

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Tesina de Grado para optar por el título de Biólogo

**Efecto de la composición de las membranas de insectos y
mamíferos en los mecanismos de acción inespecífica de
insecticidas gabaérgicos.**

Tesista: Asis Rodriguez, Marcos Alberto

Director/a: Dra. Miguel, Virginia

Co-director/a: Dra. Sánchez-Borzzone, Mariela

Firma:

Firma:

Firma:

AÑO 2023

Tesina de Grado para optar por el título de Biólogo




Efecto de la composición de las membranas de insectos y mamíferos en los mecanismos de acción inespecífica de insecticidas gabaérgicos.

Alumno/a: Asis Rodriguez, Marcos Alberto

Director/a: Dra. Miguel, Virginia

Co-director/a: Dra. Sánchez-Borzzone, Mariela

Tribunal Examinador

1. Nombre y Apellido: Mesalo Puetti Firma: 
2. Nombre y Apellido: Anahi Franchi Firma: 
3. Nombre y Apellido: Anahi del Valle Tunis Firma: 
4. Calificación: 10 (Diez)
5. Fecha: 18/5/2023

1. Introducción	4
2. Objetivo	7
2.2 Objetivo General	7
2.3 Objetivos específicos	7
3. Materiales y Métodos	7
3.1 Materiales	7
3.2 Films de Langmuir	8
3.2.1 Isotermas de Presión Superficial (π) en función del Área Molecular Media (MMA).....	8
3.2.2 Penetración de Fluralaner en monocapas de diferentes composición lipídica.	8
3.3 Simulaciones de Dinámica Molecular.....	9
4. Resultados y Discusión	12
4.1 Análisis del efecto del COL y POPE en sistemas binarios de POPC	12
4.1.1. Simulaciones de Dinámica Molecular de bicapas binarias.....	12
4.1.2. Análisis de las propiedades de sistemas binarios en sistemas experimentales de capas monomoleculares	19
4.2 Caracterización de sistemas lipídicos en presencia de Fluralaner	21
4.2.1 Caracterización del efecto del Fluralaner en bicapas mediante SDM.....	21
4.2.2 Caracterización del efecto de fluralaner en sistemas experimentales de capas monomoleculares de sistemas binarios.	29
5. Conclusiones	33
6. Bibliografía	34
7. ANEXO	37

1. Introducción

El desarrollo de nuevos agentes insecticidas ha tomado vital importancia debido a que por un lado, se han agudizado los casos de enfermedades ocasionadas por patógenos virales transmitidos por insectos vectores y a su vez, la vida útil de los insecticidas es muy corta debido a que las drogas eliminan solamente individuos sensibles, favoreciendo la selección de la resistencia a los productos utilizados [1]. Un blanco de acción importante de muchos de los insecticidas que se usan habitualmente (fluralaner y fipronil entre otros) es el receptor del ácido gamma aminobutírico (GABA), el neurotransmisor inhibitorio más importante del sistema nervioso central. El receptor GABA subclase A (R-GABA_A), es un canal de iones cloruro que participa en las transmisiones inhibitorias sinápticas rápidas en el sistema nervioso central (SNC) de vertebrados [2] y en el SNC y periférico de invertebrados [3], [4]. Este receptor, que pertenece a la familia de canales iónicos conocidos como receptores Cys-Loop, es un pentámero que forma el canal de cloruro (Fig. 1A) y posee sitios de reconocimiento para numerosos ligandos específicos de gran importancia clínica y farmacológica como el GABA, benzodiazepinas, barbitúricos, neuroesteroides, etanol, anestésicos, Zn⁺ y agentes antagonistas de acción neurotóxica como los insecticidas gabaérgicos [2], [5]. Existen, a su vez, una gran variedad de compuestos de origen natural capaces de modular la actividad de este receptor.

En invertebrados la gran mayoría de receptores están representados por el homo-pentámero de la subunidad conocida como RDL (Rdlhomo5) (Fig. 1B). Compuestos como el fluralaner, que se comportan como antagonistas no competitivos (NCAs-siglas en inglés), bloquean el flujo de Cl⁻ provocando una hiperexcitación neuronal [3]. Este compuesto pertenece a una tercera generación de antagonistas no competitivos el cual tiene como sitio de unión denominado NCA-II, localizado en los dominios transmembrana, en las regiones de contacto entre distintas subunidades [6] (Fig. 1B).

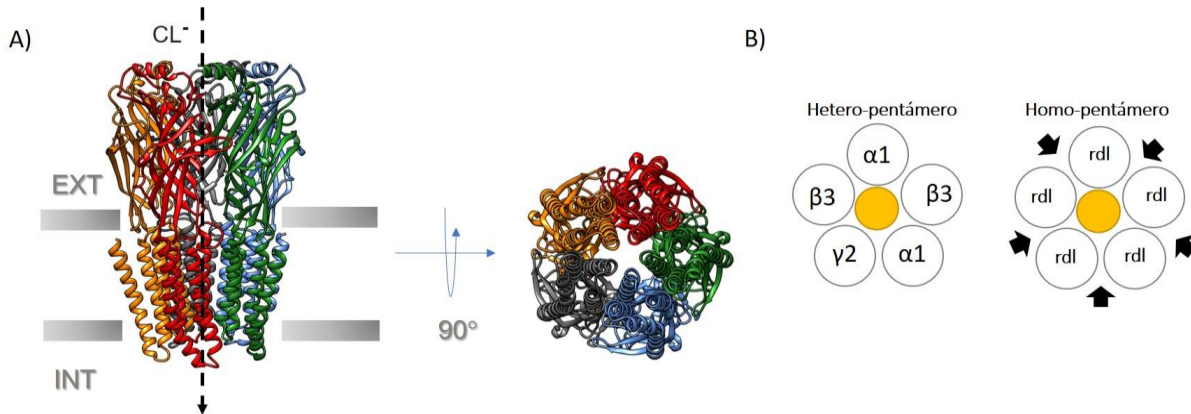


Figura 1. Arquitectura del R-GABA_A. A), R-GABA_A vista en paralelo y superior a la membrana plasmática. Cada subunidad está de un color distinto. EXT: región extracelular; INT: región intracelular. B) Vista superior del poro, donde se muestran las subunidades en vertebrados (α, β, γ y subtipos) e invertebrados. Sitio de unión a NCA-II en invertebrados (indicado con flechas). A su vez se muestra el poro conformado por las 5 subunidades y el cual es el sitio de acción en TMD de los NCA-I (indicado por un círculo naranja).

En este contexto, aunque la actividad farmacológica de receptores conocidos, como el R-GABA_A, puede ser analizada utilizando teorías de interacción ligando-receptor muy bien descritas, se debería considerar que muchos de los compuestos que reconocen específicamente al receptor son además altamente lipofílicos con capacidad de interactuar y modificar las propiedades de su entorno molecular (por ej. benzodiazepinas –BZDs, barbitúricos, alcoholes de cadena larga, fenoles, cetonas y anestésicos que son capaces de modular al R-GABA_A) [7], [8]. También debemos tener en cuenta que la partición del ligando a la membrana está involucrada en las vías de acceso por parte del ligando al sitio activo. Por lo tanto, y dado que el R-GABA_A es una proteína integral de membrana, se espera que su actividad sea modulada

por la organización dinámica de la membrana donde está inserta. Esta última podrá a su vez ser modulada por:

i) Cinéticas de interacción ligando-proteína. Se ha postulado que los ligandos hidrofóbicos, para alcanzar su sitio activo de la proteína funcional, primero deben penetrar dentro la bicapa lipídica, segregarse, mediante una difusión lateral rápida y así luego interactuar con el receptor [9]. Por lo tanto, la dinámica de asociación al receptor está ligada a las características fisicoquímicas del compuesto.

ii) Los cambios en la composición de la membrana que contiene el receptor. Es interesante tener en cuenta que existen diferencias en la composición de la membrana plasmática de vertebrados e invertebrados. Los vertebrados modulan la fluidez de sus membranas modificando el nivel de insaturación de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos y variando la concentración de colesterol (COL) [10]–[12], por lo que la concentración de este esteroles es clave en el comportamiento de estas membranas. Por otro lado, dado que las células de invertebrados no sintetizan esteroides, y los insectos los obtienen de la dieta [10], estas membranas muestran concentraciones mínimas de esteroides como COL cuando se las compara con células de mamíferos, y logran regular la fluidez modificando la relación fosfatidiletanolamina (POPE) fosfatidilcolina (POPC) [10], [11]. Esta variación en la composición de las membranas de vertebrados e invertebrados puede ser altamente relevante cuando se analiza la partición y efecto de compuestos lipofílicos sobre la estructura y dinámica de la misma. Especialmente cuando se ha reportado que la composición de las bicapas lipídicas donde se encuentra inmerso un receptor transmembrana, puede modificar su estructura y por lo tanto su actividad. Por otra parte, se ha reportado que la presencia de POPE es crucial para la eficiente tetramerización y estabilidad de miembros de la familia de receptores pGLIC [13], [14].

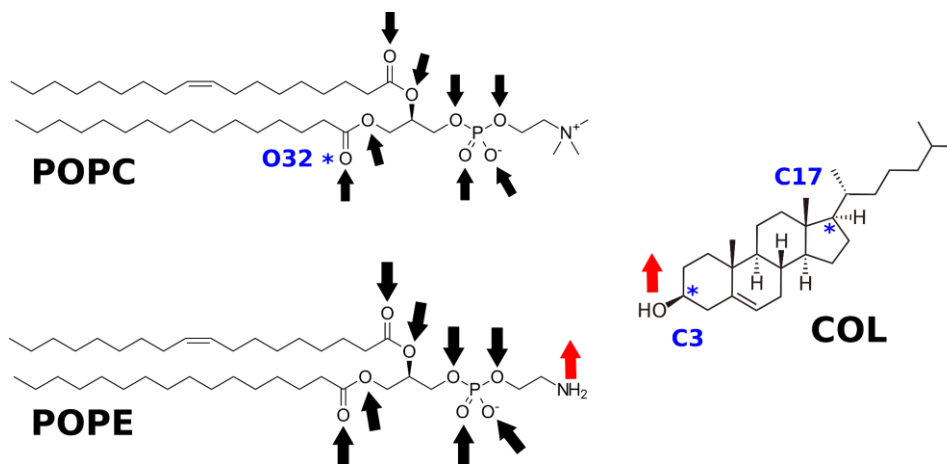


Figura 2. Representación de las estructuras químicas de los fosfolípidos POPC y POPE, y de COL, indicando los donores y aceptores (flecha roja y negra respectivamente) de puentes hidrógeno para cada molécula. A su vez se marca como referencia el oxígeno del carbonilo en POPC y los carbonos C3 y C17 usados en la creación del vector COL.

iii) La partición en la membrana de agentes lipofílicos gabaérgicos. Hay fenómenos de la interacción insecticida-membrana que pueden actuar como moduladores específicos de la organización molecular del entorno del receptor. En nuestro grupo, ya hemos reportado anteriormente la capacidad de diferentes compuestos gabaérgicos de modificar las propiedades mecánicas de las membranas [7], [8], [15], incluyendo agentes insecticidas [16], [17].

Tanto las variaciones en la composición de la membrana, como la partición de compuestos hidrofóbicos, pueden generar cambios en la elasticidad en la misma. Se ha reportado que la función del R-GABA_A puede estar modulada por cambios en dicha elasticidad [18]. Numerosos estudios han demostrado que

el COL es un importante regulador de la función de canales iónicos en general [19], y del R-GABA_A en particular, tanto de manera ligando específica como por modificaciones en las propiedades físicas de la bicapa [20]–[22].

Finalmente, existen evidencias de interacciones diferenciales con distintos compuestos gabaérgicos, dependiendo si el receptor se encuentra dentro o fuera de microdominios de la membrana ricos en COL [23].

Teniendo en cuenta que las membranas son interfases biológicas complejas, el desarrollo de sistemas modelo simplificados que imiten propiedades importantes de las membranas puede permitir la caracterización de los principales parámetros de interacción para algunos procesos. [24]. A su vez, el nivel de simplificación que se utiliza dependerá del tipo de análisis o parámetros que se quiera controlar. Es así que múltiples metodologías han sido utilizadas en el estudio de sistemas modelos para membranas, como pueden ser el uso de GUVs (vesículas unilamelares gigantes) [25], [26] o los films de Langmuir, entre otros. Específicamente estos últimos cuentan con un gran número de antecedentes justificando su empleo [27]–[31].

Para poder evaluar de forma más acertada la influencia de los componentes que integran las membranas biológicas y la forma que interactúan entre sí, enfocarse sobre componentes mayoritarios o de algún interés en particular producirá información valiosa que podría constatarse a posteriori con un sistema natural o enriquecer con más variables el sistema ya estudiado.

Es por esto que, para el enfoque de este trabajo, y teniendo en cuenta la diferencia de composición que presentan en sus membranas los mamíferos y los insectos, se pretende estudiar el efecto del COL o del POPE sobre membranas formadas por POPC utilizando dos sistemas de membranas modelos, bicapas y monocapas. Para el estudio de las primeras utilizaremos ensayos *in silico*, específicamente Simulaciones de Dinámica Molecular (SDM), mientras que para las segundas llevamos adelante ensayos experimentales como son las monocapas de Langmuir.

Las membranas biológicas presentan dos tipos de fases predominantes, fases ordenadas (gel) y fases desordenadas (fluidas) [32]. Estas dos fases pueden ser distinguidas por parámetros como el orden configuracional de las cadenas acílicas, y el orden traslacional, el cual se puede calcular mediante la función de distribución radial en 2D de las cadenas en el plano XY de la membrana. Para el caso de fases desordenadas, ambos parámetros son bajos, mientras que incrementan a medida que se da una transición a una fase ordenada [33]. Las propiedades generales de estas membranas, como el área por lípido y ancho de la membrana, son poco sensibles a las transiciones de fase. Sin embargo, las propiedades estructurales, como los parámetros de orden, son más sensibles, permitiendo una caracterización del estado de condensación de dicha bicapa [34]. Por otro lado, las transiciones de fase de las bicapas de POPE son más difíciles de caracterizar ya que presentan un amplio rango de temperatura, con cambios en las propiedades del sistema más sutiles [34].

Las simulaciones de dinámica molecular son una herramienta muy versátil, con un gran potencial para la obtención de información molecular/estructural de membranas modelos. Por otra parte, el uso de monocapas o films de Langmuir como membranas modelos son una herramienta muy útil para el estudio del comportamiento de capas monomoleculares de lípidos. Esta técnica se ha utilizado ampliamente como modelo de membrana no solo por su homogeneidad, geometría plana y orientación específica, sino también porque los films de Langmuir permiten un análisis termodinámico riguroso y un análisis fisicoquímico de las propiedades de la membrana [35].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, es esperable que la actividad de insecticidas gabaérgicos resulte del efecto combinado de la interacción específica ligando-proteína receptora, como también de las interacciones inespecíficas de dichos ligandos con las moléculas lipídicas que conforman el ambiente supramolecular del receptor. Esto generaría efectos diferenciales sobre la modulación inespecífica, por lo tanto, es de gran interés el estudio de estas variaciones a la hora de desarrollar nuevos compuestos insecticidas gabaérgicos altamente selectivos (alta toxicidad para insectos y baja para mamíferos).

Anteriormente, en nuestro grupo de trabajo han sido utilizadas herramientas bioinformáticas para la caracterización de la modulación específica del RDL de insectos [36].

En el presente proyecto nos proponemos caracterizar la interacción del insecticida gabaérgico canónico NCA-II, fluralaner, con monocapas y bicapas lipídicas de relaciones molares variables de COL, POPC y POPE, con el objetivo de determinar qué tipo de regulaciones inespecíficas pueden estar actuando sobre la bioactividad de dichos compuestos. Para ello, se llevará a cabo SDM y ensayos experimentales para obtener parámetros cinéticos y mecánicos de las membranas de diferente composición, así como ver la variación de dichos parámetros cuando particiona en las mismas un compuesto gabaérgico lipofílico como el fluralaner.

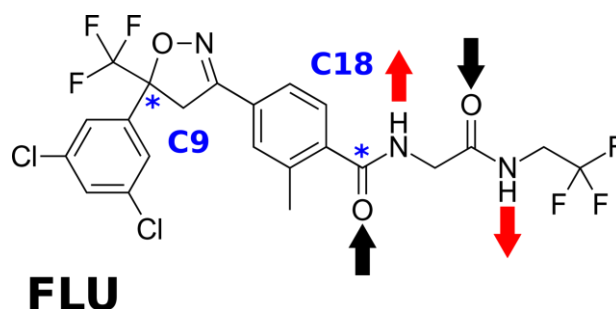


Figura 3. Representación de la estructura química del fluralaner donde pueden observarse los carbonos C9 Y C18, utilizado para formar la formación del vector. Como así también los donores (flechas rojas) y aceptores (flechas negras) de puentes hidrógeno.

2. Objetivo

2.2 Objetivo General

Teniendo en cuenta la diferencia que existe en la composición de las membranas entre vertebrados e invertebrados, y que los compuestos lipofílicos son capaces de modificar sus propiedades, en el presente proyecto se propone estudiar el efecto de un insecticida gabaérgico altamente lipofílico (fluralaner) sobre la dinámica y estructura de membranas modelo de distinta composición. A su vez, nos proponemos estudiar el efecto de la composición de la membrana sobre la cinética de partición en la bicapa. Se espera con estos resultados contribuir a la identificación de mecanismos de modulación inespecíficos que puedan ejercer compuestos como el fluralaner sobre el R-GABA_A, y al desarrollo de insecticidas selectivos (alta toxicidad para insectos y baja para mamíferos).

2.3 Objetivos específicos

- 2.3.a Caracterizar las propiedades estructurales y dinámicas de membranas modelo con relaciones molares variables de POPC, POPE o COL, mediante SDM (*in silico*) de bicapas y films de Langmuir (*in vitro*).
- 2.3.b Analizar la interacción del insecticida fluralaner con las membranas modelos descritas en el objetivo anterior, mediante SDM y films de Langmuir.
- 2.3.c Evaluar el efecto de la concentración de POPE o COL sobre la partición de fluralaner en las membranas modelo, mediante SDM y ensayos de penetración.

3. Materiales y Métodos

3.1 Materiales

Los lípidos 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC), y 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (POPE) fueron obtenidos de Avanti Polar Lipid, Inc. (Alabaster, Alabama). El colesterol (COL) se obtuvo de Sigma-Aldrich (Misuri, E.E. U.U.). Los solventes cloroformo y Metanol, ambos de grado HPLC, fueron obtenidos de Dorwil S.A. (Prov. Buenos Aires, Argentina) y EMSURE (Darmstadt, Alemania), respectivamente.

3.2 Films de Langmuir

3.2.1 Isotermas de Presión Superficial (π) en función del Área Molecular Media (MMA).

Los films de Langmuir realizados corresponden a sistemas puros de POPC y sistemas binarios con distintas proporciones tanto de COL y POPE (9:1, 7:3 y 1:1) disueltos en cloroformo/metanol 2:1 a una concentración total de lípidos de 2 mM. Se construyó una capa monomolecular de anfífilos sobre la superficie de una disolución acuosa (subfase constituida de agua bidestilada y desionizada), mediante el sembrado (deposición en la interfase limpia agua-aire) de pequeñas gotas de la solución clorofórmica de lípidos, en una cuba rectangular de Teflon® de 180 ml (Minitrough II, KSV Instruments Ltd., Finlandia). Posterior a la espera de 5 minutos, permitiendo la evaporación del solvente y la autoorganización de los anfífilos en la interfase, se prosiguió a comprimir isométricamente los films a una tasa constante de 5 ± 1 mm/min mediante dos barreras laterales de movimiento sincrónico. Se registró la presión superficial (π) con una placa de platino utilizando el método de la placa de Wilhelmy [37] en ausencia y presencia de fluralaner en la subfase acuosa. El insecticida, diluido en DMSO, fue introducido previamente en la fase acuosa a una concentración final de 1 μ M (concentración final de DMSO 0,25 %).

El área molecular media (MMA) reportada es el área total de la monocapa dividida por el número total de moléculas de lípidos en la interfase.

Todos los experimentos se efectuaron en una sala cerrada a temperatura controlada (25 ± 1 °C) y repetidos al menos tres veces para asegurar su reproducibilidad. Para cada tratamiento, se muestra una curva representativa. Para analizar de forma más exhaustiva el comportamiento de los films, se obtuvo el módulo de compresibilidad (C_s^{-1}) de cada sistema. El C_s^{-1} representa la recíproca de la compresibilidad. Valores altos y bajos de este parámetro representan una baja y alta elasticidad interfacial, respectivamente. El punto de inicio de la transición de fase de la isoterma y la presión de colapso son identificados como picos en la variación del módulo de compresibilidad en función del área molecular y se obtiene mediante la siguiente ecuación [38]:

$$C_s^{-1} = -MMA_{\pi} \left(\frac{d\pi}{dMMA} \right)_T \quad (1)$$

3.2.2 Penetración de Fluralaner en monocapas de diferente composición lipídica.

Con el propósito de evaluar la capacidad del fluralaner de insertarse en las monocapas, se realizaron ensayos de penetración en las distintas composiciones propuestas. Se utilizó una cuba circular de Teflon® hecha a medida de 9 ml. El método consistió en sembrar sobre la superficie (interfase limpia agua-aire) distintos volúmenes de las mezclas lipídicas con el propósito de formar monocapas con diferentes presiones iniciales (π_i).

Luego de 5-10 minutos que la π_i de los films se estabilice y el solvente se evapore, se inyectó el fluralaner en la subfase de agua bidestilada y desionizada, a una concentración final de 25 μ M. Los experimentos se llevaron a cabo con agitación constante (150-250 rpm). Se registró la π en función del tiempo manteniendo el área constante hasta que la fluctuación de la π fuera menor a 1 mN/m por hora. A partir de los datos obtenidos se calculó el $\Delta\pi$ (diferencia entre π_{final} y π_i), se lo graficó en función de la π_i y se ajustaron los datos a una regresión lineal ($R^2 > 0,9$; $p < 0,0001$). A partir de esta curva, se determinó el

valor de Presión Máxima de Inserción (MIP) (valor de π_i cuando $\Delta\pi=0$), en la cual el fluralaner fue capaz de partitionarse en la monocapa [39].

3.3 Simulaciones de Dinámica Molecular.

La construcción de las membranas se llevó a cabo utilizando el programa CHARMM-GUI [40]. Se construyó un sistema control de POPC puro, mientras que los sistemas binarios seleccionados de POPC-POPE y POPC-COL se realizaron con una concentración relativa de 9:1, 7:3 y 1:1, dando origen a 6 sistemas binarios. Las estructuras iniciales de bicapas lipídicas en las distintas composiciones se construyeron colocando un total de 512 moléculas de lípidos (256 por hemicapa de POPC, POPE y/o COL dependiendo del sistema), en una caja de $\sim 130\text{\AA} \times 130\text{\AA} \times 95\text{\AA}$, con aproximadamente 62 moléculas de H_2O (TIP3p) /lípido y 0,15 M NaCl.

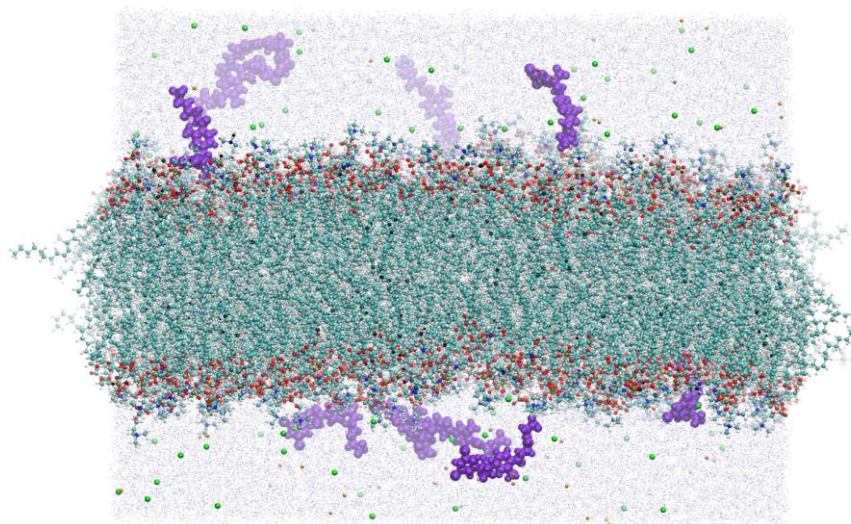


Figura 4. Representación molecular del sistema inicial para un sistema de simulación en presencia de fluralaner. Se puede apreciar la bicapa lipídica con sus grupos químicos (cian: carbonos, rojo: oxígenos, naranja: fósforo, azul nitrógenos, blanco: hidrógenos), las moléculas de fluralaner (violeta) embebidas en los bulk de agua (puntos azules) superior e inferior. También se pueden observar los iones Na^+ (amarillos) y Cl^- (verdes) añadidos para neutralizar el sistema.

Estos sistemas se utilizaron para llevar a cabo Simulaciones de Dinámica Molecular (SDM) de detalle atómica (All Atom, AA), utilizando el campo de fuerza (CF) Stockholm lipids (Slipids) [41] y el paquete de software GROMACS [42].

Para equilibrar los sistemas se llevó a cabo una minimización energética con el algoritmo *steepest descent*, seguida de 6 pasos de equilibrio, los cuales se detallan en la tabla 1. En primer lugar, se llevaron adelante dos simulaciones a concentración, volumen y temperatura constante (ensamble NVT), con restricciones variables sobre el movimiento de los lípidos (Tabla 1) seguido de 5 pasos a concentración, presión y temperatura constante (ensamble NPT), en los cuales se fueron disminuyendo paulatinamente las fuerzas de restricción sobre los lípidos e incrementando el dt de la simulación. Finalmente, se realizó una simulación sin restricciones, en ensamble NPT (Tabla 1). En todos estos pasos se utilizó el algoritmo de Berendsen para baróstato y termostato. Para los ensambles NPT se aplicó una presión semi-isotrópica, (es decir una presión en el plano XY, y otra en el eje Z) de 1 bar. Estos pasos fueron permitiendo de forma paulatina un mayor movimiento de los átomos, siendo estos sometidos a una temperatura de 310 °K (37 °C aprox.). Se utilizó el algoritmo de LINCS (LINEar Constraint Solver) para las restricciones de las longitudes de los enlaces atómicos, a una distancia de corte de 1,2 nm para las interacciones cercanas y el método de grilla de PME (Particle-mesh Ewald) para las interacciones electroestáticas.

Tabla 1. Pasos de equilibrado para generar los sistemas lipídicos obtenidos a partir de CHARMM-GUI.

	Restricciones	N° de pasos (x10 ³)	dt (fs)	Duración (ps)	Ensamble
Minimización	1000	5	-	-	-
Equilibrio 1	1000	125	0.001	125	NVT
Equilibrio 2	400	125	0.001	125	NVT
Equilibrio 3	400	125	0.001	125	NPT
Equilibrio 4	200	250	0.002	500	NPT
Equilibrio 5	40 y 100	250	0.002	500	NPT
Equilibrio 6	-	250	0.002	500	NPT

Para finalizar, se realizaron 600 ns de SDM de producción en ensamble NVT, utilizando un dt 0,002 fs. Se utilizó el algoritmo de LINCS para las restricciones. La temperatura se mantuvo constante a 310 K utilizando el termostato V-rescale. Como baño de presión se utilizó el baróstato Parrinello-Rahman. Las distancias de corte para las interacciones coulómbicas y de Van der Waals se establecieron a un valor de 1,4 nm para corta distancia y de 1,6 nm para las interacciones lejanas.

La construcción del modelo molecular del insecticida se obtuvo anteriormente [39]. Para los sistemas con el insecticida, se tomaron los ensamblados previamente producidos y se insertaron 10 moléculas de fluralaner, 5 en cada hemicapa de la fase acuosa, distribuidas al azar utilizando herramientas del paquete GROMACS. Para remover las moléculas de agua que se solaparon al fluralaner con la inclusión de este último, se recurrió al software VMD [43], con un radio de corte de 3,5 Å de las moléculas objetivo. Luego se prosiguió de igual manera a minimizar, equilibrar y producir el sistema como se describió anteriormente. Para determinar si los sistemas habían logrado alcanzar dicho equilibrio se siguió la evolución de la tensión superficial, la cual evolucionó a cero en todos los sistemas analizados. Esto fue calculado mediante la herramienta *gmx energy* del paquete GROMACS aplicando la siguiente ecuación [44]:

$$\gamma_{MD} = L_z (P_{zz} - 0.5 (P_{xx} + P_{yy})) \quad (2)$$

Donde γ_{MD} es la tensión superficial de la SDM calculada a partir de los componentes laterales y tangenciales de la presión del tensor. L_z es la longitud de la caja de la simulación en el plano Z (perpendicular a las hemicapas), P_{zz} es la presión normal a la hemicapa (componente tangencial), y P_{xx} y P_{yy} son las presiones en paralelo a las hemicapas (componente lateral).

Una vez obtenida la SDM de producción, se determinaron las propiedades estructurales y dinámicas de los sistemas (función de distribución radial, parámetros de orden, orientación de las colas hidrocarbonadas, fluidez de la membrana, etc.) mediante las herramientas de análisis del paquete GROMACS [42].

A excepción de algunos análisis específicos, todos los estudios que se describirán a continuación fueron realizados en todos los sistemas en ausencia y presencia de fluralaner, también en aquellos que recurren a promediar los efectos a lo largo del tiempo se previó de descartar los primeros 150 ns de simulación para darle tiempo al sistema en equilibrarse de forma correcta.

El **Área Molecular Media (MMA)** fue calculada dividiendo el área total de las hemicapas por el número total de lípidos que componen a las mismas, es decir 256, lo que incluye al POPE o al COL en cada sistema respectivamente. Por su parte, el ancho de la membrana se obtuvo midiendo la distancia en el plano Z de los átomos de fósforo entre ambas hemicapas.

Se computó el **Parámetro de Orden (Scd)** para los átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada mediante la herramienta de GROMACS *gmx order* la cual utiliza la ecuación:

$$Scd = \frac{1}{2} \{3\cos^2 \theta_i - 1\} \quad (3)$$

Donde θ_i es el ángulo entre el vector dado por los átomos de carbono del C_{i-1} al C_{i+1} respecto el eje normal de la membrana (eje Z). Mayores valores de Scd denotan un mayor orden de las cadenas hidrocarbonadas, siendo el máximo teórico que las cadenas sean paralelas entre sí. Cabe aclarar que estos resultados son comparables con los datos experimentales previos mediante el análisis de resonancia magnética nuclear de deuterio [45], [46].

Se obtuvieron los **perfiles de densidad** mediante la implementación de la herramienta *gmx density* tanto para los sistemas puros y binarios para determinar la distribución de los diferentes componentes de dichos sistemas, utilizando el centro de la bicapa como referencia. Los grupos funcionales de los fosfolípidos fueron discriminados en las cadenas hidrocarbonadas, los grupos fosfatos, el glicerol éster y los grupos amino (colina para POPC y etanolamina para POPE), mientras que el colesterol y el fluralaner fueron analizados en su totalidad.

La **Función de Distribución Radial (RDF)** es un parámetro que permite obtener información del sistema respecto a su densidad y el estado de fase en el que se encuentra. Describe la probabilidad de encontrar una partícula a determinada distancia respecto a otra partícula de referencia. Este análisis nos da una probabilidad de distribución en el plano de la membrana y la forma de esta distribución nos da idea del estado de orden o estructuración de las moléculas. Por lo tanto, en sistemas cristalinos podemos observar picos regulares con máximos marcados que se corresponden a los sitios de los átomos en la red cristalina. Por otro lado, en un gas ideal las posiciones son totalmente al azar. En el caso de los líquidos, obtenemos un patrón intermedio, es decir de un cristal desordenado. En todas las instancias de análisis que describiremos posteriormente, la distancia de separación o radio de corte (Δr) y Δt se mantuvieron constantes, siendo de 0,01 nm y 1 ns respectivamente.

Para determinar la **orientación** de las moléculas de colesterol y fluralaner en las bicapas, se definieron los siguientes vectores para dichas moléculas: en el caso del colesterol, su vector se definió utilizando los carbonos C3 y C17 (Fig. 2), mientras que el vector del fluralaner fue definido utilizando los carbonos C9 y C18 (Fig.3). La orientación de dichas moléculas se determinó mediante el cálculo del ángulo de orientación que forman estos vectores con el plano perpendicular a Z.

Con el objetivo de examinar el efecto del fluralaner de forma más detallada, se realizó un seguimiento de la **posición relativa** de todas las moléculas de fluralaner en el eje Z, para observar la dinámica de partición a la bicapa.

También fueron contabilizados, el número de **Puentes de Hidrógeno** establecidos entre el insecticida y los componentes de membrana. En las figuras 2 y 3 se puede observar la presencia de grupos dadores y aceptores de puentes de H en todos los componentes del sistema. El criterio establecido para dicho análisis consistió en la presencia de una distancia entre el donador y el aceptor con un valor de corte de 0,35 nm y un ángulo de 135°.

Para obtener las **tasas de flip-flop de COL**, se determinó la posición del grupo hidroxilo para cada molécula de COL a lo largo de la simulación, y se contabilizó como un evento de flip-flop cuando dichos átomos cruzaron una línea de corte establecida a 0.9 nm de profundidad de cada hemicapa. Los datos obtenidos se normalizaron de acuerdo al número de moléculas de COL en cada sistema y se lo expresó en número de eventos por segundo.

Finalmente, el **coeficiente de difusión (Dc)** se calculó obteniendo los desplazamientos medios cuadráticos en gromacs mediante la herramienta "*gmx msd*" (Mean Square Displacement), y obteniendo el ajuste a una ecuación para la región lineal de dicho parámetro.

4. Resultados y Discusión

4.1 Análisis del efecto del COL y POPE en sistemas binarios de POPC

4.1.1. Simulaciones de Dinámica Molecular de bicapas binarias

Antes de realizar cualquier análisis sobre los sistemas, se constató que estos estuvieran en equilibrio, teniendo en cuenta la evolución en el tiempo de la **tensión superficial** que, como es de esperarse para bicapas, converge a cero tanto para los sistemas en ausencia como en presencia de fluralaner (Anexo Fig. 1, 3). A su vez, el **área molecular media** (MMA) y el **ancho de membrana** fueron graficados en función de los incrementos en las relaciones molares de COL o POPE, y se ajustó una función lineal para cada set de datos.

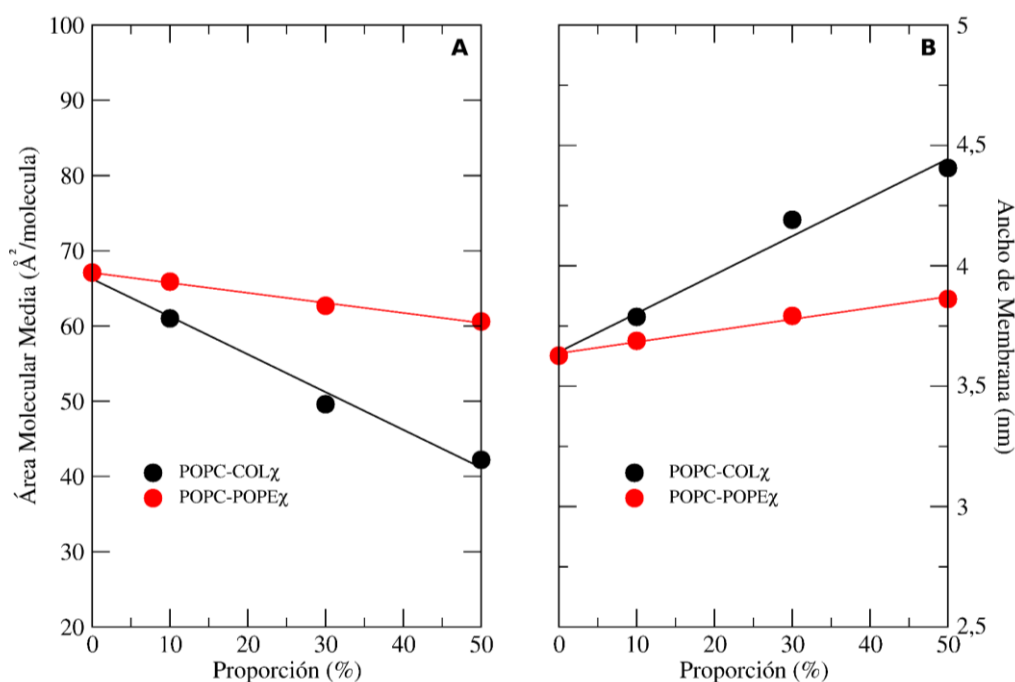


Figura 5. Valores de MMA (A) y Ancho de Membrana (B) en función de la proporción creciente de COL (negro) y POPE (rojo) en **ausencia de fluralaner**. En el caso del MMA, los valores correspondientes al COL se ajustan a una función lineal $f(x)=66,259-0,501x$ mientras que para el POPE esta función es $f(x)=67,076-0,133x$. Para el ancho de membrana los valores de COL y POPE se ajustaron a las curvas $f(x)=3,642+0,016x$ y $f(x)=3,637+0,005x$ respectivamente. Para todos los casos, las regresiones cuentan con valores de R^2 de 0,99.

La recta representa la regresión lineal de la concentración de POPE-COL vs. el MMA o el ancho de membrana. Se puede observar como el área por lípido decrece a medida que se incrementa tanto la concentración de COL como de POPE (Fig. 5). El efecto condensador del COL es claramente más marcado que el efecto de POPE, lo que da un ajuste con una pendiente más marcada. A relaciones 1:1, el COL disminuye el MMA en casi un 40% mientras que el POPE lo hace en apenas un 10%. Esto se puede ver con claridad tanto por la pendiente de la curva de ajuste (Fig. 5), como en imágenes tomadas de las simulaciones que muestra la figura 6.

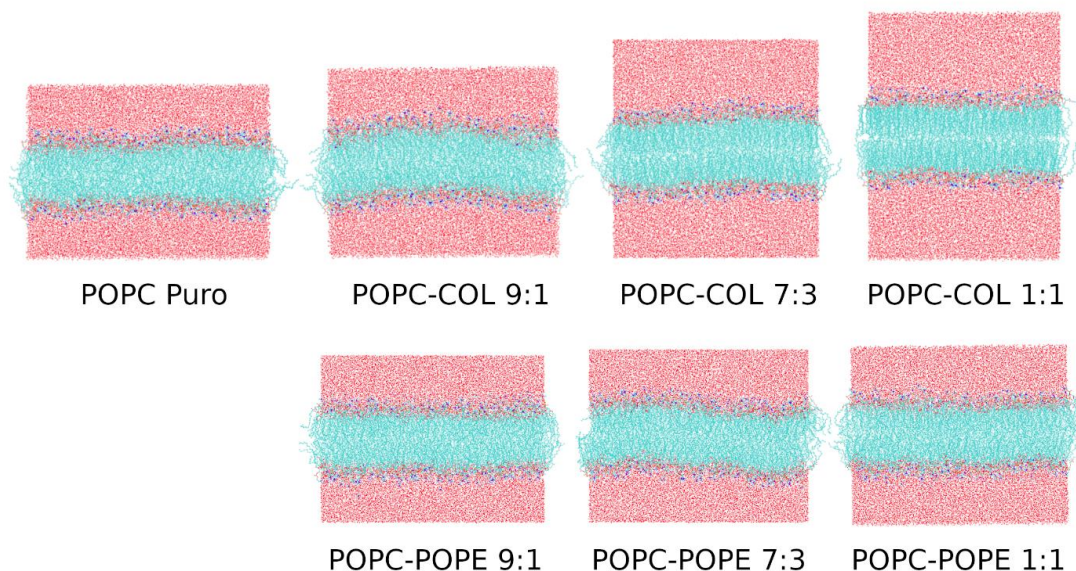


Figura 6. Capturas de las SDM para el sistema de POPC puro y los sistemas binarios de COL y POPE. Se puede apreciar la bicapa lipídica y la fase acuosa con sus grupos químicos (cian: carbonos, rojo: oxígenos, naranja: fósforo, azul nitrógenos, blanco: hidrógenos).

La incorporación a una bicapa de POPC de moléculas tanto de COL como de POPE significa la incorporación de lípidos con un área o región polar de menor volumen, siendo el orden de tamaño de las cabezas polares $PC > PE >> COL$ [47]. Es importante tener en cuenta que el MMA de los diferentes lípidos está principalmente determinado por las cabezas polares, lo que está en concordancia con los datos obtenidos en las simulaciones. Además, la adición de POPE y COL produce un incremento de las interacciones atractivas, en el caso de POPE dadas por un aumento de puentes H en la región polar del PE, mientras que el grupo hidroxilo de la cabeza polar del COL es capaz de interactuar con las cabezas polares de las fosfatidilcolinas [48] y con las cadenas hidrocarbonadas del POPC, haciendo que se orienten de manera perpendicular al plano de la bicapa, incrementando su parámetro de orden y el ancho de la membrana [49]. Así mismo, debemos tener en cuenta ciertos parámetros geométricos que intervienen en la formación de estructuras ordenadas, como la forma molecular, que para el caso de POPC es la de un cono truncado, forma similar a la de POPE, pero complementaria a la de COL, la cual es un cono invertido. Esta última complementariedad favorece la compactación de las bicapas binarias de POPC-COL [50]. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las bicapas de lípidos monoinsaturados han demostrado tener transiciones de fases complejas, para las cuales el MMA no es parámetro suficiente para la descripción del cambio de fase [34].

El **parámetro de orden SCD** es una medida de la orientación y orden de las cadenas lipídicas. Se determinó el SCD de las cadenas acílicas de POPC en bicapas puras y binarias con diferentes concentraciones de POPE o COL (Fig. 7). Debido a que en los lípidos monoinsaturados estas cadenas son diferentes, el parámetro de orden se midió de manera separada para las cadenas Sn-1 y Sn-2. Este parámetro se espera que se incremente de manera significativa en una transición de fase líquido cristalino a fase gel. Este salto es claramente observado en los valores de SCD de las bicapas binarias con 30% de COL, no así en las mezclas binarias de POPE (Fig. 7).

Trabajos previos de SDM han mostrado que la incorporación de COL a bicapas, incrementa el orden de las cadenas especialmente en la región de los carbonos del 4 al 10, región donde los átomos de carbono de la cadena se enfrentan al anillo de COL [51]. En nuestros resultados pudimos observar un comportamiento similar en los parámetros SCD en los sistemas con COL (Fig. 7 A y B).

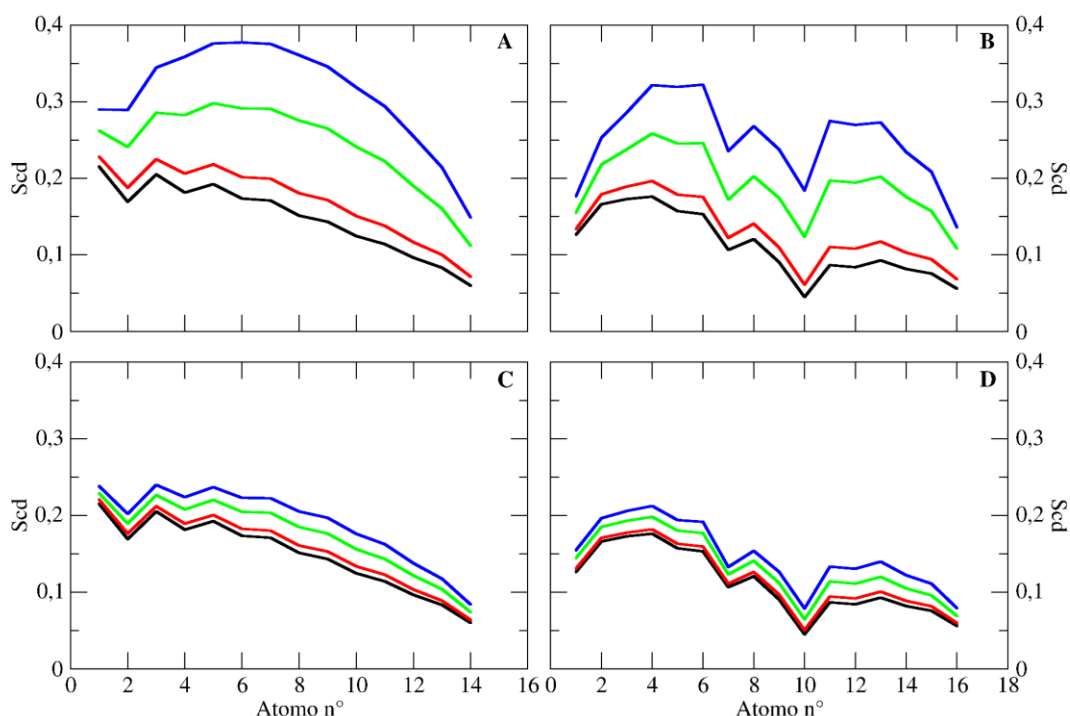


Figura 7. Análisis de los parámetros de orden del deuterio (S_{cd}) para las cadenas acílicas de los fosfolípidos Sn-1 (A y C) y Sn-2 (D y B). Se observan los efectos de los sistemas con COL (A y B) y POPE (C y D). POPC (negro), POPC-COL y POPC-POPE 9:1 (rojo), POPC-COL y POPC-POPE 7:3 (verde) y POPC-COL y POPC-POPE 1:1 (azul).

Además, se determinaron los **perfiles de densidad** para todos los grupos químicos del POPC y el POPE, como para la molécula de COL, de los sistemas puros y binarios, para determinar la distribución de los diferentes componentes del sistema (Fig. 8). Se puede observar en los perfiles de densidad que en el sistema POPC-COL 9:1 hay una distribución homogénea del COL tanto en el centro de la bicapa como en ambas hemicapas (Fig. 8 B-D). Sin embargo, esta distribución se ve modificada a partir de la adición de 30% de COL, desplazándose hacia ambas hemicapas, lo cual queda claramente marcado con la adición de 50% COL (Fig. 8 B-D). Como se esperaba, los resultados mostraron que, en las fases desordenadas de las bicapas binarias, las moléculas de COL se encuentran preferentemente en la región media de la bicapa, desplazándose hacia las regiones polares de las hemicapas en las fases ordenadas [33]. Por otra parte, pudimos observar en las mezclas binarias de POPC-POPE, que las cabezas polares del POPE se distribuyen ligeramente más profundo en la hemicapa. Esto puede deberse a las diferencias de tamaños entre los grupos colina y etanolamina. También puede observarse que las cadenas carbonadas del POPE tienden a distribuirse de forma más homogénea en el centro de la bicapa. (Fig. 8 E-G).

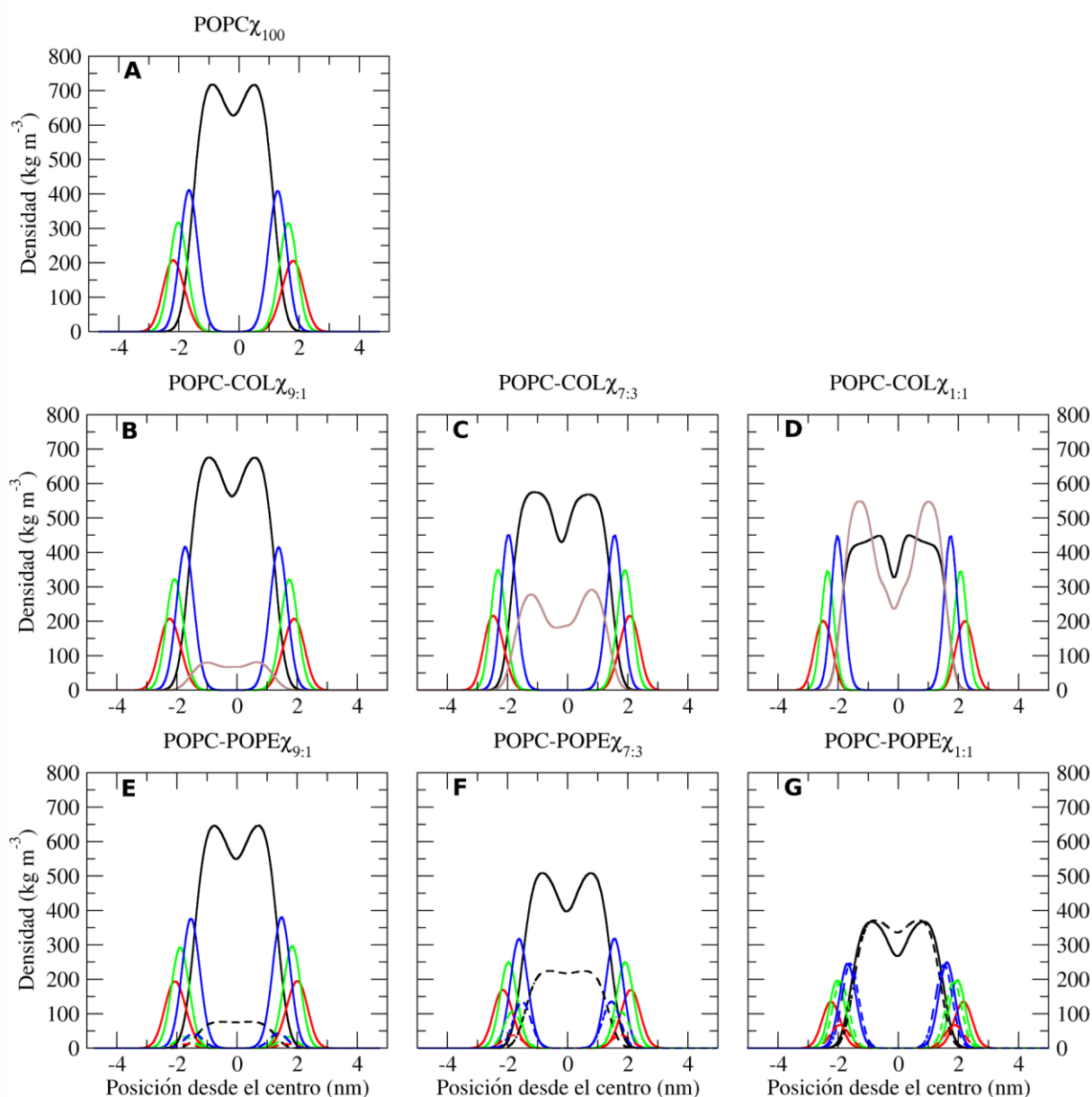


Figura 8. Análisis de los perfiles de densidad en función del eje z para los sistemas binarios. Se descompusieron los principales grupos funcionales en cadenas acílicas (negro), glicerol (azul), grupo fosfato (verde) y grupo amino (rojo) para el sistema control (A) y los sistemas con diferentes proporciones de colesterol (marrón) (B-D) y POPE (E-G). Las líneas enteras denotan a los grupos químicos del POPC mientras que las líneas punteadas al POPE.

Experimentalmente las bicapas puras de POPC y POPE a 37°C se encuentran en una fase líquida desordenada [52], [53], por lo cual se espera que la densidad de las cadenas hidrocarbonadas tenga una distribución homogénea. En la figura 8 se puede observar que, efectivamente hay una distribución homogénea presente en la bicapa pura de POPC y que se mantiene para todos los sistemas analizados, excepto en las relaciones molares 7:3 y 1:1 con COL. Para los sistemas binarios con POPE no se observan estos cambios, ni siquiera a relaciones molares 1:1. Esto estaría indicando que hay un cambio de fase para las mezclas con COL, pero no así para las bicapas binarias con POPE. La adición de 30% de colesterol se sabe que promueve la formación de fases líquido-ordenadas [48]. En las simulaciones de detalle atómico realizadas por nosotros pudimos concluir para las mezclas binarias tanto de COL 7:3 como 1:1, que estas se encuentran en una fase líquido ordenada. Finalmente, no se observaron mayores diferencias entre los mismos grupos químicos (fosfato, colina y glicerol) de POPC y POPE, excepto para las cadenas acílicas, donde se observa una densidad más homogénea en el centro de las bicapas para el POPE. Una posible causa para ello podría ser que esté ocurriendo una interdigitación de los ácidos

grasos entre las hemicapas, aunque se sabe que los componentes de membrana que contienen PE tienen poca tendencia a formar interdigitaciones de forma espontánea, incluso en presencia de alcoholes o bajo diferentes presiones (metodologías usadas en la inducción de interdigitación) [54]. Pero al tratarse de un sistema binario cuyo componente complementario contiene PC, el cual sí presenta casos de interdigitación espontánea y teniendo en cuenta que las cadenas de palmitoil y oleoil no poseen el mismo largo, podría estar ocurriendo interdigitación parcial entre las hemicapas [55] y a medida que aumenta la concentración de POPE, dicho efecto disminuye. Tanto las observaciones de los perfiles de densidad de las cadenas acíclicas de POPE (Fig. 8 E-G) como inspecciones visuales de las simulaciones sustentan esta explicación. Con el fin de complementar los análisis de MMA, SCD, densidades parciales y el comportamiento del ancho de membrana en función del tiempo; realizamos **análisis de RDF** del átomo de fósforo que compone a la molécula de POPC respecto a sí misma (Fig. 9A, D). Se puede observar que tanto las composiciones de COL 9:1 y 7:3 se comportan similar al sistema de POPC puro, a excepción del sistema POPC-COL 1:1 (Fig. 9A). En el caso de las mezclas binarias con POPE, se calcularon los RDF tomando como referencia los átomos de fósforo de POPC respecto a los del POPE (Fig. 9 E). Para determinar el orden traslacional de las moléculas de POPC respecto a las de COL, se midió el RFD entre los oxígenos del carbonilo del POPC y el oxígeno del hidroxilo del COL (Fig. 9B). Se ha descrito que el hidroxilo del COL está involucrado en la formación de puentes H con los grupos carbonilos de las fosfatidilcolinas [56] y que existe una preferencia de este enlace por sobre los puentes H que puede formar con el fosfato, a concentraciones menores al 50% de COL [57]. A esto podría deberse la regularidad observada en la interacción entre estos dos componentes a todas las concentraciones analizadas de COL (Fig. 9B).

En la figura 9C podemos observar, para los pares de O-O del COL a distancias mayores de 1 nm, la presencia de 2 a 3 picos bien definidos en los sistemas 7:3 y 1:1. Esto ha sido observado previamente por otros autores en SDM de bicapas binarias de DOPC-COL y DPPC-COL [58], lo que indicaría el ordenamiento del COL en el sistema, cosa que no se observa tan claramente en el sistema con POPE.

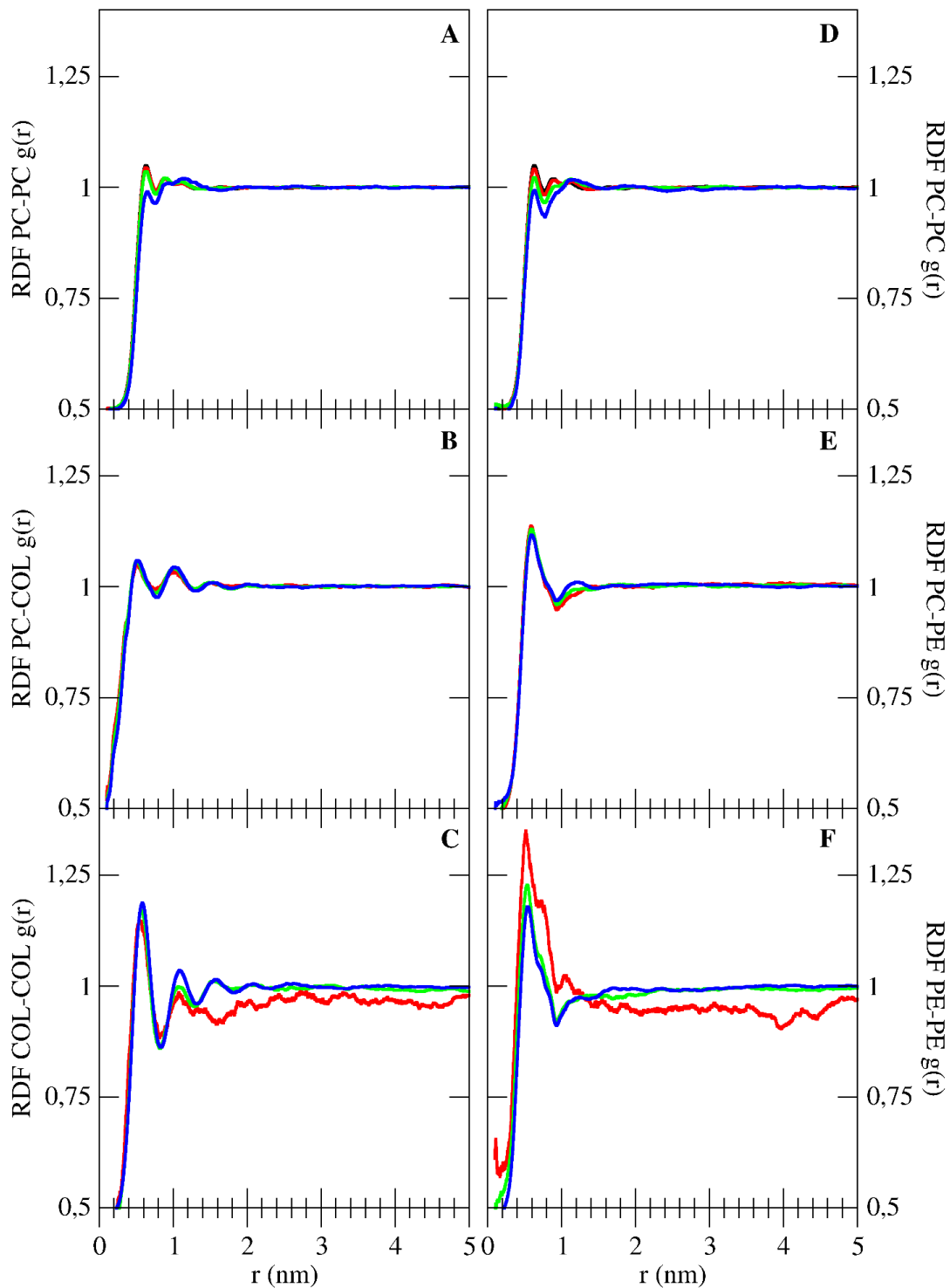


Figura 9. Análisis de la función de distribución radial (RDF) de distintos componentes de los sistemas de COL (A a C) y POPE (D a F). Entre los átomos de fósforo (P) de las moléculas de POPC (A y D). Entre el oxígeno 32 (O32) del carbonilo del POPC y el OH del COL (B), entre los P del POPC respecto a los del POPE (E). Y finalmente entre los OH del COL y los P del POPE (C y F). POPC (negro), POPC-COL y POPC-POPE 9:1 (rojo), POPC-COL y POPC-POPE 7:3 (verde) y POPC-COL y POPC-POPE 1:1 (azul).

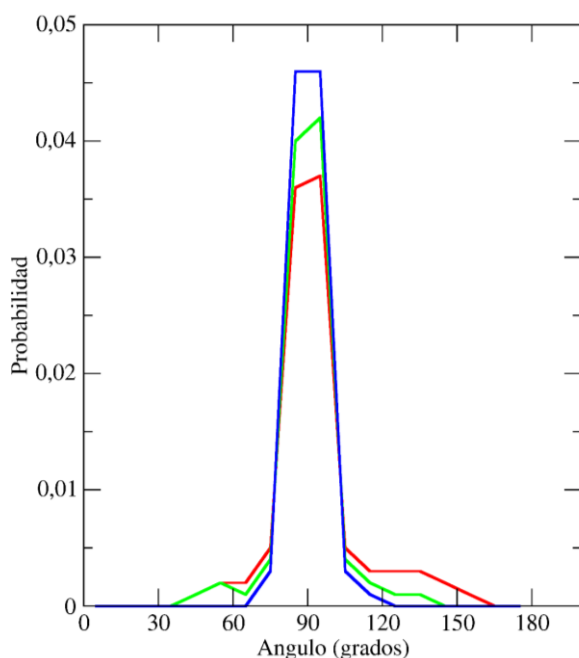


Figura 10. Análisis de la orientación del vector colesterol y el ángulo que forma en relación al plano perpendicular a Z. Están representados los sistemas POPC-COL 9:1 (rojo), POPC-COL 7:3 (verde) y POPC-COL 1:1 (azul).

Las moléculas de colesterol varían su orientación de acuerdo al estado de condensación de la bicapa en la que se encuentran. Con la herramienta “*gmx gangle*” se calculó el ángulo que se forma entre el plano perpendicular al eje Z y el vector construido entre los carbonos C3 y C17, en los extremos de los anillos del COL (Fig. 2). A medida que la proporción de COL aumenta, la probabilidad de encontrar moléculas a 90° es mayor, por lo que podemos inferir que ocurre un ordenamiento de la membrana forzando que el COL adopte una posición que favorece un empaquetamiento con mayor densidad (Fig. 10). Teniendo en cuenta que las moléculas de COL en el centro de la bicapa (fases desordenadas) están orientadas al azar en relación a la normal de la membrana [33], este análisis también sustenta un cambio de fase, por lo menos para el sistema de POPC-COL 1:1.

Teniendo en cuenta los parámetros mencionados además de los físicos analizados para las bicapas, a concentraciones variables de COL, podemos concluir que existe una transición en las bicapas desde un estado desordenado (fluido) a un estado ordenado (fase gel) a partir de la adición de 30% de COL a las bicapas de POPC. Si bien se observa un incremento en el orden de las bicapas binarias de POPC-POPE, no se observa una transición clara que esté indicando una transición de estado. Cabe destacar que el efecto condensador del COL permite la formación de monocapas de Langmuir en fase ordenada a partir de relaciones molares mayores al 30% (Fig. 11) [48].

Para caracterizar las interacciones locales que existen entre las moléculas y que pueden estar generando las modificaciones de las propiedades físicas de bicapas mixtas, analizamos la evolución de la formación de puentes de H en bicapas binarias (Tabla 2). Cuando en las bicapas binarias las moléculas de POPC son reemplazadas por moléculas de POPE, las cabezas polares de POPE son capaces de formar puentes de H tanto entre sí mismas como con POPC [47], también esto ocurre cuando adicionamos COL, el cual tiene un grupo OH capaz de formar puentes de H con el POPC. Si bien la posibilidad existe, antecedentes bibliográficos muestran que el PC comparado a otros grupos polares entre los glicerosfosfolípidos es el que menor afinidad demuestra a la hora de formar puentes H con COL [59]. Se calcularon puentes de H formados entre POPC-COL, POPC-POPE y POPE-POPE y la suma de ambos en cada sistema, normalizado por moléculas de POPE o COL. Como es de esperarse, a medida que se incrementa la proporción de COL o POPE, se ve un incremento en los puentes de H totales que forman los distintos componentes de la bicapa entre sí (Tabla 2, Anexo Fig. 2). Sin embargo, en el caso de los sistemas de POPC-POPE, observamos un número de enlaces al menos cuatro veces mayor, lo cual es consistente

con la presencia tanto de grupos dadores como aceptores de puentes de H (Fig. 2). Por otro lado, se observa una tendencia a favorecer los enlaces entre moléculas de POPE con respecto a POPC-POPE, a medida que aumenta la relación molar de esta molécula.

Tabla 2. Valores de enlaces puentes H totales promediados a lo largo de la simulación y normalizados de los sistemas binarios en las proporciones 9:1, 7:3 y 1:1 (rojo, verde y azul) para POPC-COL, POPC-POPE y POP-POPE.

- FLU	POPC-COL	COL-COL	TOTAL	POPC-POPE	POPE-POPE	TOTAL
9:1	17,36	0,04	17,4	57,65	11,88	69,53
normalizado	0,33	≈ 0	0,33	1,11	0,23	1,34
7:3	48,33	0,11	48,44	128,38	75,64	204,02
normalizado	0,31	≈ 0	0,31	0,83	0,49	1,32
1:1	68,86	0,03	68,89	144,80	182,62	327,42
normalizado	0,27	≈ 0	0,27	0,57	0,71	1,28

4.1.2. Análisis de las propiedades de sistemas binarios en sistemas experimentales de capas monomoleculares

El potencial del uso de capas monomoleculares como sistemas modelos para el estudio de las propiedades mecánicas y fisicoquímicas, se basa en que estos sistemas permiten el control preciso y monitoreado del empaquetamiento y comprensión de los lípidos en la interfase agua-aire. Al poder caracterizar las interacciones de los componentes que forman los films, mediante mediciones de presión superficial en función del área, se obtiene gran flexibilidad en el diseño en cuestión de la composición de los sistemas modelos, interacciones de moléculas de interés sobre los mismos, e incluso estudios de membranas naturales [60], [61].

Con el objetivo de caracterizar las monocapas formadas con distinta composición de lípidos, se evaluó el efecto de la presencia de COL y POPE sobre las monocapas formadas por POPC.

Los resultados obtenidos a partir de las isotermas de compresión de POPC (Fig. 11A y 12A) mostraron que a medida que el área por lípido va disminuyendo, la presión superficial aumenta. El POPC durante toda la compresión presenta un estado líquido expandido con una presión de colapso de 35,6 mN/m a un área de 53,6 Å². Estos resultados son consistentes con los encontrados en bibliografía [62]–[64].

La presencia de distintas relaciones molares crecientes de COL mostró un desplazamiento significativo de la curva hacia valores menores de área y con una pendiente mayor.

La adición de incluso una cantidad muy pequeña de COL produce una disminución en el área donde la presión se hace distinta de 0 (take-off). El COL interactúa fuertemente con la fase líquida expandida (LE) del POPC, retrasando la formación del film y haciendo que la fase gaseosa desaparezca en áreas mucho más bajas por molécula [61]. Si bien la presencia de COL produce films más condensados, en la figura 11 puede observarse que este efecto es más marcado cuando el COL supera una relación molar del 30% de la mezcla, mostrando un salto cualitativo en el orden de las cadenas de los lípidos demostrado en los ensayos in sílico (Fig. 7). Este efecto condensador y ordenador del COL podría sugerir que el COL produce un cambio de fase, de LE a LC (líquido condensado), cuando se supera una relación molar 7:3 en la mezcla [48].

Sin embargo, las presiones de colapso no se ven significativamente afectadas con las distintas mezclas binarias (Tabla 6), lo que sugiere que la presencia de COL no produce cambios en la estabilidad de los

films, pero se observa una disminución en la elasticidad de la membrana, como puede verse reflejada en los valores mayores de los módulos de compresibilidad (C_s^{-1}) (Fig. 11B).

Estos resultados son consistentes con los calculados en las SDM, donde se observa una disminución del área molecular media y un consecuente aumento del grosor de la membrana producido por el aumento de COL (Fig. 5).

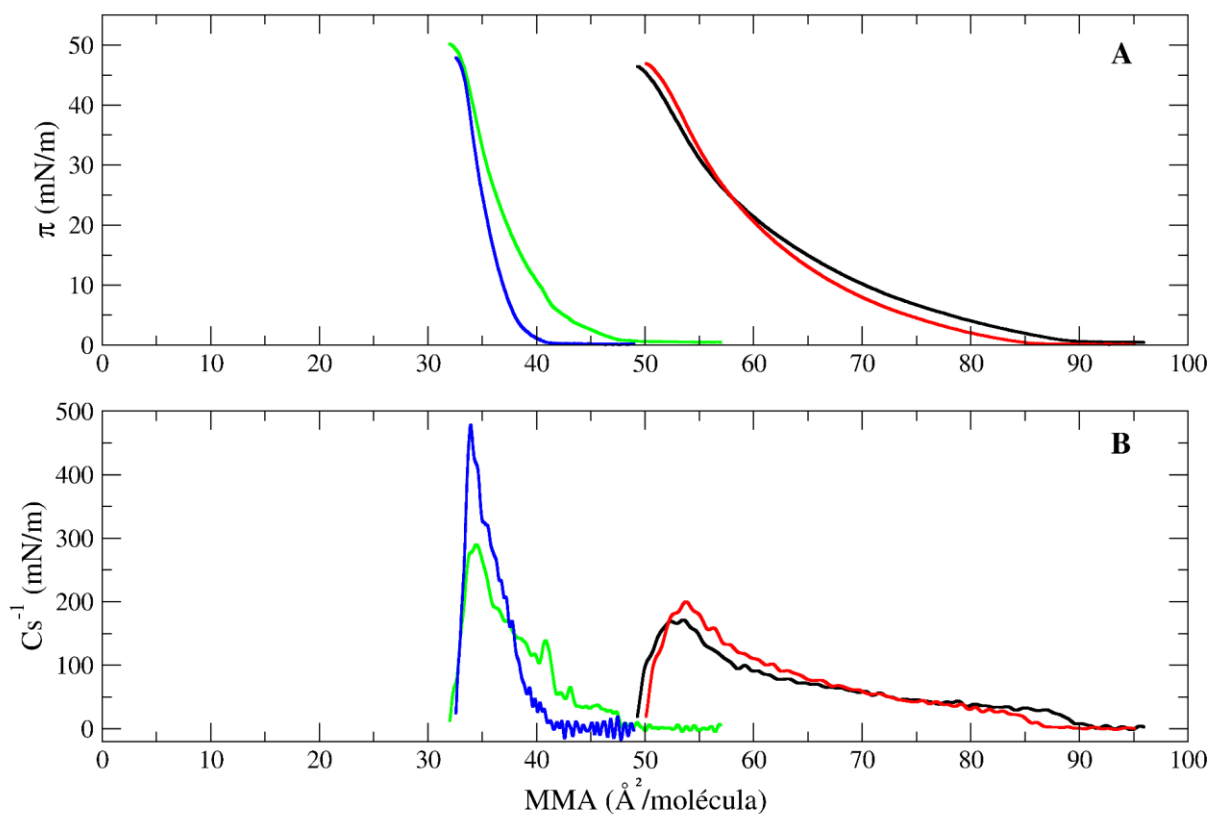


Figura 11. Efecto del COL en las isothermas de compresión de POPC. (A) Presión superficial (π) vs. área molecular media (MMA). (B) Módulo de compresibilidad (C_s^{-1}). POPC puro (negro), POPC-COL con distintas proporciones: 9:1 (rojo), 7:3 (verde) y 1:1 (azul).

Por otra parte, la presencia de POPE en la isoterma de compresión de POPC no produjo cambios significativos con respecto a la de POPC puro (Fig. 12). A pesar de que las mezclas se muestran desplazadas levemente hacia la derecha, presentando valores mayores de take-off, no se observaron cambios en los resultados obtenidos de presión y área de colapso (Tabla 6). A diferencia del COL, la presencia de POPE en las mezclas no produce un cambio de fase en los lípidos. Estos resultados se correlacionan con lo obtenido por simulación, en donde los cambios observados en las membranas de POPC en presencia de POPE fueron de menor magnitud que los observados para COL (Fig. 5-7).

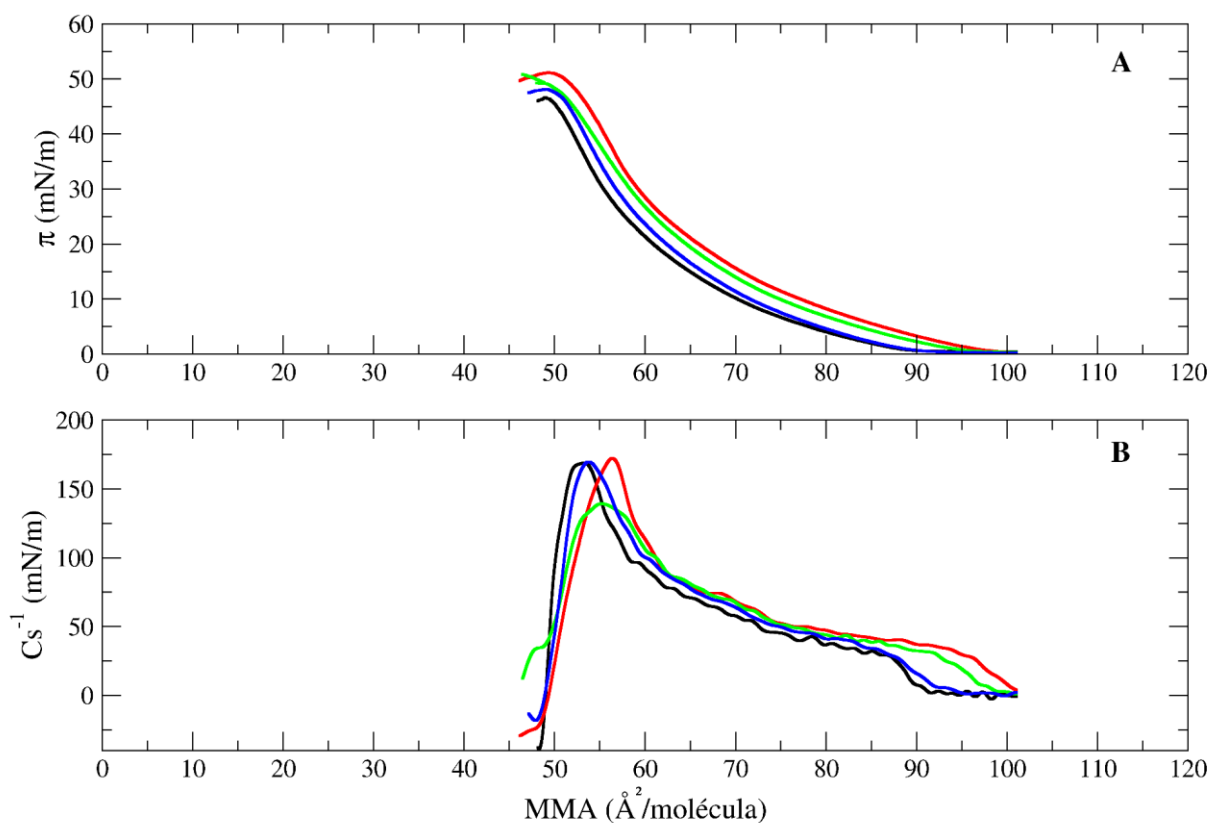


Figura 12. Efecto del POPE en las isotermas de compresión de POPC. (A) Presión superficial (π) vs. área molecular media (MMA). (B) Módulo de compresibilidad (C_s^{-1}). POPC puro (negro), POPC-POPE con distintas proporciones: 9:1 (rojo), 7:3 (verde) y 1:1 (azul).

4.2 Caracterización de sistemas lipídicos en presencia de Fluralaner

4.2.1 Caracterización del efecto del Fluralaner en bicapas mediante SDM

El **área molecular media** y el **ancho de membrana** de las bicapas binarias en presencia de fluralaner se calcularon para determinar si la partición de este insecticida a la bicapa es capaz de modificar dichos parámetros (Anexo Fig. 4). Sin embargo, no se pudo observar ninguna diferencia para ninguno de los sistemas analizados.

Por otro lado, los **perfiles de densidad** nos permiten examinar la ubicación del fluralaner en relación a los distintos componentes del sistema (Fig. 13). Se puede observar que el máximo de densidad para el fluralaner en todos los sistemas analizados se encuentra dentro de la bicapa. Esto es de esperarse, debido a que el insecticida es sumamente hidrofóbico [39]. Para el caso del sistema control de POPC, se puede observar una distribución no homogénea del fluralaner dentro de las dos hemicapas, pero con un claro máximo en la región del carbonilo del POPC. Este máximo se mantiene para todos los sistemas binarios analizados, tanto con COL o POPE. Es para destacar que la distribución asimétrica del fluralaner en los sistemas 9:1 y 7:3 de COL pareciera estar acompañada por una distribución no homogénea del COL en estos sistemas, en los cuales parece haber un desbalance entre la distribución en ambas hemicapas. Este resultado podría estar indicando que la presencia de fluralaner en estos sistemas está modificando la tasa de flip-flop de las moléculas de COL. En el sistema POPC-COL 1:1 no se observa este patrón de manera clara, lo cual se puede explicar si tenemos en cuenta que los eventos de flip-flop son más frecuentes en bicapas con cadenas hidrocarbonadas menos empaquetadas, por lo que en

bicapas más ordenadas serían menos frecuentes [65]. También se puede observar en el sistema POPC-COL 7:3 que se observa densidad para el fluralaner en la fase acuosa cercana a la bicapa. Esto estaría indicando una menor solubilidad del fluralaner en este sistema. Finalmente, para los sistemas binarios POPC-POPE no se observan diferencias significativas en relación a los sistemas en ausencia de fluralaner.

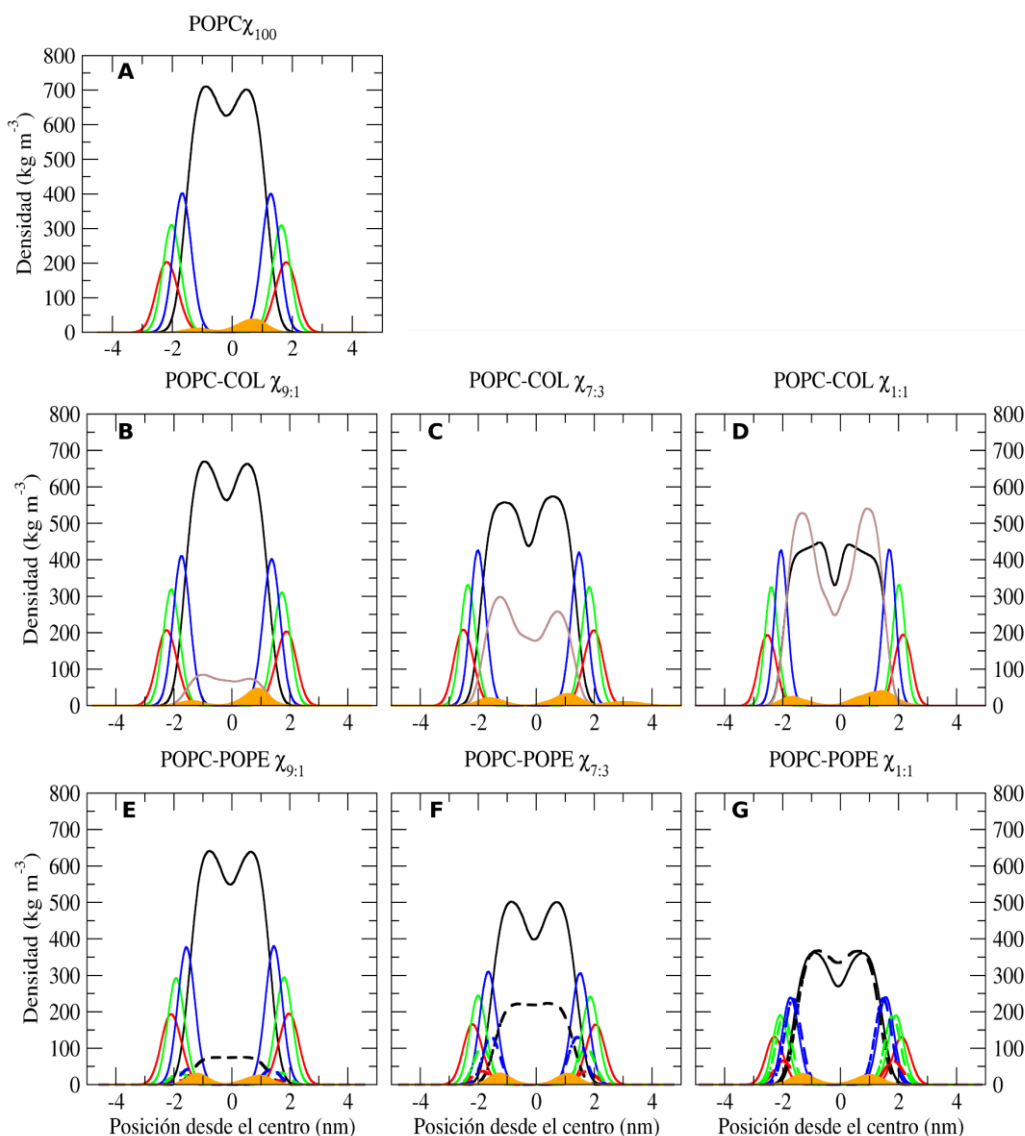


Figura 13. Análisis de los perfiles de densidad en función del eje z para los sistemas binarios en **presencia de fluralaner**. Se descompusieron los principales grupos funcionales en cadenas acílicas (negro), glicerol (azul), grupo fosfato (verde) y grupo amino (rojo) para el sistema control (A). Se adiciona el colesterol (marrón) a los sistemas apropiados (B-D) y las líneas enteras denotan a los grupos químicos del POPC mientras que las líneas punteadas al POPE (exclusivo de E-G).

Como puede observarse al analizar los **parámetros de orden**, el fluralaner no modificó de manera significativa dicho parámetro en ninguno de los sistemas analizados. Sí se pudo observar una tenue tendencia hacia un efecto ordenador en las cadenas acílicas tanto del POPC puro como en las bicapas binarias de POPC-COL 9:1, mientras que en las proporciones de POPC-COL 7:3 y 1:1 las cadenas hidrocarbonadas se desordenan levemente (Fig. 14 A, B). Para poder confirmar con mayor rigor este efecto diferencial del fluralaner entre los sistemas binarios, se debería realizar repeticiones para descartar que las diferencias no sean producto del azar. También podría explorarse el incrementar el número de moléculas de fluralaner. De confirmarse dicha tendencia, podría explicarse que en bicapas más expandidas la partición del fluralaner aporta interacciones atractivas que se traducen en el incremento de

orden, pero en bicapas condensadas y ordenadas a causa de las altas concentraciones de COL, perturba las interacciones que se dan entre los componentes de la membrana.

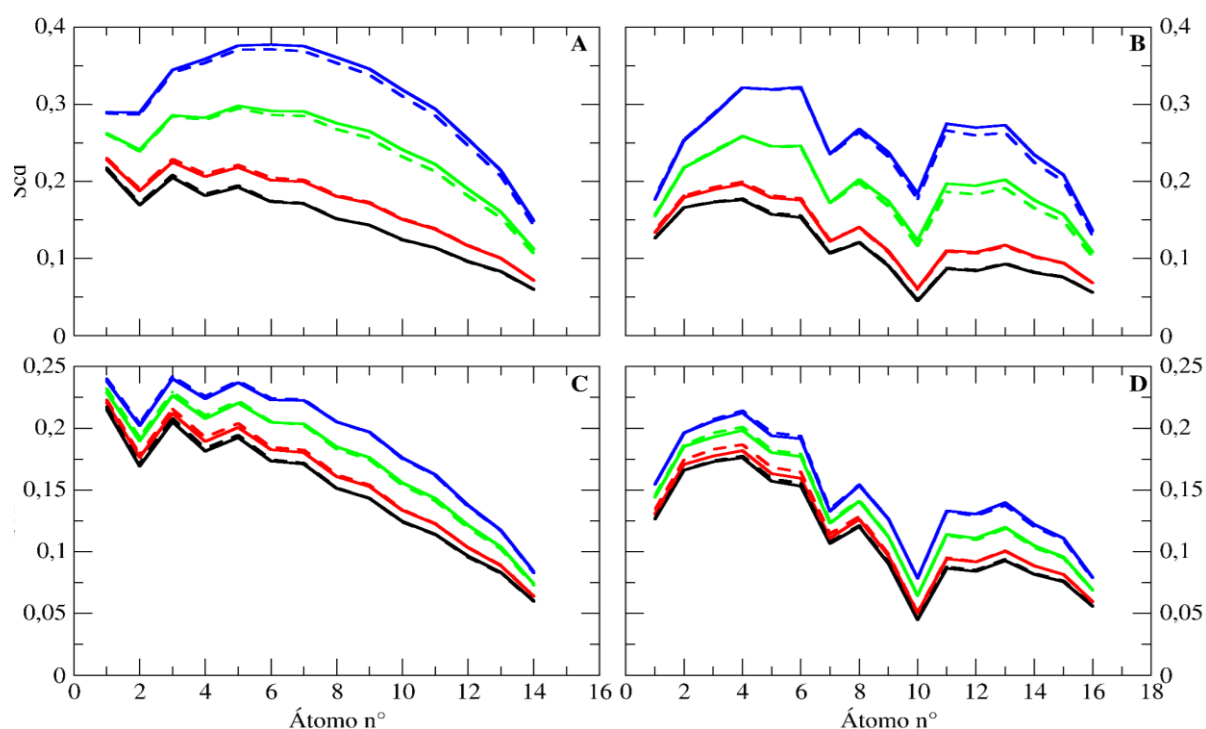


Figura 14. Parámetros de orden en función de los carbonos de las cadenas acílicas Sn-1 (A y C) y Sn-2 (B y D) del POPC. Sistemas en ausencia (líneas enteras) y en presencia de fluralaner (líneas punteadas) en distintas proporciones de COL (A y B) y POPE (C y D). POPC (negro), POPC-COL y POPC-POPE 9:1 (rojo), POPC-COL y POPC-POPE 7:3 (verde) y POPC-COL y POPC-POPE 1:1 (azul).

Realizamos **análisis de RDF** del átomo de fósforo que compone a la molécula de POPC respecto a sí misma y respecto al POPE, el átomo de fósforo del POPE respecto a sí mismo, el OH del COL en relación al O32 del carbonilo del POPC y por último los OH del COL respecto a sí mismos, para los sistemas en presencia de fluralaner (Fig. 15 y Anexo Fig. 5). Estos RDF no presentan diferencias significativas respecto al mismo análisis realizado para los sistemas en ausencia de fluralaner (Fig. 9). Sí se observaron algunas diferencias en los RDF obtenidos entre grupos OH de COL en ausencia y presencia de fluralaner para los sistemas con relaciones molares 9:1 y 7:3, donde la presencia de fluralaner incrementa la regularidad del patrón (Fig. 15A) o la altura de los picos (Fig. 15B). Nuevamente, puede observarse una falta de efecto del fluralaner cuando la proporción COL iguala a la del POPC (Fig. 15C)

En el caso de los átomos de fósforo del POPE, solo la proporción 9:1 demuestra una modificación por parte del fluralaner en el estructuramiento entre las moléculas de este fosfolípido.

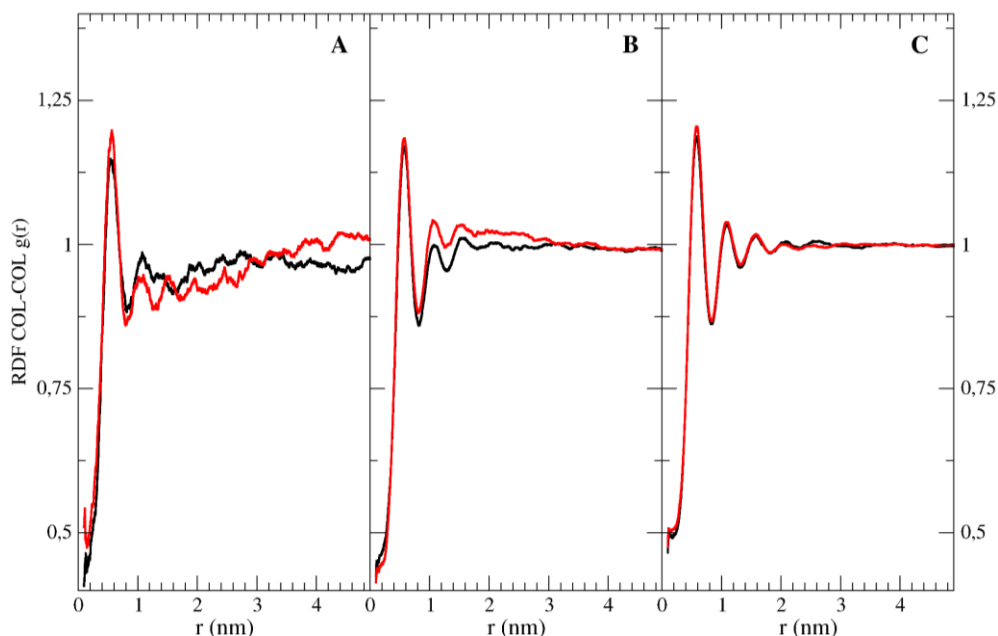


Figura 15. Análisis de RDF entre grupos OH de COL (A a C) en ausencia (negro) y presencia (rojo) de fluralaner. POPC-COL y POPC-POPE 9:1 (A y D), POPC-COL y POPC-POPE 7:3 (B y E), POPC-COL y POPC-POPE 1:1 (C y F).

Se calculó la orientación del vector COL respecto a la normal al eje Z (Fig. 16) para determinar si había alguna modificación en presencia del fluralaner. Como se observó en los análisis de RDF (Fig. 15), la influencia del fluralaner va disminuyendo a medida que la proporción de COL va aumentando, hasta el sistema POPC-COL 1:1, en donde las diferencias son mínimas. En los sistemas 9:1 y 7:3 el fluralaner disminuye la proporción de moléculas de COL alineadas con la normal de la membrana, incrementando la proporción de las mismas en ángulos de 60° (o 120°) (Fig. 16B).

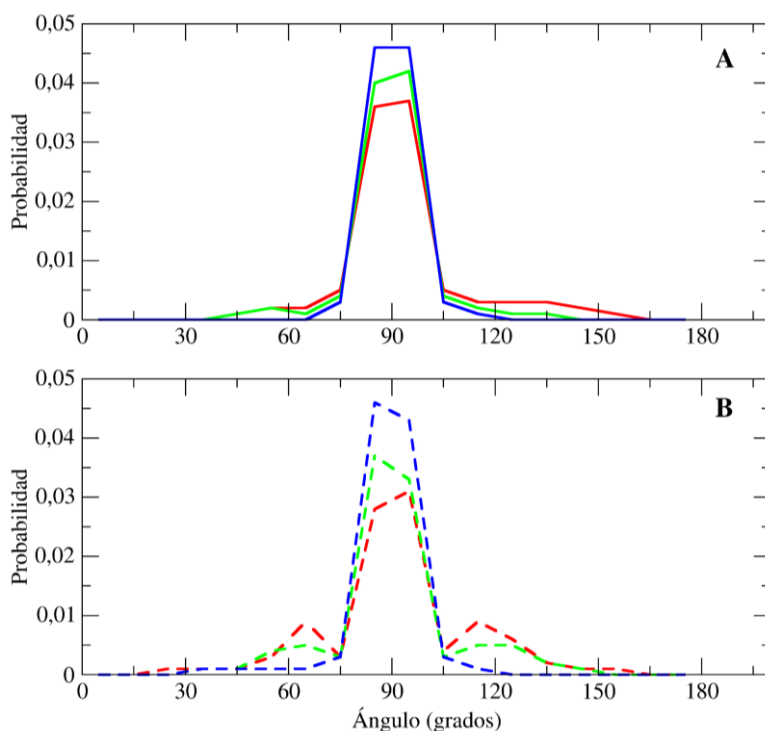


Figura 16. Análisis de la orientación del vector COL en relación al plano perpendicular a Z. Están representados los sistemas en ausencia (línea entera) y presencia (línea punteada) de fluralaner. POPC-COL 9:1 (rojo), POPC-COL 7:3 (verde) y POPC-COL 1:1 (azul).

Del análisis realizado de los puentes de H entre POPC con COL y con POPE, COL-COL y POPE-POPE, pudimos observar que la presencia de fluralaner no produjo ningún cambio con respecto a las membranas control (Tabla 3, Anexo Fig. 2, 6), si bien el insecticida posee donores y aceptores de puente de H (Fig. 3), la cantidad de interacciones que es capaz de establecer son despreciables en relación a las que ocurren entre los componentes de la bicapa (Fig. 18).

Estos resultados indican que las modificaciones ejercidas por el fluralaner sobre las propiedades físicas de la membrana pueden deberse a otros tipos de interacciones que se forman entre el fluralaner y los componentes de la misma, tales como interacciones como fuerzas de Van der Waals.

Tabla 3. Valores de enlaces puentes de H totales promediados a lo largo de la simulación y normalizados de los sistemas binarios en las proporciones 9:1, 7:3 y 1:1 (rojo, verde y azul) para POPC-COL, POPC-POPE y POP-POPE.

+ FLU	POPC-COL	COL-COL	TOTAL	POPC-POPE	POPE-POPE	TOTAL
9:1	17,58	0,04	17,62	57,43	12,05	69,48
normalizado	0,34	≈ 0	0,34	1,10	0,23	1,34
7:3	48,22	0,12	48,34	127,57	73,69	201,26
normalizado	0,31	≈ 0	0,31	0,83	0,48	1,31
1:1	68,6	0,09	68,69	142,92	178,59	321,51
normalizado	0,27	≈ 0	0,27	0,56	0,70	1,26

Análisis de la partición del Fluralaner en bicapas de diferente composición

Para analizar la dinámica de partición de las moléculas de fluralaner en las diferentes bicapas, se determinó la evolución temporal de su posición en el eje Z (Fig. 17). Se puede observar que al final de la trayectoria de todos los sistemas analizados todas las moléculas de fluralaner han particionado a la fase lipídica. Sin embargo, para un sistema particular, POPC-COL 7:3, ocurre una partición más tardía de las moléculas a dicha fase (Fig. 17C). Esto se evidencia también en el perfil de densidad de este sistema (Fig. 13C). Dado que la densidad corresponde a una probabilidad de distribución, podemos observar para esta relación molar del COL que hay densidad por fuera de la bicapa.

Una inspección visual de las SDM de todos los sistemas, muestra cómo algunas de las moléculas de fluralaner se auto agregan dentro del bulk de agua, migrando a la fase lipídica en conjunto. Esto se visualiza en las trayectorias como una coincidencia en el tiempo de partición a la membrana de varias moléculas a la vez.

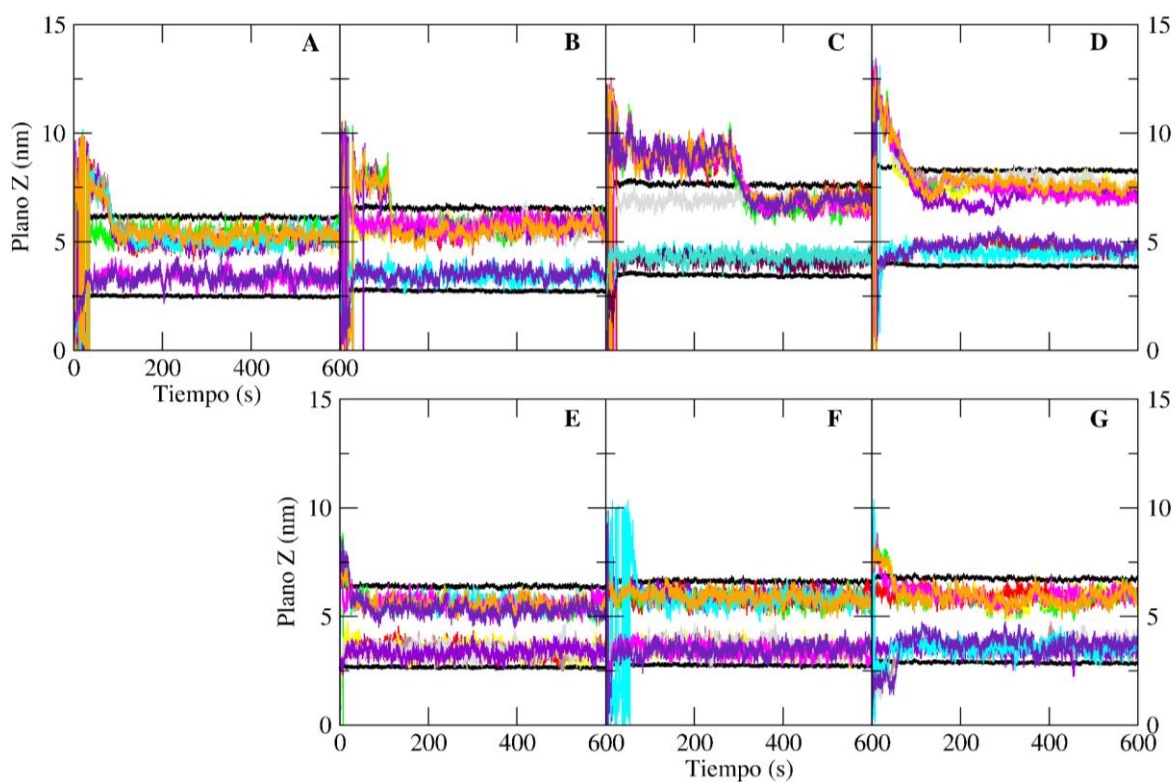


Figura 17. Seguimiento de las moléculas de fluralaner que comienzan en el bulk de agua. Los límites de las bicapas están delimitados por los átomos de fósforo de los fosfolípidos de ambas hemicapas (negro). POPC (A), POPC-COL 9:1 (B), 7:3 (C), 1:1 (D), POPC-POPE 9:1 (E), 7:3 (F), 1:1 (G).

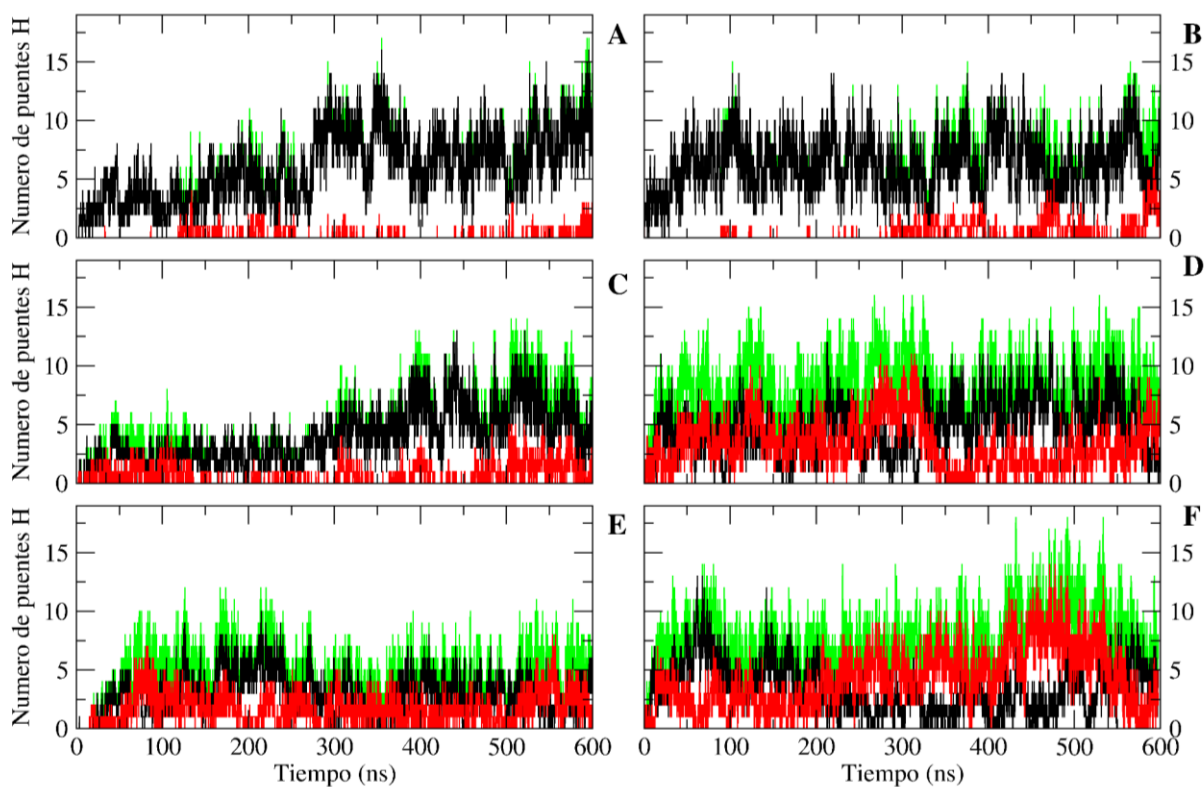


Figura 18. Número de enlaces puente H formados entre las moléculas de fluralaner con los distintos componentes de los sistemas con COL (A, C y E) y POPE (B, D y F) a lo largo del tiempo. Se graficaron los enlaces del FLU con el POPC (negro), con el COL o POPE según correspondiera (rojo) y la suma de ambos (verde). POPC-COL y POPC-POPE 9:1 (A, B), POPC-COL y POPC-POPE 7:3 (C, D) y POPC-COL y POPC-POPE 1:1 (E, F).

Cuando evaluamos los puentes de H formados por el fluralaner con los componentes de las bicapas binarias POPC-COL y POPC-POPE (Fig. 18), pudimos observar que la adición de COL al sistema provoca una tendencia a disminuir la cantidad de puentes de H del fluralaner con toda la bicapa, debido a la menor proporción de estas interacciones que es capaz de establecer el fluralaner con el COL. Por otro lado, en los sistemas binarios POPC-POPE la cantidad total de estas interacciones se mantuvo en un rango estable, no observándose preferencias claras por el establecimiento de puentes de H con POPC o POPE. Complementariamente, determinamos la cantidad de puentes de H establecidos entre los componentes de la bicapa en ausencia y en presencia de fluralaner (Tablas 2, 3). Tanto los valores totales como los normalizados, si está presente o no el insecticida, son muy similares entre sí, por lo que podemos inferir que al menos el número de moléculas de fluralaner utilizadas en las simulaciones no son capaces de alterar la red de puentes de H de los sistemas.

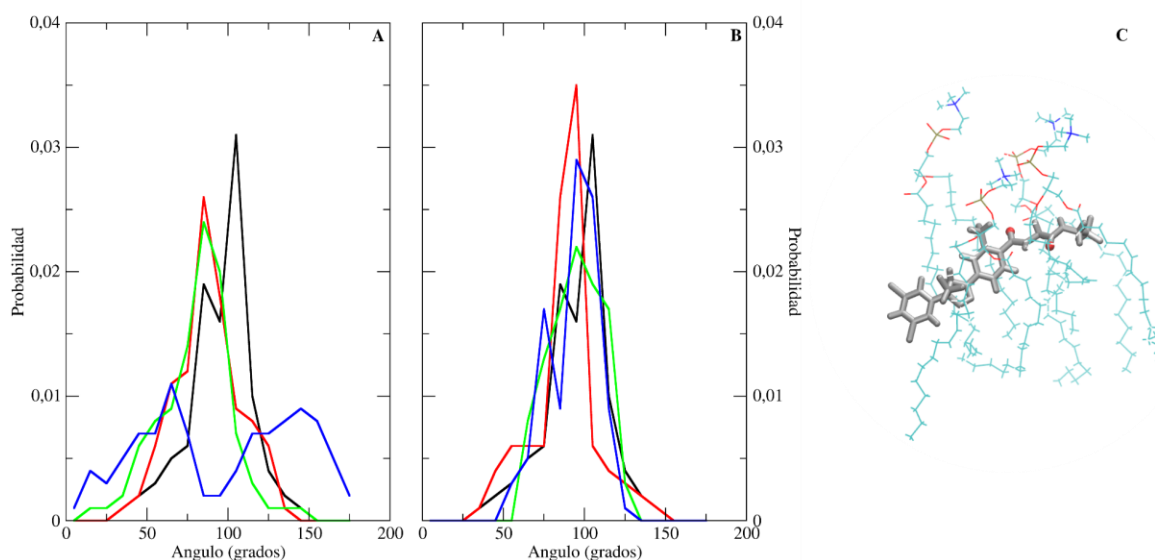


Figura 19. Probabilidad de distribución en función del ángulo que forma el vector construido a partir de los carbonos C9 y C18 de la molécula de fluralaner, con el plano perpendicular al eje z. Orientaciones de las moléculas de fluralaner para los sistemas con COL (A) y POPE (B) comparando en el sistema de POPC puro (negro) con las distintas proporciones 9:1 (rojo), 7:3 (verde) y 1:1 (azul). Se muestra un esquema representativo (C) de la orientación predominante del fluralaner (plateado) en la bicapa, los átomos de oxígeno (rojo), nitrógeno (azul) y fósforo como también las cadenas acílicas (cian).

Como se puede observar en la figura 19A, la variación de la concentración de COL en bicapas de POPC, tiene un claro impacto sobre la **orientación de las moléculas de fluralaner**. A bajas relaciones molares (9:1 y 7:3) el fluralaner adquiere una orientación alineada con el eje z de la membrana. Sin embargo, a igual relación molar que POPC (1:1), se observa una clara división en la orientación del insecticida; ya que aparecen dos picos marcados con máximos en 60° y entre 120-150°. En estas disposiciones que puede adoptar el fluralaner, se observa que la cadena a partir del carbono C18, que cuenta con los grupos dadores y aceptores de puentes de H (Fig. 3), se orienta hacia los grupos polares de los fosfolípidos. El resto de la molécula, de carácter más apolar, según como el fluralaner se disponga en la bicapa corresponde a los distintos ángulos obtenidos en el análisis (Fig. 19).

Como mencionamos anteriormente, para la relación molar POPC-COL 7:3, el fluralaner tiende a agregarse, encontrándose casi totalmente agregado a la relación molar de 1:1 por lo que los ángulos obtenidos corresponden a la posición del fluralaner en dicho estado (Anexo Fig. 8, 9). Por otro lado, podemos observar que la variación de la proporción de POPE en la bicapa no tiene un impacto claro sobre la orientación de las moléculas de fluralaner (Fig. 19B).

Este efecto diferencial del COL y POPE sobre la orientación del fluralaner dentro de la bicapa, podría tener impacto sobre las vías de acceso del insecticida al sitio de unión en el R- GABA_A [9]. Datos *in silico*

[66] y SDM del R-GABA en presencia de fluralaner (Gastaldi et. al, datos no publicados) indican que la vía de acceso al sitio de unión de este insecticida se daría mediante un mecanismo de acceso intra hélice, a través de la membrana [9]. La orientación y agregación del compuesto en bicapas de altas relaciones molares de COL, podría estar afectando la dinámica de acceso al sitio de unión, como ya se ha observado anteriormente para los compuestos moduladores de receptores acoplados a proteína G, entre otros [9], [67].

Otro de los análisis llevados a cabo, fue la obtención del **coeficiente de difusión (Dc)** del insecticida para todos los sistemas. Se observa que la adición de los componentes, ya sean COL o PE, modifica el Dc del fluralaner en la bicapa respecto al POPC puro (Tabla 4). Particularmente se ve un incremento para los sistemas binarios con POPC-COL 9:1 y 7:3, y POPC-POPE 7:3, mientras que existe una marcada disminución para el caso del POPC-POPE 1:1. Las variaciones no lineales en el Dc de fluralaner con el incremento de la relación molar de COL y PE podrían explicarse si el mismo fuera la resultante del orden de la membrana y la cantidad de puentes de H del compuesto. Estos dos parámetros podrían disminuir el valor del coeficiente, uno interfiriendo con la fluidez general, y el otro anclando las moléculas de fluralaner a los lípidos con los cuales se forman los puentes de H. Para el caso de los sistemas con COL, el incremento de su proporción disminuye la cantidad de puentes de H que forma el fluralaner con los lípidos, a la vez que disminuye la fluidez de la misma. Por otro lado, en los sistemas con PE, no hay una disminución de los puentes de H totales que forma el fluralaner, pero sí una disminución de la fluidez de la membrana.

Tabla 4. Coeficiente de difusión de fluralaner para el sistema POPC y los sistemas binarios con COL o POPE en sus distintas relaciones molares.

Composición	Dc ($10^{-5} \cdot \text{cm}^2/\text{s}$)
POPC	2,6
POPC-COL 9:1	3,4
POPC-COL 7:3	5,1
POPC-COL 1:1	2,4
POPC-POPE 9:1	2,8
POPC-POPE 7:3	3,4
POPC-POPE 1:1	1,1

Tabla 5. Eventos de flip-flop de COL para los sistemas binarios POPC-COL en sus distintas relaciones molares en ausencia y presencia de fluralaner.

Composición	Sin fluralaner ($10^4 \cdot \text{s}^{-1}$)	Con fluralaner ($10^4 \cdot \text{s}^{-1}$)
POPC-COL 9:1	38	32
POPC-COL 7:3	16	5,4
POPC-COL 1:1	1,3	3,3

La **tasa de flip-flops del COL** disminuye a medida que incrementa la relación molar de este, tanto en sistemas con o sin fluralaner, cayendo hasta un orden de magnitud para la relación molar POPC-COL 1:1 (Tabla 5). Esto es esperable, dado que los eventos de flip-flop son más frecuentes en bicapas con cadenas hidrocarbonadas menos empaquetadas, por lo que en bicapas más ordenadas serían menos frecuentes [65]. Por otro lado, el efecto del fluralaner no es lineal, dado que si bien disminuye la cantidad de eventos que ocurren para 9:1 y 7:3, no lo hace de manera lineal, y en el caso de 1:1, incluso hay mayor cantidad de eventos (Tabla 5). Para el sistema POPC-COL 9:1 se podría considerar que el fluralaner está disminuyendo las tasas de flip-flop debido a que está aumentado levemente el orden de la bicapa. Lo contrario podría ser cierto también para el sistema POPC-COL 1:1, donde el insecticida, al desordenar la membrana, le permite al COL moverse de una hemicapa a la otra. Sin embargo, en sistema 7:3, el fluralaner disminuye de manera considerable las tasas de flip-flop, a pesar de no estar modificando los parámetros de orden (Fig. 14).

4.2.2 Caracterización del efecto de fluralaner en sistemas experimentales de capas monomoleculares de sistemas binarios.

Se analizó el comportamiento de las isothermas de compresión de POPC, POPC-COL y POPC-POPE en distintas proporciones en presencia de fluralaner. Los resultados de las isothermas de compresión (Fig. 20 y 21) mostraron que, en presencia de fluralaner, las curvas se desplazan a áreas mayores. Esta expansión de las isothermas, tanto en monocapas formadas por POPC puro, como el de las mezclas, con respecto a las curvas sin fluralaner, refleja el hecho de que las moléculas del insecticida son capaces de particionarse en la fase lipídica, ocupando un área en la interfase y actuando como espaciadores entre las moléculas de fosfolípidos.

En todas las curvas donde el fluralaner fue disuelto en la subfase, puede observarse una pequeña meseta u hombro a los 25 mN/m aproximadamente y un posterior aumento en la pendiente de la isoterma. Este hombro en la isoterma se correspondería a una pérdida de moléculas de fluralaner debido al aumento de presión. Para este caso, debido a que el insecticida no es capaz de formar monocapas estables [39] y por lo tanto no es posible establecer su presión de colapso, no se podría hablar de un colapso del compuesto. Además, el cambio abrupto de pendiente en las isothermas por encima de los 25 mN/m, nos sugiere un rearrreglo del compuesto en la monocapa. Sin embargo, debido a que todas las membranas, con y sin fluralaner, mostraron valores semejantes de presiones de colapso, de alrededor de 36 mN/m (Tabla 6); esto sugeriría que a esta presión sólo se encuentran presentes los lípidos y el insecticida ya no se encuentra en el film, aunque esta hipótesis debería ser corroborada con otras técnicas como microscopía del ángulo de Brewster (BAM), microscopía de epifluorescencia o por la determinación in sílico de la energía de partición del fluralaner en fases condensadas mediante la obtención de Potencial de Fuerza Media.

En las membranas formadas por las mezclas binarias de POPC-COL y fluralaner en la subfase, se observa un claro desplazamiento de las curvas hacia valores menores de área, por encima de los 25 mN/m (Fig. 20A), viéndose este efecto más marcado a medida que la relación molar del COL aumenta en mezcla.

Además, se observó un aumento en la elasticidad de los films, lo que indicaría que el insecticida vuelve más compresible a las membranas (Fig. 20B). Este incremento en la elasticidad de la monocapa ya ha sido reportado anteriormente para otro insecticida, el fipronil, lo que indica que la estructura rígida de los lípidos bien empaquetados en el film se reduce con la presencia del insecticida inserto entre las moléculas de lípidos [16].

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por simulaciones de DM en donde bicapas ordenadas por la presencia de COL el insecticida las vuelve más desordenadas (Fig. 14A, B).

Tabla 6: Presión de colapso (π_c), MMA a π_c y Take-off de las isothermas de POPC, POPC-COL y POPC-POPE, en ausencia y presencia de fluralaner en la subfase.

Composición	CONTROL			FLURALANER 1 μ M		
	π_c (mN/m)	MMA $\text{\AA}^2/\text{molécula}$	Take-Off $\text{\AA}^2/\text{molécula}$	π_c (mN/m)	MMA $\text{\AA}^2/\text{molécula}$	Take-Off $\text{\AA}^2/\text{molécula}$
POPC	35,3	53,6	91,4	33,6	57,8	124,2
POPC-COL 9:1	36,7	53,8	86,8	34,2	57,6	126,2
POPC-COL 7:3	37,7	34,5	47,7	39,1	33,7	80,1
POPC-COL 1:1	37,7	33,9	40,9	36,4	31,3	65,2
POPC-POPE 9:1	34,7	56,4	101,3	34,5	62,4	116,5
POPC-POPE 7:3	37,3	54,5	95,4	36,5	60,5	129,8
POPC-POPE 1:1	35,7	55,9	97,1	33,1	62,2	133,6

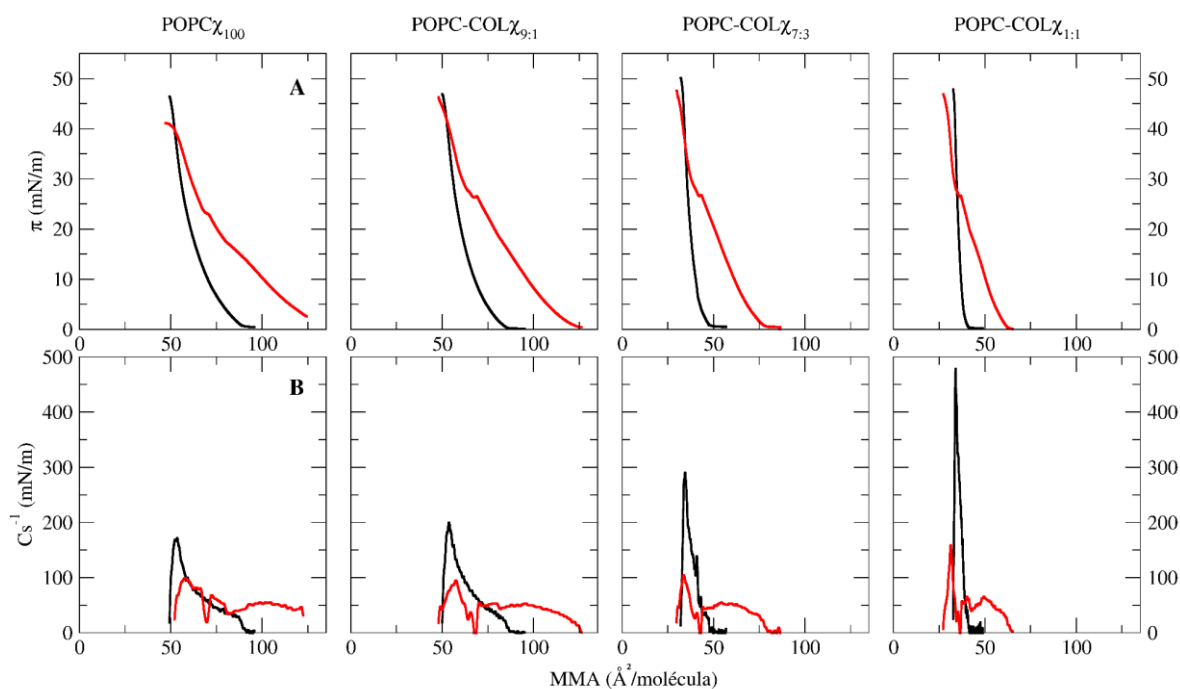


Figura 20. Efecto del fluralaner en las isothermas de compresión de POPC y POPC-COL de distintas proporciones. (A) Presión superficial (π) vs. área molecular media (MMA). (B) Módulo de compresibilidad (Cs^{-1}). Subfase de agua limpia (negro), subfase de agua con 1 μ M de fluralaner (rojo)

Los resultados obtenidos a partir de las isothermas de compresión de las mezclas binarias POPC-POPE con fluralaner en la subfase, mostraron comportamientos similares a los obtenidos con COL. El insecticida es capaz de particionar en la membrana e interactuar con los lípidos, produciendo una expansión de la isoterma con un aumento del take-off. Además, a pesar de que estas membranas presentan valores más bajos de C_s^{-1} (Fig. 21B), la presencia del insecticida produjo valores aún menores que los obtenidos con COL, indicando que son más elásticas y compresibles.

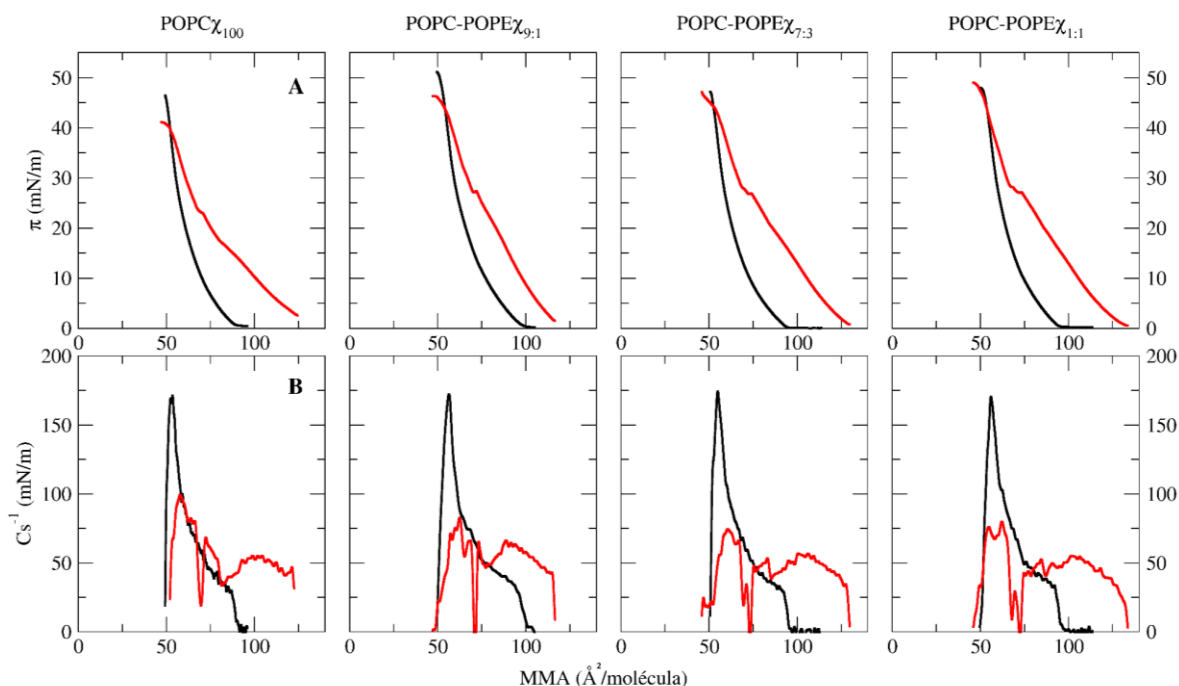


Figura 21. Efecto del Fluralaner en las isothermas de compresión de POPC y POPC-POPE de distintas proporciones. (A) Presión superficial (π) vs. área molecular promedio (MMA). (B) Módulo de compresibilidad (C_s^{-1}). Subfase de agua limpia (negro), subfase de agua con 1 μM de Fluralaner (rojo)

Con el fin de evaluar la capacidad del fluralaner de insertarse dentro de la membrana, se realizaron ensayos de penetración. Se midió el cambio de los valores de π en función del tiempo, a distintas π iniciales, producidos por la inyección de fluralaner en la subfase (Anexo Fig. 7).

A partir de estas curvas, se calculó el incremento de π ($\Delta\pi$) en función de la π_i para cada mezcla binaria y del ajuste de estos datos a una regresión lineal se obtuvieron los valores de MIP (ver Materiales y Métodos).

Como puede observarse en las tablas insertas en la figura 22, el fluralaner es capaz de particionar en las capas monomoleculares formadas por las distintas mezclas a valores superiores a los 50 mN/m. Esto estaría sugiriendo que el insecticida sería capaz de interactuar y penetrar fácilmente en membranas naturales, las cuales presentan una presión lateral promedio de aproximadamente 30 mN/m [68].

En las membranas formadas por POPC-COL se puede observar una leve tendencia del fluralaner a disminuir su capacidad de insertarse a altas presiones a medida que la proporción de COL aumenta en la mezcla. El insecticida tiene mayor facilidad de interactuar con membranas menos condensadas, pero una vez dentro de ellas, mostró una buena permanencia e interacción (Fig. 17).

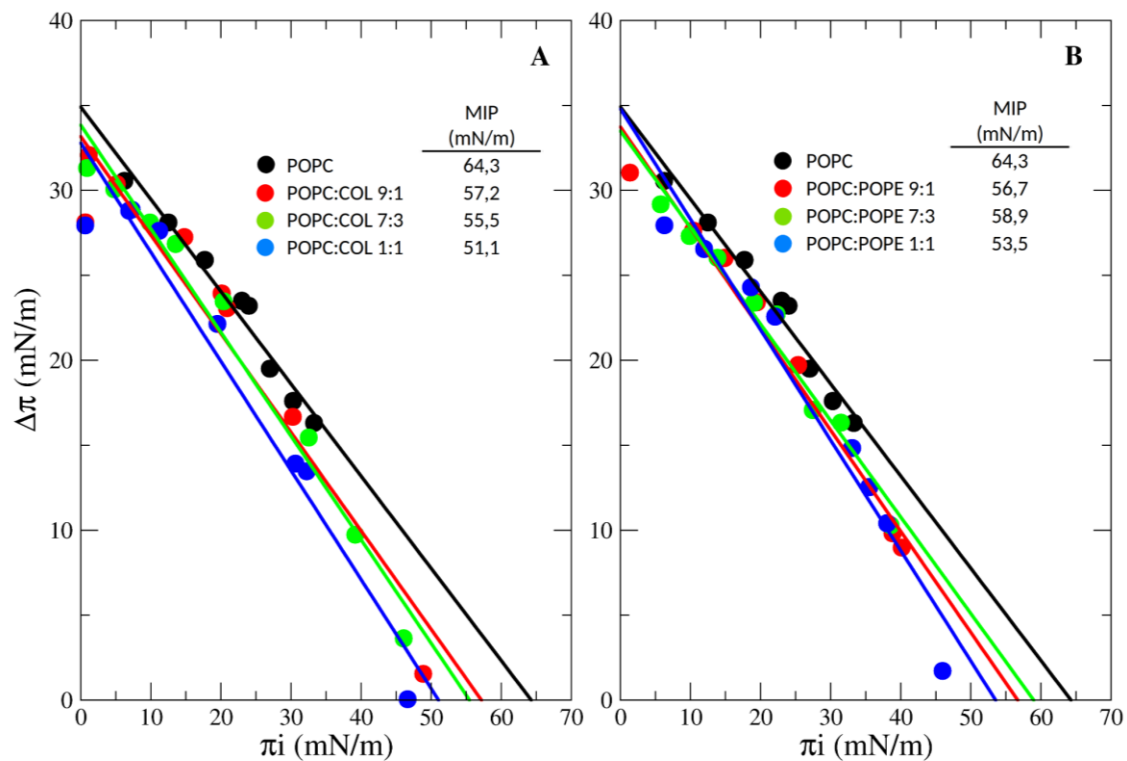


Figura 22. Penetración de fluralaner en monocapas de POPC, POPC-COL (A) y POPC-POPE (B). Variaciones de π , causadas por la penetración de fluralaner, en función de la π inicial de las monocapas. Los datos se ajustaron con una regresión lineal y se determinó el MIP para cada mezcla.

5. Conclusiones

Dado la complejidad de las transiciones de fases que presentan los sistemas modelos de membrana de lípidos monoinsaturados, el uso conjunto de SDM y monocapas de Langmuir nos permitió caracterizar, mediante de la obtención de parámetros estructurales, las fases predominantes para los sistemas binarios de POPC con POPE o COL, en ausencia o presencia de fluralaner. Las SDM nos permitieron tener un alto detalle molecular de los procesos de interacción droga-membrana en el sistema modelo que más fielmente representa la membrana biológica, es decir las bicapas. Por otro lado, el uso de capas monomoleculares de lípidos nos permitieron sobrepasar ciertas limitaciones que nos impone el sistema de bicapas, dado que podemos regular fácilmente el empaquetamiento lateral de los lípidos, regulando el estado físico de la membrana. Es importante tener en cuenta que las relaciones termodinámicas entre monocapas y bicapas son directas. Esta correspondencia entre los sistemas se confirma en nuestro trabajo donde pudimos identificar, tanto en las SDM de bicapas como en los experimentos con monocapas de Langmuir, un cambio de estado de fase de la membrana de POPC con COL a relaciones molares mayores de 30%, mientras que no observamos cambios de estado de fase en el rango de relaciones molares de POPC-POPE analizados.

Pudimos determinar que el fluralaner es capaz de particionarse en la fase lipídica, incluso a presiones laterales similares a las presentes en membranas naturales, ocupando un área en la interfase y actuando como espaciadores entre las moléculas de fosfolípidos. Las SDM nos permitieron determinar las interacciones que se establecen en el proceso de partición, mientras que las monocapas nos permitieron obtener una caracterización de las modificaciones de los parámetros físicos que ocurren en este proceso. Teniendo esto en cuenta, se pudo observar que el fluralaner se ubica con los grupos dadores y aceptores de puentes de hidrógeno orientados hacia la región polar de la bicapa, y el resto de la molécula, de carácter más apolar, orientado hacia el centro de la bicapa. Estas interacciones hacen a los sistemas lipídicos más elásticos, y por lo tanto más compresibles.

A medida que se incrementa la concentración de COL en la bicapa, el fluralaner muestra una tendencia a disminuir su solubilidad en la fase lipídica, mientras que el POPE tiene un efecto contrario, permitiendo una distribución homogénea del insecticida en la bicapa. Esta diferencia podría afectar el acceso del fluralaner al sitio de unión en el R-GABA_A, pudiendo actuar como un factor de modulación inespecífico diferencial entre mamíferos e insectos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, consideramos que para comprender la regulación de la actividad del R-GABA_A, es importante tener en cuenta las diferencias en la composición de las membranas de insectos y mamíferos.

6. Bibliografía

- [1] A. L. Wilson *et al.*, "The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 14, no. 1, p. e0007831, Jan. 2020, doi: 10.1371/journal.pntd.0007831.
- [2] R. W. Olsen and W. Sieghart, "GABAA receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology," *Neuropharmacology*, vol. 56, no. 1, pp. 141–148, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.045.
- [3] J. E. Casida and K. A. Durkin, "Novel GABA receptor pesticide targets," *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 121, pp. 22–30, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.pestbp.2014.11.006.
- [4] Y. Ozoe and M. Akamatsu, "Non-competitive GABA antagonists: probing the mechanisms of their selectivity for insect versus mammalian receptors," *Pest Manag. Sci.*, vol. 57, no. 10, pp. 923–931, Oct. 2001, doi: 10.1002/ps.375.
- [5] S. Zhu, C. M. Noviello, J. Teng, R. M. Walsh, J. J. Kim, and R. E. Hibbs, "Structure of a human synaptic GABAA receptor," *Nature*, vol. 559, no. 7712, pp. 67–72, Jul. 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0255-3.
- [6] L. Chen, K. A. Durkin, and J. E. Casida, "Structural model for γ -aminobutyric acid receptor noncompetitive antagonist binding: Widely diverse structures fit the same site," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 13, pp. 5185–5190, Mar. 2006, doi: 10.1073/pnas.0600370103.
- [7] V. Miguel, M. A. Villarreal, and D. A. García, "Effects of gabergic phenols on the dynamic and structure of lipid bilayers: A molecular dynamic simulation approach," *PLOS ONE*, vol. 14, no. 6, p. e0218042, Jun. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0218042.
- [8] V. Miguel, M. E. Sánchez-Borzone, and D. A. García, "Interaction of gabaergic ketones with model membranes: A molecular dynamics and experimental approach," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1860, no. 8, pp. 1563–1570, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.bbamem.2018.05.012.
- [9] J. Payandeh and M. Volgraf, "Ligand binding at the protein–lipid interface: strategic considerations for drug design," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 20, no. 9, pp. 710–722, Sep. 2021, doi: 10.1038/s41573-021-00240-2.
- [10] R. Dawaliby *et al.*, "Phosphatidylethanolamine Is a Key Regulator of Membrane Fluidity in Eukaryotic Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 7, pp. 3658–3667, Feb. 2016, doi: 10.1074/jbc.M115.706523.
- [11] A. Shevchenko and K. Simons, "Lipidomics: coming to grips with lipid diversity," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 8, pp. 593–598, Aug. 2010, doi: 10.1038/nrm2934.
- [12] G. van Meer and A. I. P. M. de Kroon, "Lipid map of the mammalian cell," *J. Cell Sci.*, vol. 124, no. 1, pp. 5–8, Jan. 2011, doi: 10.1242/jcs.071233.
- [13] M. Raja, "Do Small Headgroups of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidic Acid Lead to a Similar Folding Pattern of the K⁺ Channel?," *J. Membr. Biol.*, vol. 242, no. 3, pp. 137–143, Aug. 2011, doi: 10.1007/s00232-011-9384-4.
- [14] A. van Dalen, S. Hegger, J. A. Killian, and B. de Kruijff, "Influence of lipids on membrane assembly and stability of the potassium channel KcsA," *FEBS Lett.*, vol. 525, no. 1–3, pp. 33–38, Aug. 2002, doi: 10.1016/S0014-5793(02)03061-2.
- [15] G. N. Reiner *et al.*, "Gabaergic Pharmacological Activity of Propofol Related Compounds as Possible Enhancers of General Anesthetics and Interaction with Membranes," *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 67, no. 2, pp. 515–525, Nov. 2013, doi: 10.1007/s12013-013-9537-4.
- [16] I. Felsztyna, M. E. Sánchez-Borzone, V. Miguel, and D. A. García, "The insecticide fipronil affects the physical properties of model membranes: A combined experimental and molecular dynamics simulations study in Langmuir monolayers," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1862, no. 10, p. 183378, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183378.
- [17] V. Miguel, M. E. Sánchez-Borzone, M. E. Mariani, and D. A. García, "Modulation of membrane physical properties by natural insecticidal ketones," *Biophys. Chem.*, vol. 269, p. 106526, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.bpc.2020.106526.
- [18] R. Søgaard *et al.*, "GABA_A Receptor Function is Regulated by Lipid Bilayer Elasticity," *Biochemistry*, vol. 45, no. 43, pp. 13118–13129, Oct. 2006, doi: 10.1021/bi060734+.
- [19] I. Levitan, D. K. Singh, and A. Rosenhouse-Dantsker, "Cholesterol binding to ion channels," *Front. Physiol.*, vol. 5, 2014, doi: 10.3389/fphys.2014.00065.
- [20] P. J. Bennett and M. A. Simmonds, "The influence of membrane cholesterol on the GABAA receptor," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 117, no. 1, pp. 87–92, Jan. 1996, doi: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15158.x.
- [21] G. T. Viel, Q. Yang, P. Lundahl, K. Ensing, and R. A. de Zeeuw, "Size-exclusion chromatographic reconstitution of the bovine brain benzodiazepine receptor Effects of lipid environment on the binding characteristics," *J Chromatogr A*, 1997.
- [22] T. Sooksawate and M. A. Simmonds, "Effects of membrane cholesterol on the sensitivity of the GABAA receptor to GABA in acutely dissociated rat hippocampal neurones," *Neuropharmacology*, vol. 40, no. 2, pp. 178–184, Jan. 2001, doi: 10.1016/S0028-3908(00)00159-3.
- [23] C. Nothdurfter *et al.*, "Lipid raft integrity affects GABAA receptor, but not NMDA receptor modulation by psychopharmacological compounds," *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, vol. 16, no. 6, pp. 1361–1371, Jul. 2013, doi: 10.1017/S146114571200140X.
- [24] J. A. Jackman and N.-J. Cho, "Model Membrane Platforms for Biomedicine: Case Study on Antiviral Drug

- Development,” *Biointerphases*, vol. 7, no. 1, p. 18, Dec. 2012, doi: 10.1007/s13758-011-0018-2.
- [25] L.-R. Montes, A. Alonso, F. M. Goñi, and L. A. Bagatolli, “Giant Unilamellar Vesicles Electroformed from Native Membranes and Organic Lipid Mixtures under Physiological Conditions,” *Biophys. J.*, vol. 93, no. 10, pp. 3548–3554, Nov. 2007, doi: 10.1529/biophysj.107.116228.
- [26] F. M. Menger and J. S. Keiper, “Chemistry and physics of giant vesicles as biomembrane models,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 2, no. 6, pp. 726–732, Jan. 1998, doi: 10.1016/S1367-5931(98)80110-5.
- [27] K. Hać-Wydro, “The replacement of cholesterol by phytosterols and the increase of total sterol content in model erythrocyte membranes,” *Chem. Phys. Lipids*, vol. 163, no. 7, pp. 689–697, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2010.07.001.
- [28] F. Evers *et al.*, “Elucidating the Mechanism of Lipid Membrane-Induced IAPP Fibrillogenesis and Its Inhibition by the Red Wine Compound Resveratrol: A Synchrotron X-ray Reflectivity Study,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 27, pp. 9516–9521, Jul. 2009, doi: 10.1021/ja8097417.
- [29] L. Picas, C. Suárez-Germà, M. T. Montero, Ò. Domènech, and J. Hernández-Borrell, “Miscibility Behavior and Nanostructure of Monolayers of the Main Phospholipids of Escherichia coli Inner Membrane,” *Langmuir*, vol. 28, no. 1, pp. 701–706, Jan. 2012, doi: 10.1021/la203795t.
- [30] M. S. Kent *et al.*, “Synthetic Polypeptide Adsorption to Cu-IDA Containing Lipid Films: A Model for Protein–Membrane Interactions,” *Langmuir*, vol. 24, no. 3, pp. 932–942, Feb. 2008, doi: 10.1021/la700940x.
- [31] P. Wydro, M. Flasiński, and M. Broniatowski, “Molecular organization of bacterial membrane lipids in mixed systems—A comprehensive monolayer study combined with Grazing Incidence X-ray Diffraction and Brewster Angle Microscopy experiments,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1818, no. 7, pp. 1745–1754, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.bbamem.2012.03.010.
- [32] Heimburg T. Physical Properties of Biological Membranes. Published online February 16, 2009. Accessed October 18, 2020. <http://arxiv.org/abs/0902.2454>
- [33] M. Aghaaminiha and S. Sharma, “Spatial Distribution of Cholesterol in Lipid Bilayers,” *Biophysics*, preprint, May 2019. doi: 10.1101/636845.
- [34] S. Leekumjorn and A. K. Sum, “Molecular Characterization of Gel and Liquid-Crystalline Structures of Fully Hydrated POPC and POPE Bilayers,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 21, pp. 6026–6033, May 2007, doi: 10.1021/jp0686339.
- [35] A. Preetha, R. Banerjee, and N. Huilgol, “Dynamic surface tensiometry of tissues using Langmuir films,” *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 40, no. 1, pp. 35–43, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.colsurfb.2004.10.006.
- [36] I. Felsztyna, M. A. Villarreal, D. A. García, and V. Miguel, “Insect RDL Receptor Models for Virtual Screening: Impact of the Template Conformational State in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels,” *ACS Omega*, vol. 7, no. 2, pp. 1988–2001, Jan. 2022, doi: 10.1021/acsomega.1c05465.
- [37] R. Verger and G. H. de Haas, “Enzyme reactions in a membrane model 1: A new technique to study enzyme reactions in monolayers,” *Chem. Phys. Lipids*, vol. 10, no. 2, pp. 127–136, Feb. 1973, doi: 10.1016/0009-3084(73)90009-1.
- [38] M. Kodama, O. Shibata, S. Nakamura, S. Lee, and G. Sugihara, “A monolayer study on three binary mixed systems of dipalmitoyl phosphatidyl choline with cholesterol, cholestanol and stigmasterol,” *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 33, no. 3–4, pp. 211–226, Feb. 2004, doi: 10.1016/j.colsurfb.2003.10.008.
- [39] M. S. Gastaldi, I. Felsztyna, V. Miguel, M. E. Sánchez-Borzzone, and D. A. García, “Theoretical and Experimental Study of Molecular Interactions of Fluralaner with Lipid Membranes,” *J. Agric. Food Chem.*, p. acs.jafc.2c06811, Jan. 2023, doi: 10.1021/acs.jafc.2c06811.
- [40] S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer, and W. Im, “CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM,” *J. Comput. Chem.*, vol. 29, no. 11, pp. 1859–1865, Aug. 2008, doi: 10.1002/jcc.20945.
- [41] J. P. M. Jämbeck and A. P. Lyubartsev, “Derivation and Systematic Validation of a Refined All-Atom Force Field for Phosphatidylcholine Lipids,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 116, no. 10, pp. 3164–3179, Mar. 2012, doi: 10.1021/jp212503e.
- [42] M. J. Abraham *et al.*, “GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers,” *SoftwareX*, vol. 1–2, pp. 19–25, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
- [43] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, “VMD: Visual molecular dynamics,” *J. Mol. Graph.*, vol. 14, no. 1, pp. 33–38, Feb. 1996, doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- [44] A. Olżyńska, M. Zubek, M. Roeselova, J. Korchowiec, and L. Cwiklik, “Mixed DPPC/POPC Monolayers: All-atom Molecular Dynamics Simulations and Langmuir Monolayer Experiments,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1858, no. 12, pp. 3120–3130, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.bbamem.2016.09.015.
- [45] T. J. Piggot, Á. Piñeiro, and S. Khalid, “Correction to Molecular Dynamics Simulations of Phosphatidylcholine Membranes: A Comparative Force Field Study,” *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 13, no. 4, pp. 1862–1865, Apr. 2017, doi: 10.1021/acs.jctc.7b00244.
- [46] A. West *et al.*, “How Do Ethanolamine Plasmalogens Contribute to Order and Structure of Neurological Membranes?,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 124, no. 5, pp. 828–839, Feb. 2020, doi: 10.1021/acs.jpcc.9b08850.
- [47] K. Murzyn, T. Róg, and M. Pasenkiewicz-Gierula, “Phosphatidylethanolamine-Phosphatidylglycerol Bilayer as a Model of the Inner Bacterial Membrane,” *Biophys. J.*, vol. 88, no. 2, pp. 1091–1103, Feb. 2005, doi: 10.1529/biophysj.104.048835.

- [48] S. Malcharek, A. Hinz, L. Hilterhaus, and H.-J. Galla, "Multilayer Structures in Lipid Monolayer Films Containing Surfactant Protein C: Effects of Cholesterol and POPE," *Biophys. J.*, vol. 88, no. 4, pp. 2638–2649, Apr. 2005, doi: 10.1529/biophysj.104.050823.
- [49] W.-C. Hung, M.-T. Lee, F.-Y. Chen, and H. W. Huang, "The Condensing Effect of Cholesterol in Lipid Bilayers," *Biophys. J.*, vol. 92, no. 11, pp. 3960–3967, Jun. 2007, doi: 10.1529/biophysj.106.099234.
- [50] J. Kobierski, A. Wnętrzak, A. Chachaj-Brekiesz, and P. Dynarowicz-Latka, "Predicting the packing parameter for lipids in monolayers with the use of molecular dynamics," *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 211, p. 112298, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.112298.
- [51] M. L. Berkowitz, "Detailed molecular dynamics simulations of model biological membranes containing cholesterol," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1788, no. 1, pp. 86–96, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.bbamem.2008.09.009.
- [52] B. J. Litman, E. N. Lewis, and I. W. Levin, "Packing characteristics of highly unsaturated bilayer lipids: Raman spectroscopic studies of multilamellar phosphatidylcholine dispersions," *Biochemistry*, vol. 30, no. 2, pp. 313–319, Jan. 1991, doi: 10.1021/bi00216a001.
- [53] M. Saeedimasine, A. Montanino, S. Kleiven, and A. Villa, "Role of lipid composition on the structural and mechanical features of axonal membranes: a molecular simulation study," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 8000, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-44318-9.
- [54] E. A. and P. K., "Differential Scanning Calorimetry Studies of Phospholipid Membranes: The Interdigitated Gel Phase," in *Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*, A. A. Elkordy, Ed., InTech, 2013, doi: 10.5772/51882.
- [55] C. Huang, "Mixed-chain phospholipids and interdigitated bilayer systems," *Klin. Wochenschr.*, vol. 68, no. 3, pp. 149–165, Feb. 1990, doi: 10.1007/BF01649079.
- [56] T. Róg and M. Pasenkiewicz-Gierula, "Cholesterol Effects on the Phosphatidylcholine Bilayer Nonpolar Region: A Molecular Simulation Study," *Biophys. J.*, vol. 81, no. 4, pp. 2190–2202, Oct. 2001, doi: 10.1016/S0006-3495(01)75867-5.
- [57] S. W. Chiu, E. Jakobsson, R. J. Mashl, and H. L. Scott, "Cholesterol-Induced Modifications in Lipid Bilayers: A Simulation Study," *Biophys. J.*, vol. 83, no. 4, pp. 1842–1853, Oct. 2002, doi: 10.1016/S0006-3495(02)73949-0.
- [58] H. Saito, T. Morishita, T. Mizukami, K. Nishiyama, K. Kawaguchi, and H. Nagao, "Molecular dynamics study of binary POPC bilayers: molecular condensing effects on membrane structure and dynamics," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 1136, p. 012022, Dec. 2018, doi: 10.1088/1742-6596/1136/1/012022.
- [59] M. B. Sankaram and T. E. Thompson, "Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin," *Biochemistry*, vol. 29, no. 47, pp. 10670–10675, Nov. 1990, doi: 10.1021/bi00499a014.
- [60] P. Wydro, M. Flasiński, and M. Broniatowski, "Does cholesterol preferentially pack in lipid domains with saturated sphingomyelin over phosphatidylcholine? A comprehensive monolayer study combined with grazing incidence X-ray diffraction and Brewster angle microscopy experiments," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 397, pp. 122–130, May 2013, doi: 10.1016/j.jcis.2013.01.060.
- [61] A. Bañuelos-Frias, V. M. Castañeda-Montiel, E. R. Alvizo-Paez, E. A. Vazquez-Martinez, E. Gomez, and J. Ruiz-Garcia, "Thermodynamic and Mechanical Properties of DMPC/Cholesterol Mixed Monolayers at Physiological Conditions," *Front. Phys.*, vol. 9, p. 636149, Mar. 2021, doi: 10.3389/fphy.2021.636149.
- [62] L. Huynh *et al.*, "Structural Properties of POPC Monolayers under Lateral Compression: Computer Simulations Analysis," *Langmuir*, vol. 30, no. 2, pp. 564–573, Jan. 2014, doi: 10.1021/la4043809.
- [63] E. Piosik, M. Ziegler-Borowska, D. Chelminiak-Dudkiewicz, and T. Martyński, "Effect of Aminated Chitosan-Coated Fe₃O₄ Nanoparticles with Applicational Potential in Nanomedicine on DPPG, DSPC, and POPC Langmuir Monolayers as Cell Membrane Models," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 5, p. 2467, Feb. 2021, doi: 10.3390/ijms22052467.
- [64] H. Yu and S.-W. Hui, "Merocyanine 540 as a probe to monitor the molecular packing of phosphatidylcholine: a monolayer epifluorescence microscopy and spectroscopy study," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1107, no. 2, pp. 245–254, Jun. 1992, doi: 10.1016/0005-2736(92)90411-E.
- [65] R.-X. Gu, S. Baoukina, and D. P. Tieleman, "Cholesterol Flip-Flop in Heterogeneous Membranes," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 15, no. 3, pp. 2064–2070, Mar. 2019, doi: 10.1021/acs.jctc.8b00933.
- [66] Y. Gao *et al.*, "Exploring the Interaction Mechanism of Desmethyl-broflanilide in Insect GABA Receptors and Screening Potential Antagonists by *In Silico* Simulations," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 68, no. 50, pp. 14768–14780, Dec. 2020, doi: 10.1021/acs.jafc.0c05728.
- [67] C. T. Szlenk, J. B. Gc, and S. Natesan, "Does the Lipid Bilayer Orchestrate Access and Binding of Ligands to Transmembrane Orthosteric/Allosteric Sites of G Protein-Coupled Receptors?," *Mol. Pharmacol.*, vol. 96, no. 5, pp. 527–541, Nov. 2019, doi: 10.1124/mol.118.115113.
- [68] D. Marsh, "Lateral pressure in membranes," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.*, vol. 1286, no. 3, pp. 183–223, Oct. 1996, doi: 10.1016/S0304-4157(96)00009-3.

7. ANEXO

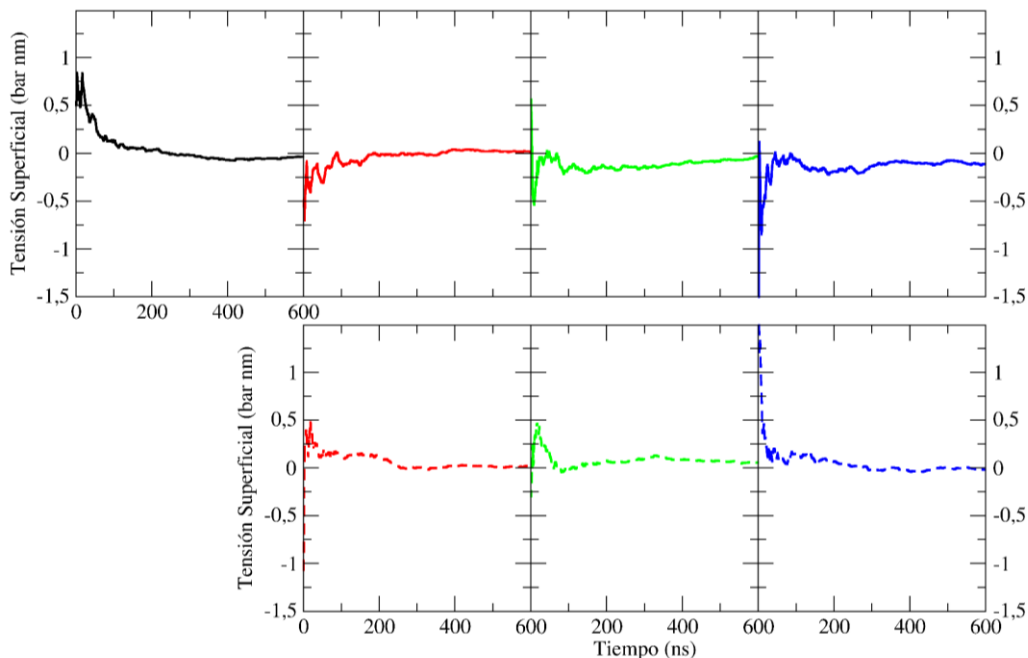


Figura 1. Tensión superficial en función del tiempo en ausencia de fluralaner. Representados los sistemas POPC (negro) junto a los sistemas POPC-COL (líneas enteras) y POPC-POPE (líneas punteadas). POPC-COL y POPC-POPE 9:1 (rojo), POPC-COL y POPC-POPE 7:3 (verde), POPC-COL y POPC-POPE 1:1 (azul).

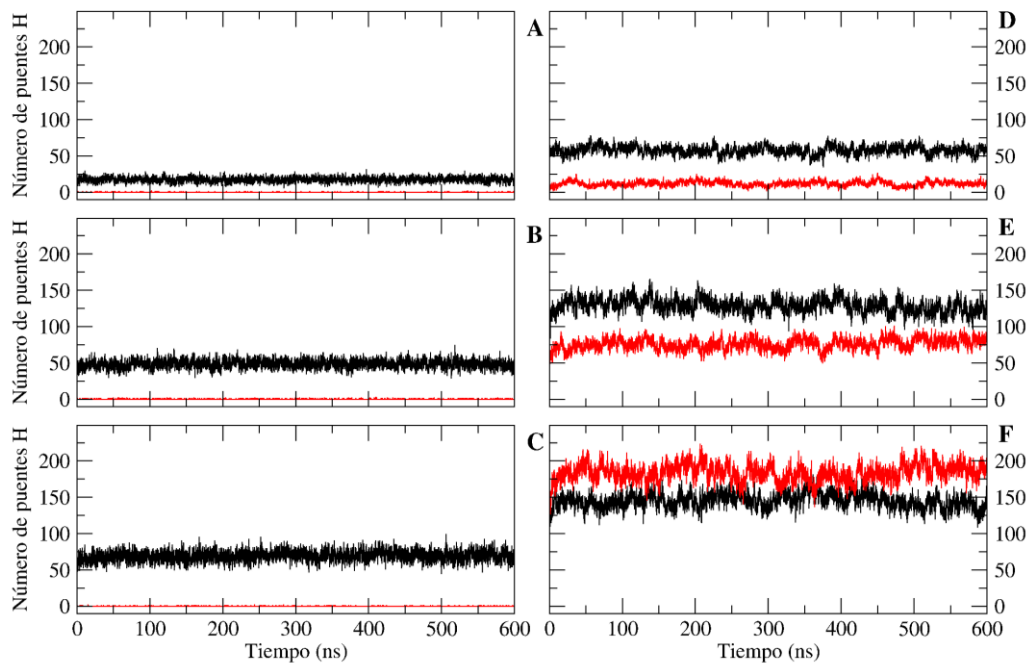


Figura 2. Análisis de los puentes de hidrógeno entre los componentes de la bicapa en ausencia de fluralaner. Número de puentes hidrógeno en función del tiempo. Concentraciones crecientes de COL 9:1, 7:3 y 1:1 (A-C). Concentraciones crecientes de POPE 9:1, 7:3 y 1:1 (D-F). POPC-COL/POPE (negro), COL o POPE entre sí (rojo).

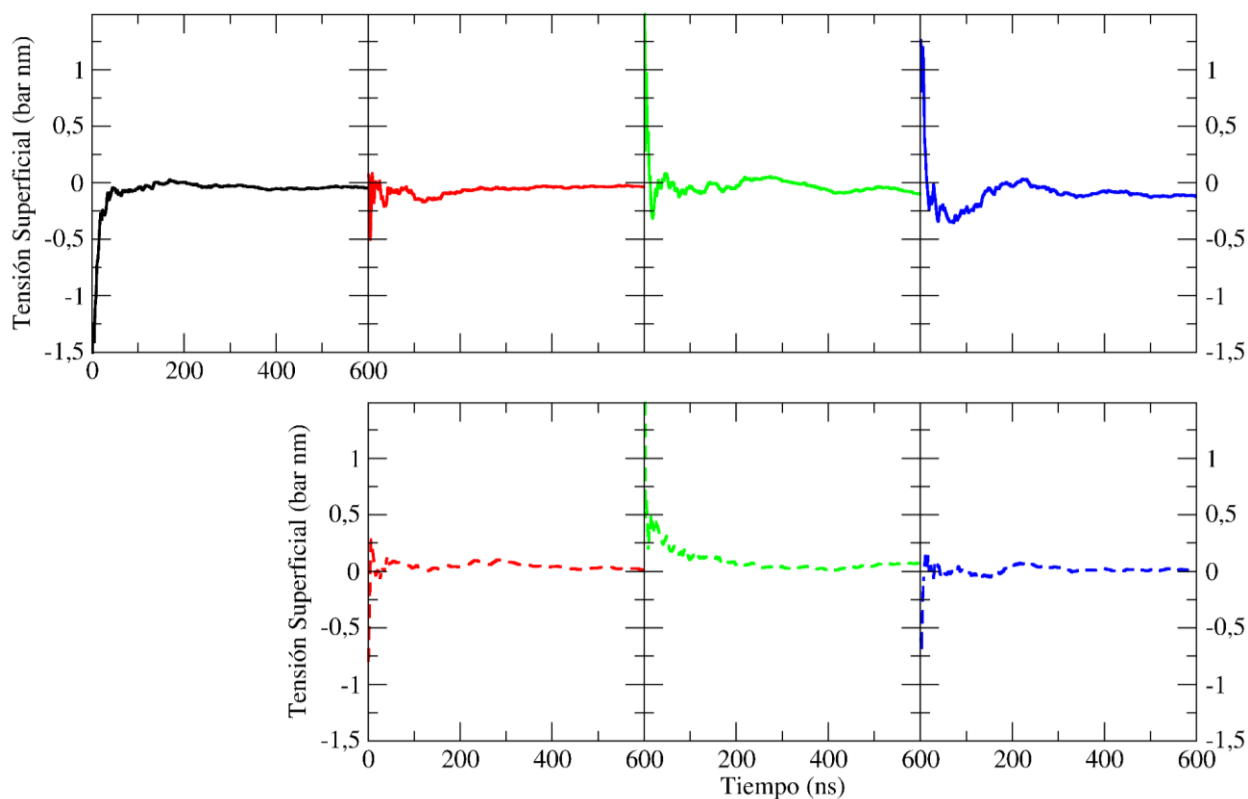


Figura 3. Tensión superficial en función del tiempo en presencia de fluralaner. Representados los sistemas POPC (negro) junto a los sistemas POPC-COL (líneas enteras) y POPC-POPE (líneas punteadas). POPC-COL y POPC-POPE 9:1 (rojo), POPC-COL y POPC-POPE 7:3 (verde), POPC-COL y POPC-POPE 1:1 (azul).

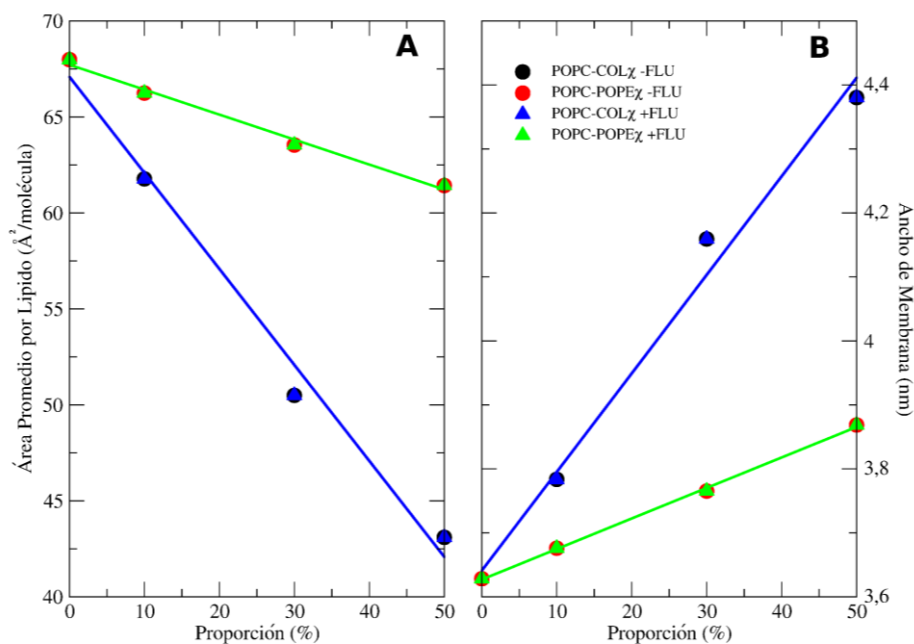


Figura 4. Valores de MMA (A) y Ancho de Membrana (B) en función de la proporción creciente de COL (negro y azul) y POPE (rojo y verde) en ausencia (círculos) y presencia (triángulos) de fluralaner. Para todos los casos, las regresiones cuentan con valores de R^2 de 0,99.

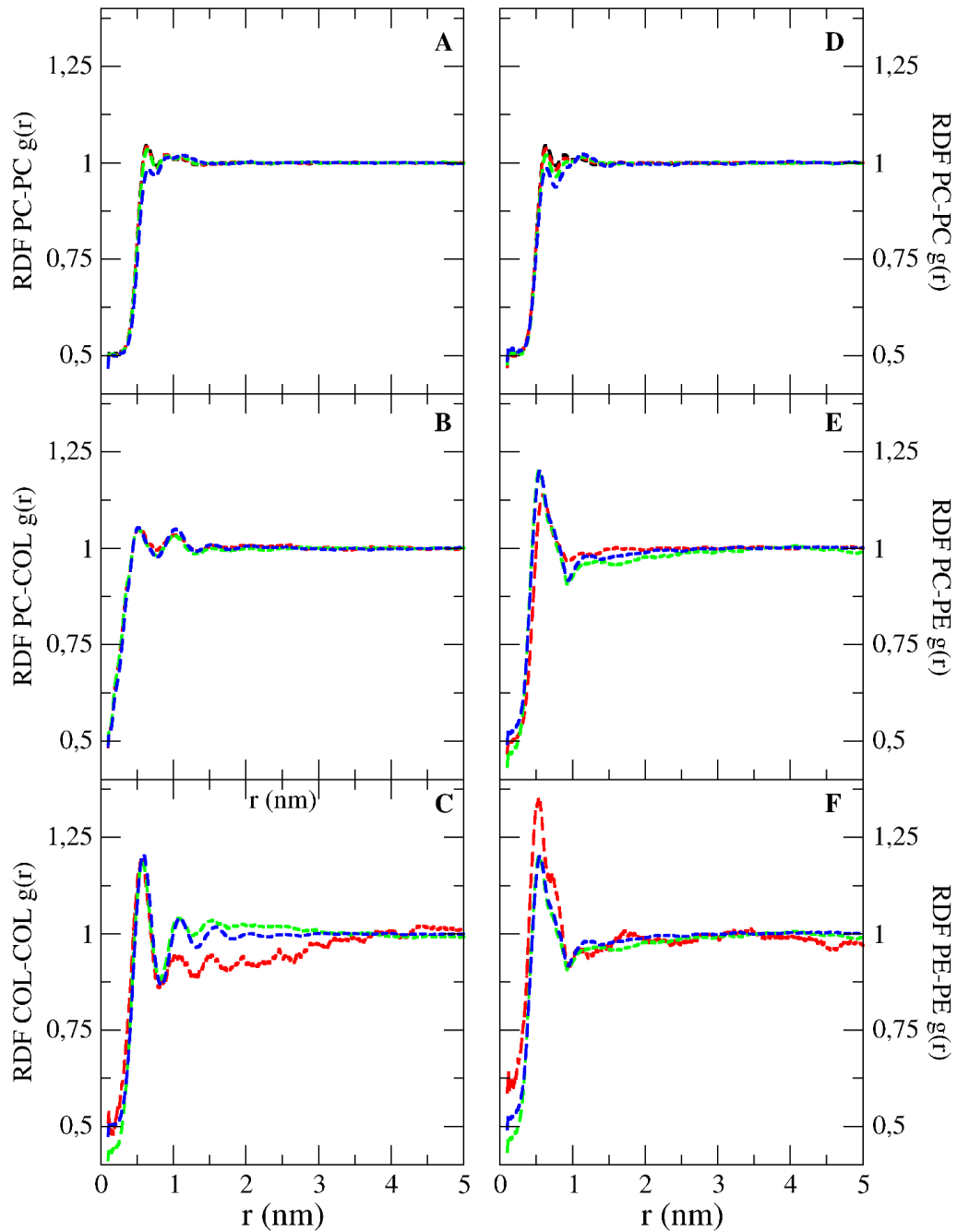


Figura 5. Análisis RDF en presencia de fluralaner (líneas punteadas). Realizado entre átomos de fósforo de POPC respecto a sí mismos (A y D), entre el átomo de oxígeno O32 del POPC y el grupo hidroxilo del COL (B), entre los átomos de fósforo del POPC respecto a los del POPE (E), entre los grupos hidroxilos del COL entre sí (C) y los átomos de fósforo del POPE entre sí mismos (F). POPC (negro), POPC-COL y POPC-POPE 9:1 (rojo), POPC-COL y POPC-POPE 7:3 (verde) y POPC-COL y POPC-POPE 1:1 (azul).

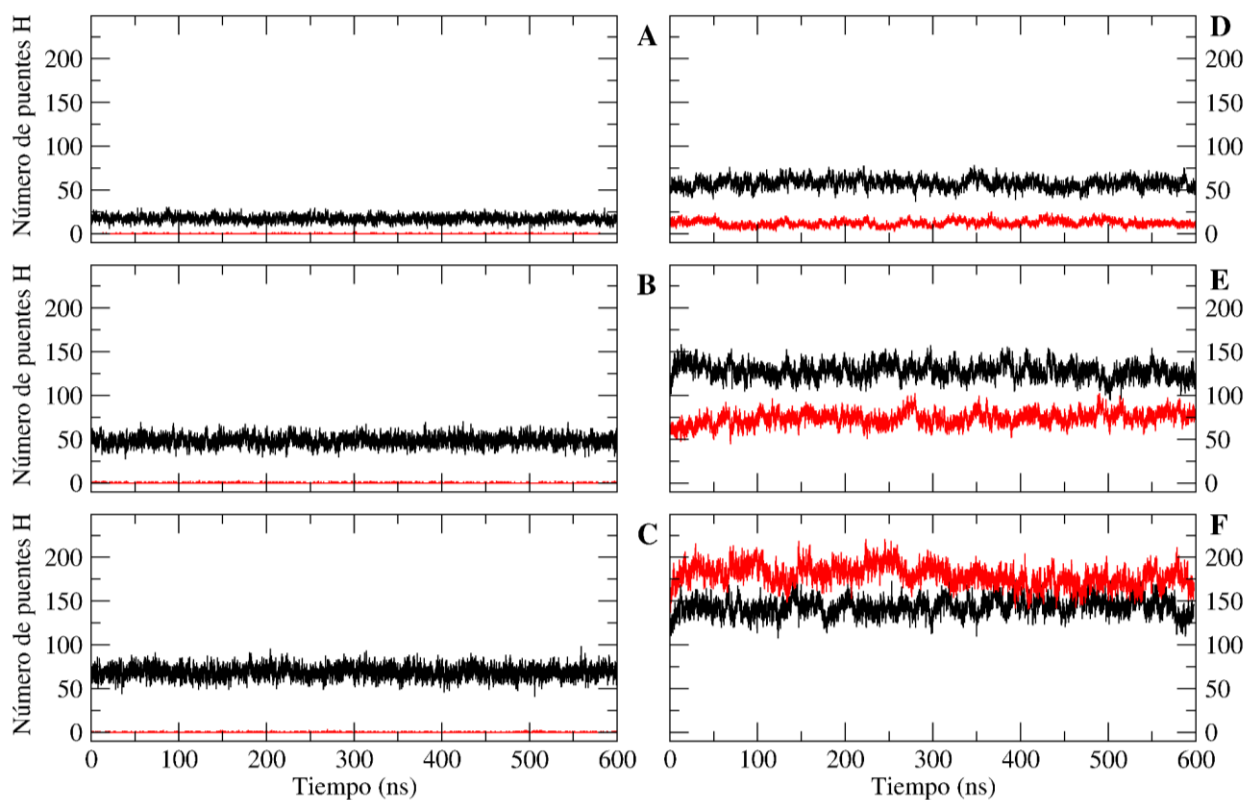


Figura 6. Análisis de los puentes de hidrógeno entre los componentes de la bicapa en presencia de fluralaner. Número de puentes hidrógeno en función del tiempo. Concentraciones crecientes de COL 9:1, 7:3 y 1:1 (A-C). Concentraciones crecientes de POPE 9:1, 7:3 y 1:1 (D-F). POPC-COL/POPE (negro), COL o POPE entre sí (rojo).

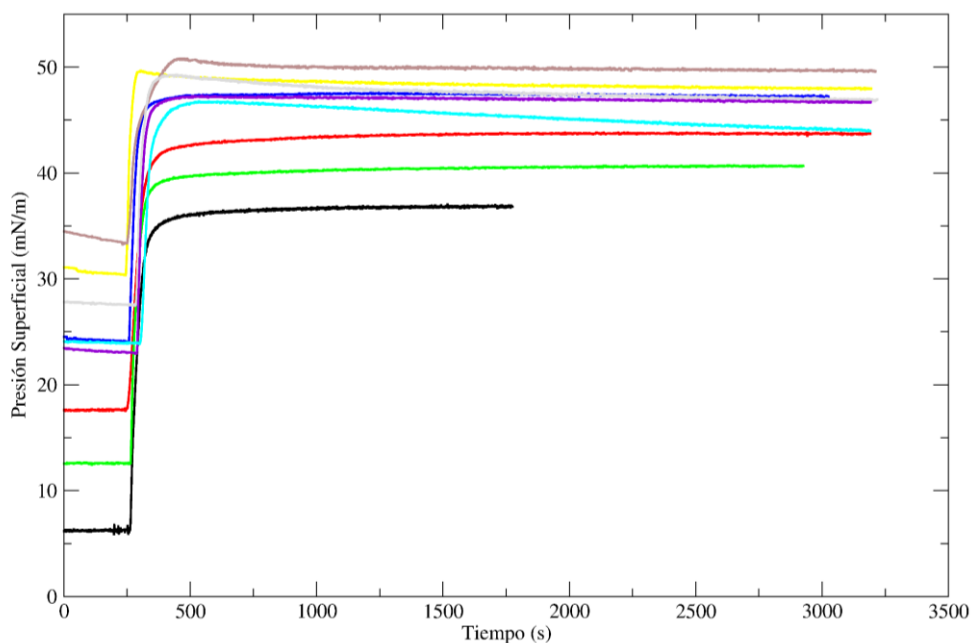


Figura 7. Presión superficial en función del tiempo a área constante para el sistema POPC. A partir de estas curvas se obtuvieron gráficos de $\Delta\pi$ vs. π_i para la obtención de los valores de MIP.

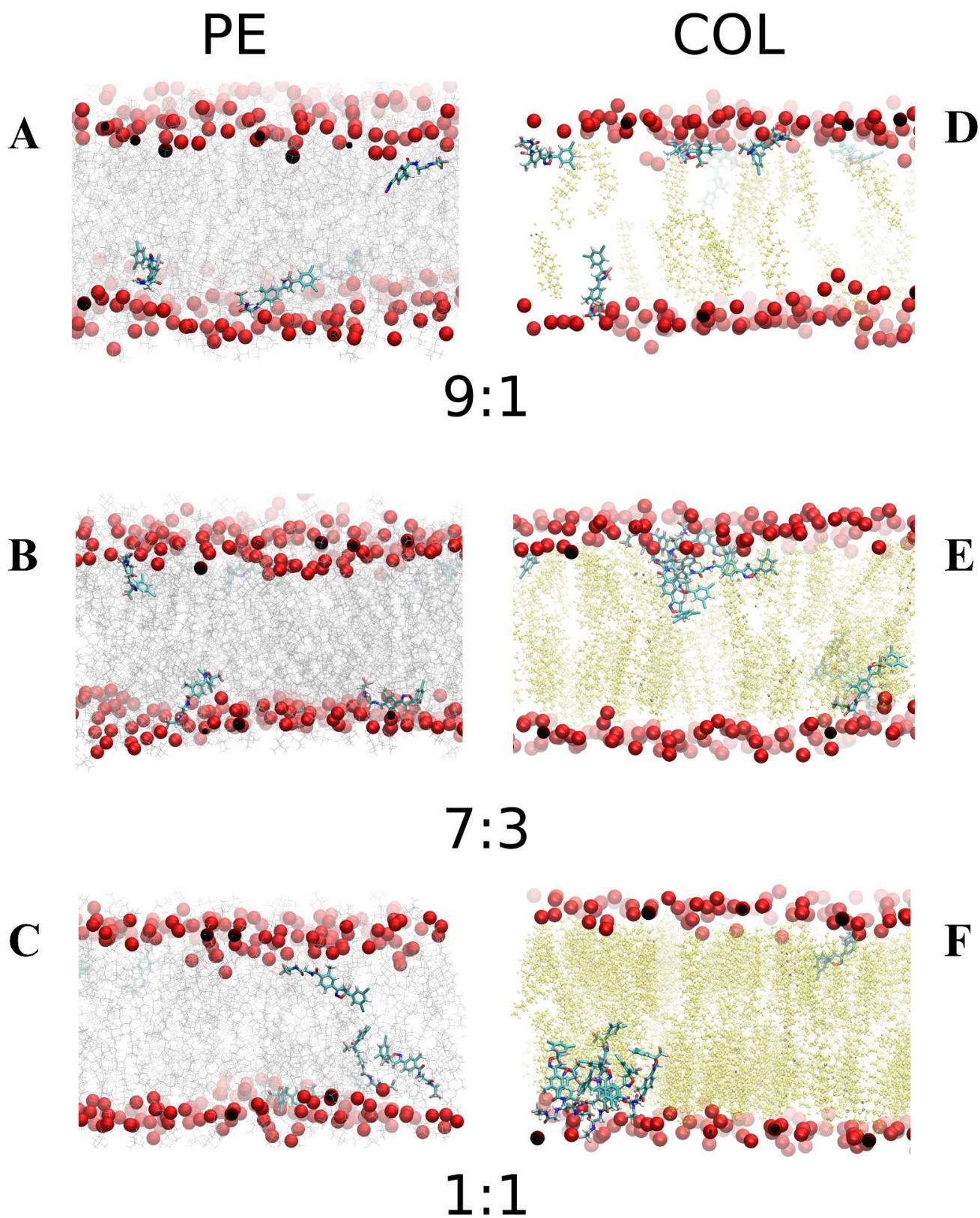


Figura 8. Capturas de SDM de un corte transversal de las bicapas lipídicas esquematizando la distribución del fluralaner en el plano Z para los sistemas POPC-POPE (A-C) y POPC-COL (D-F). Representados los átomos de fósforo (esferas rojas), las cadenas acílicas (plateado), COL (dorado) y fluralaner (cian).

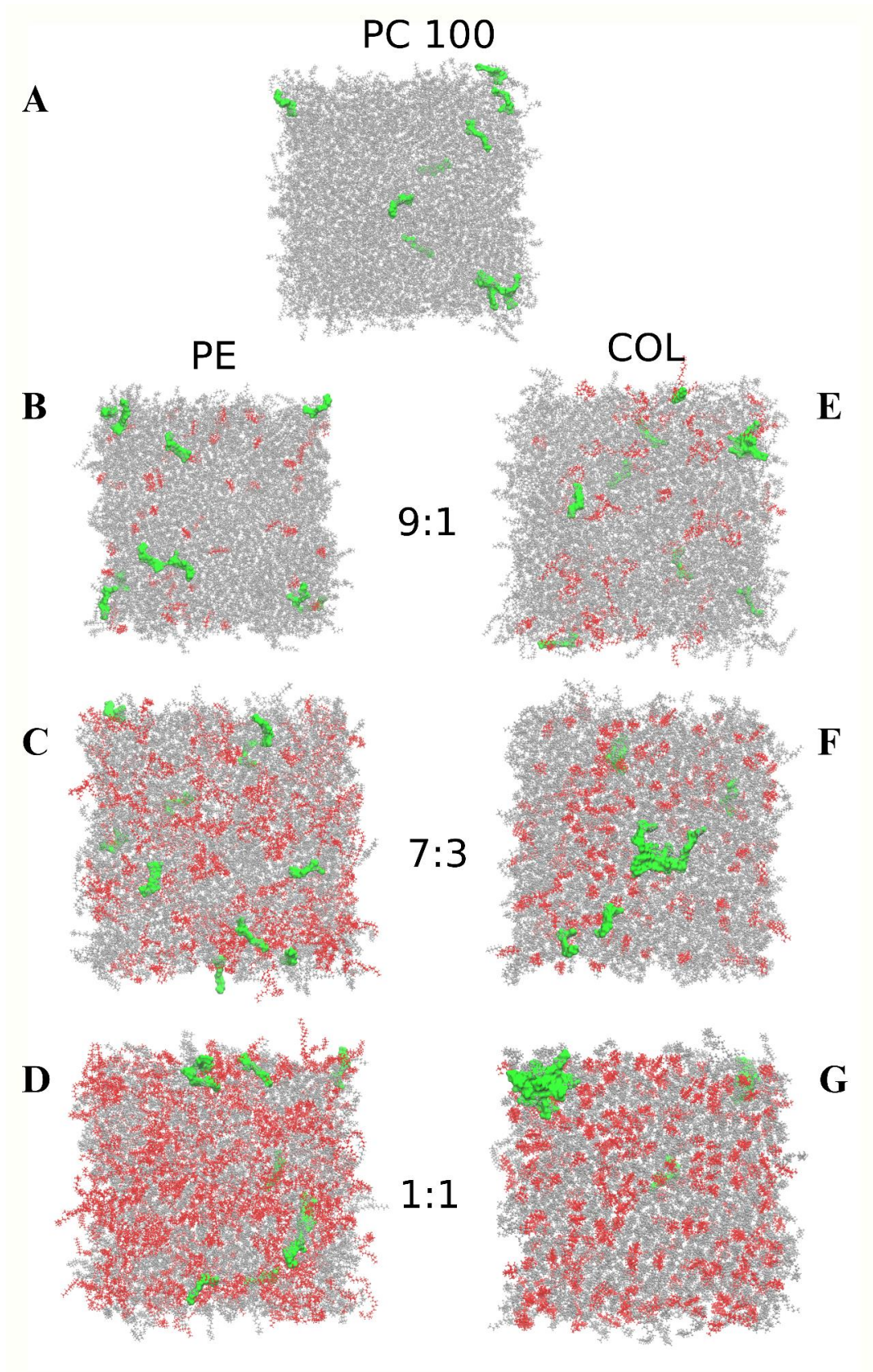


Figura 9. Capturas de SDM de la vista superior para los sistemas POPC, y POPC con POPE y COL esquematizando la distribución del fluralaner en el plano XY. Representadas las moléculas de POPC (plateado), POPE y COL según corresponda (rojo) y fluralaner (verde). POPC (A), POPC-COL 9:1 (B), POPC-COL 7:3 (C), POPC-COL 1:1 (D), POPC-POPE 9:1 (E), POPC-POPE 7:3 (F), POPC-POPE 1:1 (G).