primeros 67 ns de simulación se puede observar una única hélice conformada por los residuos de la Ala5 a la Ser29, para posteriormente separarse en dos regiones helicoidales, una más grande que se conforma de la Ala5 a la Ser19, y otra de menor tamaño comprendida por residuos Gly24 a Ser29.

Figura 19.

Estructura Secundaria de hIAPP en el Sistema hIAPP+POPC_{OOH}.



Nota: Definición la estructura secundaria. En color cían: coil, en rojo: hojas- β , en negro: puentes- β , en verde: flexiones, en amarillo: giro, en azul: hélice- α , en morado: hélice-5 y en gris: hélice- 3_{10}

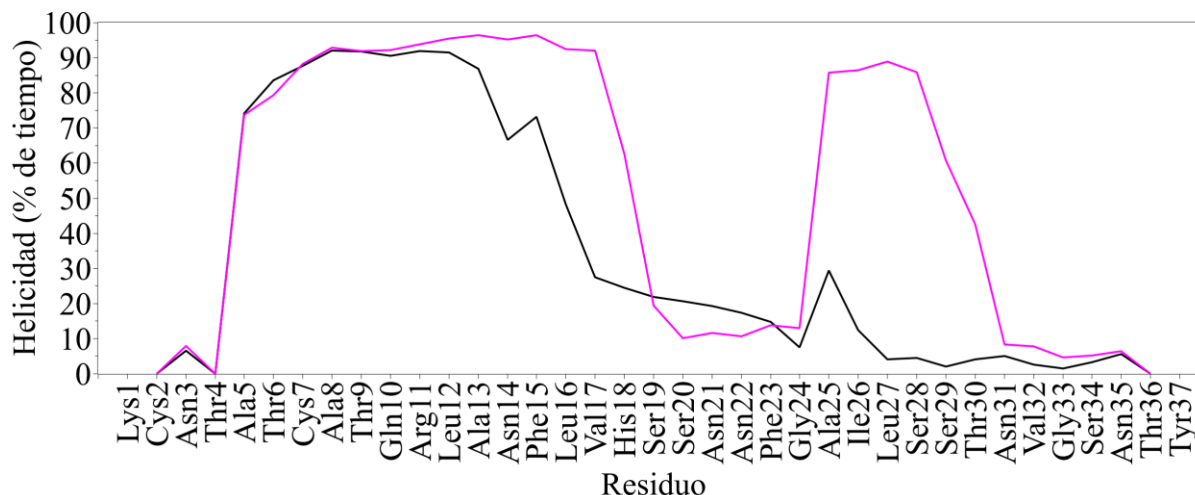
Para contrastar los resultados anteriores, se ha calculado la helicidad de hIAPP (Figura 20) que, dicho de otro modo, es el porcentaje de tiempo en el que cada uno de los aminoácidos en hIAPP forma parte de una hélice- α .

En hIAPP+POPC_{OOH} se evidencian dos regiones de hélices- α , la primera de ellas abarcando de los residuos Ala5 a Ser19, y la segunda de menor tamaño, que se encuentra entre los residuos Gly24 a Asn31. En contraste hIAPP+POPC, presenta una única hélice- α , comprendida entre los residuos Ala5 a Val17.

Estos resultados permiten determinar que hIAPP en contacto con bicapas hidroxidadas estructura su región intrínsecamente desordenada hacia conformaciones en hélice- α .

Figura 20.

Helicidad de hIAPP al Interaccionar con la Bicapas.



Nota: En negro hIAPP+POPC y en magenta hIAPP+POPCOOH.

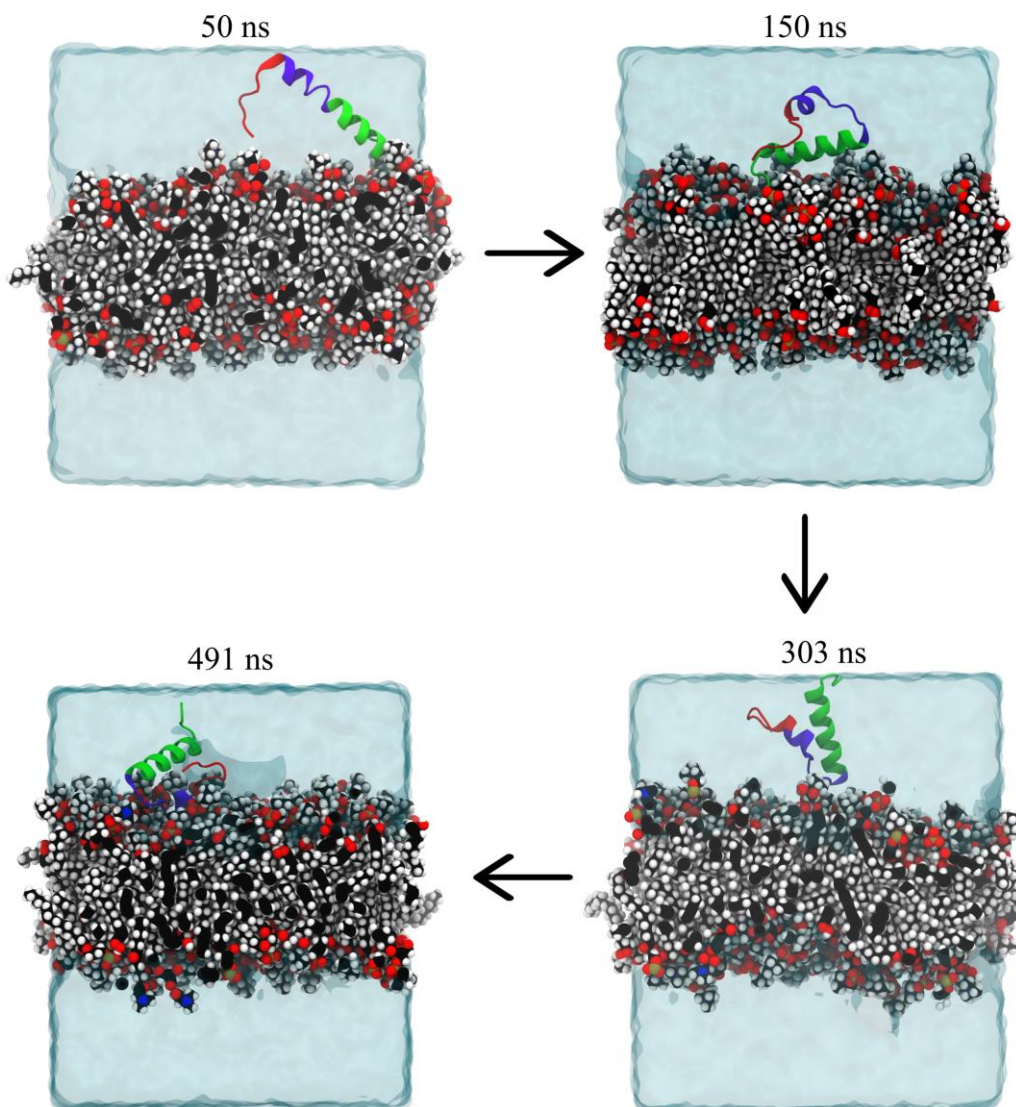
Estudios realizados por Nanga *et al.*, usando NMR, en los cuales evalúan la interacción de IAPP con micelas, han demostrado valores similares a los expuestos en este trabajo. El primero de ellos fue realizado con micelas de DPC (dodecilsfosfolina) integrando rIAPP (Nanga, *et al*, 2009), los resultados indicaron que este péptido adquiere conformaciones helicoidales en tres regiones, la primera entre los residuos Ala5 a Val17; una segunda hélice más corta que corresponde a los residuos Ser20 a Phe23. La última región que abarca los residuos Gly24 a Tyr37 muestra un bucle largo y flexible. Según los autores estos resultados demuestran la predominancia de la hélice en el tramo de los residuos Ala5 a Phe23 que actúan como un núcleo más estable, en comparación con los residuos 24 a 37 que están predominantemente más desordenados.

En otro estudio realizado con hIAPP integrado en micelas de SDS (dodecilsulfato sódico) por Nanga *et al* en 2011, se muestra la existencia de una hélice larga que se corresponde a los residuos Ala5 a Ser28, y una segunda hélice más corta que va de la Ser34 a la Tyr37. Por su

parte los autores muestran que existen dos dominios que forman hélices, el primero que abarca de la Cys7 a la Val17, y el segundo del Asn21 a la Ser28, que se separan por un giro entre la His18 a la Ser20.

Figura 21.

Evolución Temporal de la Interacción de hIAPP con la Bicapa de POPC_{COOH}.



Nota: inicialmente hIAPP interactúa con la bicapa por su región N-terminal. Posteriormente, la región N-terminal incrementa su interacción, permitiendo al núcleo amiloidogénico penetrar en la bicapa.

Conclusión

Al evaluar la interacción existente entre hIAPP y la bicapa hidroperoxidada de POPC, se logró observar que la adición del grupo hidroperóxido (R-OOH) causa una elevación de la cadena alifática hacia la interface bicapa-agua, lo que incrementa el área por lípido y disminuye en el espesor de la bicapa. Además, con la elevación de la cadena alifática los grupos de carga en la superficie de la bicapa incrementan, favoreciendo su interacción con el péptido. Así, en presencia de bicapas de POPC_{OOH}, el péptido inicialmente interacciona de forma electrostática por su región N-terminal, permitiendo que con el paso del tiempo el núcleo amiloidogénico, mediante sus interacciones de Van der Waals, entre en contacto con la bicapa e incremente la formación de puentes de hidrógeno en la región FGAIL. Se evidencia, además, que durante la interacción de hIAPP con bicapas de POPC_{OOH}, el contenido de hélice- α en el péptido incrementa (Figura 21).

Finalmente, los datos expuestos en este trabajo parecen indicar que la hidroperoxidación lipídica podría favorecer la amiloidogénesis en hIAPP, esto hace necesario continuar con estudios sobre la interacción de bicapas oxidadas con dímeros y oligómeros de hIAPP. Por otra parte, los datos presentados en este trabajo solo representan 500 ns de simulación, lo que hace necesario la implementación de tiempos de muestreo mayores y técnicas avanzadas para la mejor comprensión de la energía del sistema.

Agradecimientos y dedicatoria

De manera personal, me gustaría agradecer a mi tutor, el Dr. Ricardo Espinosa por su constante apoyo, confianza y orientación a lo largo del desarrollo del presente trabajo, ya que no solo apporto a mi crecimiento académico, sino también a mi crecimiento personal. Del mismo modo agradecer a la PhD. Martha Flórez por su confianza y orientación. Y en especial me gustaría

dedicar este trabajo a mi familia que me ha apoyado a lo largo de mi vida en todos los aspectos e hicieron posible lograr mi deseo de ser Biólogo.

Referencias

- Abraham, M. J., & Gready, J. E. (2011). Optimization of parameters for molecular dynamics simulation using smooth particle-mesh Ewald in GROMACS 4.5. *Journal of Computational Chemistry*, 32(9), 2031–2040. <https://doi.org/10.1002/jcc.21773>
- Aschner, P. (2010). Epidemiología de la diabetes en Colombia. *Avances en Diabetología*, 26(2), 95–100. [https://doi.org/10.1016/s1134-3230\(10\)62005-4](https://doi.org/10.1016/s1134-3230(10)62005-4)
- Baez, L. (2013). Simulación por dinámica molecular de fosfolípidos usando GROMACS. *Universidad de Sonora*. <http://148.225.114.121/bitstream/unison/1723/1/baezcastilloleonardol.pdf>
- Baler, K., Martin, O. A., Carignano, M. A., Ameer, G. A., Vila, J. A., & Szleifer, I. (2014). Electrostatic Unfolding and Interactions of Albumin Driven by pH Changes: A Molecular Dynamics Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(4), 921–930. <https://doi.org/10.1021/jp409936v>
- Barengo, N. C., Tamayo, D. C., Tono, T., & Tuomilehto, J. (2017). A Colombian diabetes risk score for detecting undiagnosed diabetes and impaired glucose regulation. *Primary Care Diabetes*, 11(1), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.pcd.2016.09.004>
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A., & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8), 3684–3690. <https://doi.org/10.1063/1.448118>

- Berman, H., Kleywegt, G., Nakamura, H., & Markley, J. (2013). How Community Has Shaped the Protein Data Bank. *Structure*, *21*(9), 1485–1491.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2013.07.010>
- Bhattacharya, M., Jain, N., & Mukhopadhyay, S. (2011). Insights into the Mechanism of Aggregation and Fibril Formation from Bovine Serum Albumin. *The Journal of Physical Chemistry B*, *115*(14), 4195–4205. <https://doi.org/10.1021/jp111528c>
- Braun, E., Gilmer, J., Mayes, H. B., Mobley, D. L., Monroe, J. I., Prasad, S., & Zuckerman, D. M. (2019). Best Practices for Foundations in Molecular Simulations [Article v1.0]. *Living Journal of Computational Molecular Science*, *1*(1).
<https://doi.org/10.33011/livecoms.1.1.5957>
- Brender, J. R., Lee, E. L., Cavitt, M. A., Gafni, A., Steel, D. G., & Ramamoorthy, A. (2008). Amyloid Fiber Formation and Membrane Disruption are Separate Processes Localized in Two Distinct Regions of IAPP, the Type-2-Diabetes-Related Peptide. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(20), 6424–6429.
<https://doi.org/10.1021/ja710484d>
- Buchanan, L. E., Dunkelberger, E. B., Tran, H. Q., Cheng, P. N., Chiu, C. C., Cao, P., Raleigh, D. P., de Pablo, J. J., Nowick, J. S., & Zanni, M. T. (2013). Mechanism of IAPP amyloid fibril formation involves an intermediate with a transient β -sheet. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(48), 19285–19290.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1314481110>
- Bueren-Calabuig, J. (2014). Dinámica Molecular. En F. Abascal., F. Abascal., J. Aguirre., E. Andrés-León., D. Bajic., D. Baú., J. A. Bueren-Calabuig., Á. Cortés-Cabrera., I. Dotu., J. M. Fernández., H. G. D. Santos., B. García-Jiménez., R. Guantes., I.

Irisarri., N. Jiménez-Lozano., J. Klett, R. Méndez., A. Morreale., A. Pascual-García., A. Perona., A. Sebastian., M. Stich, S. Tarazona., I. Yruela y R. Zardoya. S. Álvaro., & A. Pascual-García (Eds.), *Bioinformática con Ñ* (1.^aed., Vol. 1, pp. 425–442). CreateSpace.
https://www.researchgate.net/publication/304827617_Bioinformatica_con_N

- Caillon, L., Lequin, O., & Khemtémourian, L. (2013). Evaluation of membrane models and their composition for islet amyloid polypeptide-membrane aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1828(9), 2091–2098.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.014>
- Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 333–366.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>
- De Rosa, R., Spinozzi, F., & Itri, R. (2018). Hydroperoxide and carboxyl groups preferential location in oxidized biomembranes experimentally determined by small angle X-ray scattering: Implications in membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1860(11), 2299–2307.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.011>
- Engel, M. F., Yigittop, H., Elgersma, R. C., Rijkers, D. T., Liskamp, R. M., de Kruijff, B., Höppener, J. W., & Antoinette Killian, J. (2006). Islet Amyloid Polypeptide Inserts into Phospholipid Monolayers as Monomer. *Journal of Molecular Biology*, 356(3), 783–789. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.020>
- Espinosa, Y., Barrera, D., Carlevaro, M., & Llanos, E. (2022). *Structural Properties of Human Islet Amyloid Polypeptide and its Interaction with Lipid Oxidized Bilayers*.

[Manuscrito enviado para publicación]

- Esposito, L., Pedone, C., & Vitagliano, L. (2006). Molecular dynamics analyses of cross- β -spine steric zipper models: β -Sheet twisting and aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(31), 11533–11538.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0602345103>
- *Estadísticas Vitales de Colombia*. (2013). DANE. Estadísticas Vitales.
<https://www.dane.gov.co/index.php/poblacion-y-demografia/nacimientos-y-defunciones/118-demograficas/estadisticas-vitales/2877-defunciones-no-fetales>
- Freifelder, D. (1979). *Técnicas de bioquímica y biología molecular* (1.^a ed.). Editorial Reverté. https://books.google.com.co/books?id=iW0yHGmE-JwC&printsec=frontcover&hl=es&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Gaviria, A., Ruiz, F., Ospina, M., Montaña, J., & Rivillas, J. (2013). *Guía Metodológica Observatorio de Salud Cardiovascular, Diabetes y Enfermedad Crónica Renal OCADER Colombia*. Ministerio de Salud y Protección Social.
https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/GCFI/OERC_AV_001%2022.10.2013%20v1.pdf
- Gorbenko, G. P., & Kinnunen, P. K. (2006). The role of lipid–protein interactions in amyloid-type protein fibril formation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 141(1–2), 72–82.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2006.02.006>
- Green, J., Kreplak, L., Goldsbury, C., Li Blatter, X., Stolz, M., Cooper, G., Seelig, A., Kistler, J., & Aebi, U. (2004). Atomic Force Microscopy Reveals Defects Within Mica Supported Lipid Bilayers Induced by the Amyloidogenic Human Amylin Peptide. *Journal of Molecular Biology*, 342(3), 877–887.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.052>

- Gromacs. (2020). *GROMACS 2020 documentation*. <https://manual.gromacs.org/>.
<https://manual.gromacs.org/documentation/2020/reference-manual/introduction.html#computational-chemistry-and-molecular-modeling>
- Guo, C., Côté, S., Mousseau, N., & Wei, G. (2015). Distinct Helix Propensities and Membrane Interactions of Human and Rat IAPP₁₋₁₉ Monomers in Anionic Lipid Bilayers. *The Journal of Physical Chemistry B*, *119*(8), 3366–3376.
<https://doi.org/10.1021/jp5111357>
- Guo, Y., Baulin, V. A., & Thalmann, F. (2016). Peroxidised phospholipid bilayers: insight from coarse-grained molecular dynamics simulations. *Soft Matter*, *12*(1), 263–271. <https://doi.org/10.1039/c5sm01350j>
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., & Fraaije, J. G. E. M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, *18*(12), 1463–1472. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)
- Heyl, D. L., Osborne, J. M., Pamarthy, S., Samisetti, S., Gray, A. W., Jayaprakash, A., Konda, S., Brown, D. J., Miller, S. R., Eizadkhah, R., & Milletti, M. C. (2010). Liposome Damage and Modeling of Fragments of Human Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) Support a Two-Step Model of Membrane Destruction. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *16*(1), 43–54. <https://doi.org/10.1007/s10989-010-9202-3>
- Holm, N. K., Jespersen, S. K., Thomassen, L. V., Wolff, T. Y., Sehgal, P., Thomsen, L. A., Christiansen, G., Andersen, C. B., Knudsen, A. D., & Otzen, D. E. (2007). Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*

(BBA) - *Proteins and Proteomics*, 1774(9), 1128–1138.

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.06.008>

- Höppener, J. W., Ahrén, B., & Lips, C. J. (2000). Islet Amyloid and Type 2 Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*, 343(6), 411–419.
<https://doi.org/10.1056/nejm200008103430607>
- Huang, J., & MacKerell, A. D. (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry*, 34(25), 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- *Informe mundial sobre la diabetes*. (2016). OMS.
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254649/9789243565255-spa.pdf>
- Isea, R. (2015). The Present-Day Meaning Of The Word Bioinformatics. *Global Journal of Advanced Research*, 2(1), 70–73. <http://gjar.org/publishpaper/vol2issue1/d75r28.pdf>
- Itri, R., Junqueira, H. C., Mertins, O., & Baptista, M. S. (2014). Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids. *Biophysical Reviews*, 6(1), 47–61.
<https://doi.org/10.1007/s12551-013-0128-9>
- Jain, S., & Udgaonkar, J. B. (2008). Evidence for Stepwise Formation of Amyloid Fibrils by the Mouse Prion Protein. *Journal of Molecular Biology*, 382(5), 1228–1241.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.052>

- Jayasinghe, S. A., & Langen, R. (2005). Lipid Membranes Modulate the Structure of Islet Amyloid Polypeptide. *Biochemistry*, *44*(36), 12113–12119.
<https://doi.org/10.1021/bi050840w>
- Jia, Y., Qian, Z., Zhang, Y., & Wei, G. (2013). Adsorption and Orientation of Human Islet Amyloid Polypeptide (hIAPP) Monomer at Anionic Lipid Bilayers: Implications for Membrane-Mediated Aggregation. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(3), 6241–6258. <https://doi.org/10.3390/ijms14036241>
- Jo, S., Kim, T., & Im, W. (2007). Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations. *PLoS ONE*, *2*(9), e880.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000880>
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, *29*(11), 1859–1865.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
- Jójárt, B., & Martinek, T. A. (2007). Performance of the general amber force field in modeling aqueous POPC membrane bilayers. *Journal of Computational Chemistry*, *28*(12), 2051–2058. <https://doi.org/10.1002/jcc.20748>
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, *79*(2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
- Junqueira, H., Schroder, A. P., Thalmann, F., Klymchenko, A., Mély, Y., Baptista, M. S., & Marques, C. M. (2021). Molecular organization in hydroperoxidized POPC bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, *1863*(10), 183659.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183659>

- Jurkiewicz, P., Olżyńska, A., Cwiklik, L., Conte, E., Jungwirth, P., Megli, F. M., & Hof, M. (2012). Biophysics of lipid bilayers containing oxidatively modified phospholipids: Insights from fluorescence and EPR experiments and from MD simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1818(10), 2388–2402.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.020>
- K.J. Kinnunen, P. (2009). Amyloid Formation on Lipid Membrane Surfaces. *The Open Biology Journal*, 2(1), 163–175. <https://doi.org/10.2174/1874196700902010163>
- Kabsch, W., & Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22(12), 2577–2637. <https://doi.org/10.1002/bip.360221211>
- Kegulian, N. C., Sankhagowit, S., Apostolidou, M., Jayasinghe, S. A., Malmstadt, N., Butler, P. C., & Langen, R. (2015). Membrane Curvature-sensing and Curvature-inducing Activity of Islet Amyloid Polypeptide and Its Implications for Membrane Disruption. *Journal of Biological Chemistry*, 290(43), 25782–25793.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m115.659797>
- Khemtémourian, L., Antoinette Killian, J., Höppener, J. W. M., & Engel, M. F. M. (2008). Recent Insights in Islet Amyloid Polypeptide-Induced Membrane Disruption and Its Role in β -Cell Death in Type 2 Diabetes Mellitus. *Experimental Diabetes Research*, 2008, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2008/421287>
- Kinnunen, P. K. J., Domanov, Y. A., Mattila, J. P., & Varis, T. (2015). Formation of lipid/peptide tubules by IAPP and temporin B on supported lipid membranes. *Soft Matter*, 11(47), 9188–9200. <https://doi.org/10.1039/b925228b>

- Kohnke, B., Kutzner, C., & Grubmüller, H. (2020). A GPU-Accelerated Fast Multipole Method for GROMACS: Performance and Accuracy. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 16(11), 6938–6949. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c00744>
- Kotler, S. A., Walsh, P., Brender, J. R., & Ramamoorthy, A. (2014). Differences between amyloid- β aggregation in solution and on the membrane: insights into elucidation of the mechanistic details of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.*, 43(19), 6692–6700. <https://doi.org/10.1039/c3cs60431d>
- Kučerka, N., Tristram-Nagle, S., & Nagle, J. F. (2006). Structure of Fully Hydrated Fluid Phase Lipid Bilayers with Monounsaturated Chains. *Journal of Membrane Biology*, 208(3), 193–202. <https://doi.org/10.1007/s00232-005-7006-8>
- Lemkul, J. (2019). From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0]. *Living Journal of Computational Molecular Science*, 1(1). <https://doi.org/10.33011/livecoms.1.1.5068>
- Li, Y., Wang, X., Ren, L., Cao, X., Ji, C., Xia, F., & Zhang, J. Z. H. (2018). Electrostatic Polarization Effect on Cooperative Aggregation of Full Length Human Islet Amyloid. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58(8), 1587–1595. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00215>
- Liu, N., Duan, M., & Yang, M. (2017). Structural Properties of Human IAPP Dimer in Membrane Environment Studied by All-Atom Molecular Dynamics Simulations. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08504-x>
- Martínez, L., Andrade, R., Birgin, E. G., & Martínez, J. M. (2009). PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 30(13), 2157–2164. <https://doi.org/10.1002/jcc.21224>

- Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, 3(11), e442.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>
- Min, A. Y., Yoo, J. M., Sok, D. E., & Kim, M. R. (2020). Mulberry Fruit Prevents Diabetes and Diabetic Dementia by Regulation of Blood Glucose through Upregulation of Antioxidative Activities and CREB/BDNF Pathway in Alloxan-Induced Diabetic Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–13.
<https://doi.org/10.1155/2020/1298691>
- Nanga, R. P. R., Brender, J. R., Vivekanandan, S., & Ramamoorthy, A. (2011). Structure and membrane orientation of IAPP in its natively amidated form at physiological pH in a membrane environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1808(10), 2337–2342. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.06.012>
- Nanga, R. P. R., Brender, J. R., Xu, J., Hartman, K., Subramanian, V., & Ramamoorthy, A. (2009). Three-Dimensional Structure and Orientation of Rat Islet Amyloid Polypeptide Protein in a Membrane Environment by Solution NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 131(23), 8252–8261.
<https://doi.org/10.1021/ja9010095>
- Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A., Riek, C., Grothe, R., & Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, 435(7043), 773–778. <https://doi.org/10.1038/nature03680>
- O'Brien, T. D., Westermark, P., & Johnson, K. H. (1991). Islet Amyloid Polypeptide and Insulin Secretion From Isolated Perfused Pancreas of Fed, Fasted, Glucose-Treated, and

Dexamethasone-Treated Rats. *Diabetes*, 40(12), 1701–1706.

<https://doi.org/10.2337/diab.40.12.1701>

- Pedersen, J. S., Andersen, C. B., & Otzen, D. E. (2010). Amyloid structure - one but not the same: the many levels of fibrillar polymorphism. *FEBS Journal*, 277(22), 4591–4601. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07888.x>
- Qian, Z., Jia, Y., & Wei, G. (2016). Binding Orientations and Lipid Interactions of Human Amylin at Zwitterionic and Anionic Lipid Bilayers. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/1749196>
- Reddy, A. S., Wang, L., Singh, S., Ling, Y. L., Buchanan, L., Zanni, M. T., Skinner, J. L., & de Pablo, J. J. (2010). Stable and Metastable States of Human Amylin in Solution. *Biophysical Journal*, 99(7), 2208–2216. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.07.014>
- Riske, K. A., Sudbrack, T. P., Archilha, N. L., Uchoa, A. F., Schroder, A. P., Marques, C. M., Baptista, M. S., & Itri, R. (2009). Giant Vesicles under Oxidative Stress Induced by a Membrane-Anchored Photosensitizer. *Biophysical Journal*, 97(5), 1362–1370. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.06.023>
- Roberts, A. N., Leighton, B., Todd, J. A., Cockburn, D., Schofield, P. N., Sutton, R., Holt, S., Boyd, Y., Day, A. J., & Foot, E. A. (1989). Molecular and functional characterization of amylin, a peptide associated with type 2 diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 9662–9666. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.9662>
- Rodriguez, D. C., Tripsianes, K., Buday, K., Franko, A., Göbl, C., Hartlmüller, C., Sarkar, R., Aichler, M., Mettenleiter, G., Schulz, M., Böddrich, A., Erck, C., Martens, H., Walch, A. K., Madl, T., Wanker, E. E., Conrad, M., de Angelis, M. H., & Reif, B. (2017).

The redox environment triggers conformational changes and aggregation of hIAPP in Type II Diabetes. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep44041>

- Scanavachi, G., Coutinho, A., Fedorov, A. A., Prieto, M., Melo, A. M., & Itri, R. (2021). Lipid Hydroperoxide Compromises the Membrane Structure Organization and Softens Bending Rigidity. *Langmuir*, 37(33), 9952–9963. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00830>
- Sciacca, M. F. M., Brender, J. R., Lee, D. K., & Ramamoorthy, A. (2012). Phosphatidylethanolamine Enhances Amyloid Fiber-Dependent Membrane Fragmentation. *Biochemistry*, 51(39), 7676–7684. <https://doi.org/10.1021/bi3009888>
- Sciacca, M., Kotler, S., Brender, J., Chen, J., Lee, D. K., & Ramamoorthy, A. (2012). Two-Step Mechanism of Membrane Disruption by A β through Membrane Fragmentation and Pore Formation. *Biophysical Journal*, 103(4), 702–710. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.06.045>
- Seeliger, J., Weise, K., Opitz, N., & Winter, R. (2012). The Effect of A β on IAPP Aggregation in the Presence of an Isolated β -Cell Membrane. *Journal of Molecular Biology*, 421(2–3), 348–363. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.048>
- Sepúlveda, L. (2007). Estudio de dinámica molecular con solvente implícito de la influencia de la interfase de interacción entre los dominios de la proteína FtsZ en la estabilidad y plegamiento. *Biblioteca digital de la universidad de chile*. https://bibliotecadigital.uchile.cl/discovery/fulldisplay?vid=56UDC_INST:56UDC_INST&search_scope=MyInst_and_CI&docid=alma991005616009703936&lang=es&context=L

- Siani, P., de Souza, R., Dias, L., Itri, R., & Khandelia, H. (2016). An overview of molecular dynamics simulations of oxidized lipid systems, with a comparison of ELBA and MARTINI force fields for coarse grained lipid simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1858(10), 2498–2511.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.031>
- Smith, P. E. S., Brender, J. R., & Ramamoorthy, A. (2009). Induction of Negative Curvature as a Mechanism of Cell Toxicity by Amyloidogenic Peptides: The Case of Islet Amyloid Polypeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 131(12), 4470–4478. <https://doi.org/10.1021/ja809002a>
- Sparr, E., Engel, M. F., Sakharov, D. V., Sprong, M., Jacobs, J., de Kruijff, B., Höppener, J. W., & Antoinette Killian, J. (2004). Islet amyloid polypeptide-induced membrane leakage involves uptake of lipids by forming amyloid fibers. *FEBS Letters*, 577(1–2), 117–120. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.09.075>
- The Emerging Risk Factors Collaboration. (2010). Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *The Lancet*, 375(9733), 2215–2222. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)60484-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)60484-9)
- Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2004). Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1698(2), 131–153.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.12.008>

- Vaiana, S. M., Best, R. B., Yau, W. M., Eaton, W. A., & Hofrichter, J. (2009). Evidence for a Partially Structured State of the Amylin Monomer. *Biophysical Journal*, 97(11), 2948–2957. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.08.041>
- Van der Paal, J., Neyts, E. C., Verlackt, C. C. W., & Bogaerts, A. (2016). Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress. *Chemical Science*, 7(1), 489–498. <https://doi.org/10.1039/c5sc02311d>
- Van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1701–1718. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
- Weber, G., Charitat, T., Baptista, M. S., Uchoa, A. F., Pavani, C., Junqueira, H. C., Guo, Y., Baulin, V. A., Itri, R., Marques, C. M., & Schroder, A. P. (2014). Lipid oxidation induces structural changes in biomimetic membranes. *Soft Matter*, 10(24), 4241. <https://doi.org/10.1039/c3sm52740a>
- Wei, G., Mousseau, N., & Derreumaux, P. (2007). Computational Simulations of the Early Steps of Protein Aggregation. *Prion*, 1(1), 3–8. <https://doi.org/10.4161/pri.1.1.3969>
- Wei, Y., Wei, W., Cheng, J., Qingfen, Y., & Haifeng, C. (2013). Molecular dynamics simulations of amyloid fibrils: an *in silico* approach. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Volume 45, Pages 503–508, (Issue 6). <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt026>
- Williams, T. L., Day, I. J., & Serpell, L. C. (2010). The Effect of Alzheimer's A β Aggregation State on the Permeation of Biomimetic Lipid Vesicles. *Langmuir*, 26(22), 17260–17268. <https://doi.org/10.1021/la101581g>

- Williamson, J. A., & Miranker, A. D. (2007). Direct detection of transient α -helical states in islet amyloid polypeptide. *Protein Science*, 16(1), 110–117.
<https://doi.org/10.1110/ps.062486907>
- Wong-ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I. M., Peter Tieleman, D., & Monticelli, L. (2007). Effect of Lipid Peroxidation on the Properties of Lipid Bilayers: A Molecular Dynamics Study. *Biophysical Journal*, 93(12), 4225–4236.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112565>
- Zhang, X., St. Clair, J. R., London, E., & Raleigh, D. P. (2017). Islet Amyloid Polypeptide Membrane Interactions: Effects of Membrane Composition. *Biochemistry*, 56(2), 376–390. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01016>
- Zhang, Y., Luo, Y., Deng, Y., Mu, Y., & Wei, G. (2012). Lipid Interaction and Membrane Perturbation of Human Islet Amyloid Polypeptide Monomer and Dimer by Molecular Dynamics Simulations. *PLoS ONE*, 7(5), e38191.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038191>