

UNIVERSIDAD EAFIT

TESIS DE MAESTRÍA

Comportamiento de fase y elástico de bicapas lipídicas
mediante Dinámica Molecular

Autor:

Margarita VALDERRAMA M.

Asesores:

Luis Alejandro GÓMEZ, PhD

Jorge León DAVID, PhD

Trabajo de grado presentado como requisito
para obtener el título de Magíster en Física Aplicada

18 de marzo de 2020

«Certainly no subject or field is making more progress on so many fronts at the present moment than biology, and if we were to name the most powerful assumption of all, which leads one on and on in an attempt to understand life, it is that all things are made of atoms, and that everything that living things do can be understood in terms of the jiggings and wiggings of atoms.»

Richard Feynman

Resumen

La bicapa lipídica es la estructura fundamental de las membranas biológicas. Por tanto, las alteraciones en la composición y organización de estos ensamblajes biológicos repercute de forma directa sobre las propiedades físicas y los procesos celulares. A pesar del esfuerzo y el perfeccionamiento de los métodos experimentales para tratar de develar los eventos moleculares que definen el efecto de la variación de estos lípidos, aún no es posible hacer generalizaciones o predecir como un sistema de membrana determinado responderá a un tipo particular de modificación de sus lípidos. En vista de las limitaciones experimentales, las simulaciones computacionales se vuelven una herramienta versátil para comprender estos sistemas biológicos. Durante más de cuatro décadas se ha avanzado sustancialmente en la comprensión teórica de estos ensamblajes biológicos. No obstante, los sistemas de bicapas que consideran las interacciones átomo a átomo vía Dinámica Molecular aún se simplifican en la composición, considerando configuraciones de bicapas compuestas con dos lípidos diferentes como máximo, lo cual genera una visión limitada de las características físico-químicas de estos ensamblajes biológicos. Por tanto, proponemos realizar simulaciones computacionales vía Dinámica Molecular de bicapas lipídicas de sistemas con una composición más compleja.

Inicialmente, determinamos que la cantidad de moléculas de agua y lípidos necesarias para representar de forma acertada las propiedades físicas y elásticas de estos ensamblajes biológicos es 12000 y 300, respectivamente. Para este análisis se construyeron 72 modelos de bicapas monocomponentes de DPPC, con una composición variada de este lípido y de moléculas de agua. Posteriormente, comparamos los campos de fuerza CHARMM-36 y Slipids, con el fin de seleccionar el modelo que represente de forma más precisa estos sistemas. Para ello, se construyeron modelos de bicapas monocomponentes de DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfolina) y se encontró que el campo de fuerza Slipids sobreestima las propiedades estructurales de este modelo respecto a lo experimental. Una vez seleccionado el campo de fuerza CHARMM-36, se examinó el comportamiento termotrópico para distintos sistemas monocomponente de DPPC. Con esto se pudo evidenciar el cambio en el comportamiento de fase y las propiedades estructurales correspondientes a cada una de las fases. Finalmente, se investigó el efecto del colesterol y la temperatura sobre bicapas multicomponentes en los que se variaron las proporciones de glicerosfolípidos y esfingomielina. Para ello se encontró que el incremento del colesterol al 30% resulta en un incremento significativo de los módulos elásticos. Todas las simulaciones se llevaron a cabo empleando el software GROMACS-5.1. Todos los sistemas fueron ensamblados empleando la herramienta CHARMM-GUI.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que con su apoyo académico y humano contribuyeron en el desarrollo de mi trabajo de investigación. En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad EAFIT por el financiamiento de la maestría y el proyecto de investigación titulado 'Simulación Computacional en Bicapas Fosfolipídicas'. Especialmente, a mis tutores el Dr. Luis Alejandro Gómez y el Dr. Jorge León David, por la acertada orientación, el soporte y la discusión crítica que me permitió el desarrollo del trabajo realizado. Asimismo, agradezco al Dr. César Pérez y al Dr. Rodrigo Ochoa por las valiosas discusiones en temas de Dinámica Molecular y, a todos los profesores que hicieron parte de mi formación académica. A todo el equipo del Centro de Computación Científica de la Universidad EAFIT, Apolo; especialmente a Juan David Pineda y Johan Sebastián Yepes, por su ayuda en el acceso y uso de este recurso computacional. Adicionalmente, agradezco a todos los compañeros con los que compartí el desarrollo de este proceso de formación. Especialmente a Cristian por traer tanta luz y felicidad a mi vida. Finalmente, agradezco a mi familia por todo el apoyo, la empatía y el permanente amor.

Índice general

Resumen	III
Agradecimientos	IV
1. Introducción	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Justificación	2
1.3. Objetivo general	3
1.4. Objetivos específicos	3
1.5. Alcance del proyecto	3
2. Marco Teórico	4
2.1. Membranas Biológicas	4
2.1.1. Composición lipídica de las membranas biológicas	5
2.1.2. Cambio en la composición y su relevancia fisiológica	7
2.1.3. Comportamiento de fase	8
2.1.4. Dinámica y propiedades físicas	10
2.2. Modelos físicos	13
2.2.1. Dinámica Molecular	14
2.2.2. Aspectos generales de la Dinámica Molecular	15
2.2.2.1. Construcción del sistema molecular	16
2.2.2.1. Campo de Fuerza	17
2.2.2.3. Métodos de integración	20
2.2.2.3. Algoritmos de restricción	21
2.2.2.5. Ensamblés	22
2.2.2.5. Paquetes computacionales	23
2.2.3. Campos de Fuerza para Lípidos	24
2.2.1.1. Validación	25
2.2.4. Campos de Fuerza para el agua	26
3. Optimización del tamaño del sistema	27
3.1. Introducción	27
3.2. Metodología	28
3.2.1. Sistemas de bicapas lipídicas	28
3.2.2. Detalles computacionales	28
3.2.3. Análisis de datos	29
3.3. Resultados	30
3.3.1. Propiedades estructurales de la bicapa	30
3.3.2. Propiedades elásticas	32
3.3.3. Sistema de interés	33

3.4. Conclusiones	35
4. Variación del Campo de Fuerza	36
4.1. Introducción	36
4.2. Metodología	37
4.2.1. Sistemas de bicapas lipídicas	37
4.2.2. Detalles computacionales	37
4.2.3. Análisis de datos	38
4.3. Resultados y Discusión	38
4.3.1. Estabilidad del sistema	38
4.3.2. Propiedades estructurales	38
4.4. Discusión y conclusiones	42
5. Comportamiento de fase en bicapas lipídicas monocomponentes	44
5.1. Introducción	44
5.2. Metodología	44
5.2.1. Sistemas de bicapas lipídicas	44
5.2.2. Detalles computacionales	45
5.2.3. Análisis de datos	45
5.3. Resultados y discusión	46
5.3.1. Comportamiento termotrópico del DPPE	50
5.3.2. Comportamiento termotrópico del DPPS	52
5.3.3. Comportamiento termotrópico del PSM	55
5.4. Conclusiones	58
6. Comportamiento de fase y elástico de bicapas lipídicas heterogéneas	60
6.1. Introducción	60
6.2. Metodología	61
6.2.1. Sistemas de bicapas lipídicas	61
6.2.2. Detalles computacionales	61
6.2.3. Análisis de datos	62
6.3. Resultados y discusión	63
6.3.1. Conclusiones	67
7. Conclusiones y Trabajo Futuro	73
A. Capítulo 3	74
Bibliografía	82

Índice de figuras

2.1. Estructura molecular de los lípidos	5
2.2. Composición lipídica de las membranas biológicas de mamíferos . .	6
2.3. Estructuras de las fases lipídicas	9
2.4. Escalas espaciales y temporales de la dinámica de la membranas . .	10
2.5. Representación gráfica del campo de fuerza	14
2.6. Procesos que se emplean en la Dinámica Molecular	16
3.1. Características de los sistemas simulados.	28
3.2. Área por lípido	30
3.3. Densidad electrónica	33
3.4. Parámetro de orden	34
3.5. Función de distribución radial	35
4.1. Comparación de la Densidad Electrónica	39
4.2. Comparación del Área por Lípido	40
4.3. Espesor de los sistemas	41
4.4. Comparación del parámetro de orden	41
4.5. Comparación de la función de distribución radial	42
5.1. Comportamiento termotrópico para una bicapa de DPPC	46
5.2. Área por lípido para el DPPC a diferentes temperaturas	47
5.3. Variación en el espesor y el perfil de densidad para el DPPC	47
5.4. Variación en el parámetro de orden para el DPPC	48
5.5. Variación en el MSD para el DPPC	49
5.6. Comportamiento termotrópico para una bicapa de DPPE	50
5.7. Área por lípido para el DPPE a diferentes temperaturas	51
5.8. Variación en el espesor y el perfil de densidad para el DPPE	52
5.9. Variación en el parámetro desorden para el DPPE	52
5.10. Variación en el MSD para el DPPE	53
5.11. Área por lípido para el DPPS a diferentes temperaturas	53
5.12. Comportamiento termotrópico para una bicapa de DPPS	54
5.13. Variación en el espesor y el perfil de densidad para el DPPS	55
5.14. Variación en el parámetro desorden para el DPPE	55
5.15. Variación en el MSD para el DPPE	56
5.16. Área por lípido para el PSM a diferentes temperaturas	56
5.17. Comportamiento termotrópico para una bicapa de PSM	57
5.18. Variación en el espesor y el perfil de densidad para el PSM	58
5.19. Variación en el parámetro desorden para el PSM	58
6.1. Estructuras químicas de los lípidos	61
6.2. Área por Lípido	63

6.3. Espesor	64
6.4. Módulo de rigidez	65
6.5. Módulo de compresibilidad	66
6.6. Visualización del sistema con 0% de colesterol	68
6.7. Visualización del sistema con 10% de colesterol	69
6.8. Visualización del sistema con 20% de colesterol	70
6.9. Visualización del sistema con 30% de colesterol	71
6.10. Visualización del sistema con 40% de colesterol	72
A.1. Variación en el área por lípido para $N_L=90$	74
A.2. Variación en el área por lípido para $N_L=100$	75
A.3. Variación en el área por lípido para $N_L=120$	75
A.4. Variación en el área por lípido para $N_L=140$	76
A.5. Variación en el área por lípido para $N_L=160$	76
A.6. Variación en el área por lípido para $N_L=180$	77
A.7. Variación en el área por lípido para $N_L=200$	77
A.8. Variación en el área por lípido para $N_L=220$	78
A.9. Variación en el área por lípido para $N_L=220$	78
A.10. Variación en el área por lípido para $N_L=260$	79
A.11. Variación en el área por lípido para $N_L=280$	79
A.12. Variación en el área por lípido para $N_L=300$	80
A.13. Variación en el parámetro de orden	81

Índice de cuadros

3.1. Propiedades estructurales de las simulaciones	31
3.2. Propiedades elásticas de las simulaciones	32
4.1. Propiedades estructurales y elásticas de las simulaciones.	39
6.1. Composición de los sistemas de bicapas simulados	62

Lista de abreviaturas

CHOL	Colesterol
CL	Cardiolipina
DM	Dinámica Molecular
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfocolina
DPPE	1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina
DPPE	1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfo-L-serina
DMPI	1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfoinositol
PSM	Esfingomielina
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
PS	Fosfatidilserina
POPC	Palmitoil-fosfatidilcolina

Capítulo 1

Introducción

En este capítulo se establece el marco general de la investigación en bicapas lipídicas empleando la DM. A continuación, se expone el planteamiento del problema, la justificación, los objetivos y el alcance del proyecto de investigación.

1.1. Planteamiento del problema

La bicapa lipídica es la estructura fundamental de las membranas biológicas. Por tanto, las alteraciones en la composición y organización de estos ensamblajes biológicos repercute de forma directa sobre las propiedades físicas y los procesos celulares [163, 101]. De hecho, la evidencia experimental resalta que el cambio en la composición de ácidos grasos, fosfolípidos y el contenido de colesterol en estas estructuras biológicas produce alteraciones tanto en la fluidez de la membrana como en las funciones celulares [148, 159]. De hecho, estas alteraciones se encuentran estrechamente relacionadas con diferentes patologías como la obesidad, el Alzheimer, la aterosclerosis y el cáncer. A pesar del esfuerzo y el perfeccionamiento de los métodos experimentales para tratar de develar los eventos moleculares que definen el efecto de la variación de estos lípidos, aún no es posible hacer generalizaciones o predecir cómo un sistema de membrana determinado responderá a un tipo particular de modificación de sus lípidos [148].

En vista de las limitaciones experimentales y con el ánimo de comprender en mayor detalle los eventos moleculares encargados de la organización y estructura de estos ensamblajes biológicos, las simulaciones computacionales se vuelven una herramienta versátil para hacer aproximaciones y observaciones sobre estos sistemas biológicos [70]. Además, permiten obtener información que puede emplearse como evidencia preliminar para diseñar estudios de mayor complejidad técnica y costo. Durante más de cuatro décadas se ha avanzado sustancialmente en la comprensión teórica de estos ensamblajes biológicos bajo la implementación de simulaciones por Dinámica Molecular. No obstante, los sistemas de bicapas que consideran las interacciones átomo a átomo vía DM aún se simplifican en la composición y arquitectura, considerando configuraciones de bicapas compuestas con un solo o dos tipos de lípidos, lo cual genera una visión limitada de las características físico-químicas de estos ensamblajes biológicos [95]. Por tanto, proponemos realizar simulaciones computacionales vía DM de bicapas lipídicas donde se evidencie el cambio en la composición de lípidos para sistemas con una composición heterogénea. Esto se realizará a partir de un campo de fuerza existente. Todo ello, con el fin de contribuir al conocimiento

de las propiedades físicas y mecánicas de los sistemas seleccionados, entre las cuales se incluye la fluidez y las transiciones de fase.

1.2. Justificación

Las membranas biológicas son sistemas muy complejos que consisten de una variedad amplia de lípidos, esteroides, proteínas y carbohidratos [163, 101]. Dadas las propiedades físicas de estos sistemas biológicos se forman compartimentos que permiten delimitar el medio exterior en las células y en diversas estructuras intracelulares [101, 34]. Así mismo, estos arreglos biológicos están involucrados en una variedad de procesos celulares y tienen un rol activo en la vida de la célula, la regulación del transporte de distintas moléculas y la señalización celular [34, 102, 148]. De hecho, las membranas de las organelas difieren ampliamente en el contenido lipídico, lo cual no es una característica arbitraria; por el contrario, esta extraordinaria diversidad en las estructuras químicas de los lípidos es fundamental para mantener la función y la estabilidad celular [101, 150]. Por ejemplo, diversos estudios han puesto de manifiesto que el cambio en la composición de glicerofosfolípidos y el contenido de colesterol en las membranas biológicas puede alterar tanto la fluidez de la membrana como las funciones celulares [148, 159]. No obstante, los efectos de la modificación de los lípidos en la función celular son muy complejos y aún no es posible hacer generalizaciones o predecir cómo un sistema determinado responderá a un tipo particular de modificación de lípidos [148].

El entendimiento de los procesos moleculares de estos sistemas biológicos se pueden abordar a partir de métodos experimentales. La dispersión de neutrones [173] y la difracción de rayos X [156, 173, 157] son probablemente las técnicas experimentales más poderosas para determinar la estructura a nivel atómico de estos sistemas químicos. Otras técnicas experimentales incluyen, la Resonancia Magnética Nuclear [17, 168], la espectroscopía infrarroja [104] y la espectroscopía de fluorescencia [24]. A pesar del desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas experimentales, a menudo es imposible obtener todos los detalles atómicos solo mediante experimentos. Por lo tanto, con el ánimo de comprender en mayor detalle los eventos moleculares encargados de la organización y estructura de estos ensamblajes biológicos, las simulaciones computacionales se vuelven una herramienta versátil para hacer aproximaciones y observaciones sobre estos sistemas biológicos [70]. No obstante, las simulaciones a nivel atómico aún se simplifican en la composición y arquitectura, considerando configuraciones de bicapas compuestas con un solo o dos tipos de lípidos, lo cual genera una visión limitada de las características físico-químicas de estos ensamblajes biológicos [95]. Por tanto, proponemos realizar simulaciones computacionales vía DM de bicapas lipídicas donde se evidencie el cambio en la composición de lípidos para sistemas con una composición heterogénea. Esto se realizará a partir de un campo de fuerza existente. Todo ello, con el fin de contribuir al conocimiento de las propiedades físicas y mecánicas de los sistemas seleccionados, entre las cuales se incluye el comportamiento de fase, algunos parámetros de orden, la difusión y, el comportamiento mecánico de estos sistemas.

1.3. Objetivo general

Simular vía Dinámica Molecular bicapas lipídicas que permitan entender los efectos de las variaciones en la composición de los lípidos sobre las principales propiedades físicas y mecánicas. Esto se realizará ya sea empleando un campo de fuerza existente o haciendo un híbrido de este modelo matemático.

1.4. Objetivos específicos

- Construir modelos de bicapas lipídicas, con un énfasis en ensamblajes de composición heterogénea, con el fin de llevar a cabo simulaciones vía Dinámica Molecular de estos sistemas.
- Seleccionar un campo de fuerza para los sistemas de bicapas lipídicas construidos, a partir de los resultados de la validación, con el fin de determinar un modelo adecuado para capturar y predecir propiedades de estos sistemas biológicos.
- Determinar y analizar distintas propiedades físicas y mecánicas de los sistemas seleccionados, a partir de los resultados de las simulaciones. Esto, con la finalidad de establecer las diferencias en la organización y el comportamiento de estos ensamblajes biológicos.

1.5. Alcance del proyecto

Se hará entrega de un manuscrito de trabajo de grado que cumpla con los lineamientos de la universidad para optar al título de Magíster en Física Aplicada. Además, se someterá una publicación científica en una revista indexada. El aspecto diferenciador de este proyecto de investigación es la determinación de propiedades físicas y elásticas de bicapa lipídica con una composición heterogénea mediante simulaciones por DM. Esto, dado que las simulaciones a escala atómica han reducido la complejidad de estos ensamblajes biológicos en su composición.

Capítulo 2

Marco Teórico

En este capítulo se establece el marco conceptual sobre el cual se fundamenta el estudio de las bicapas lipídicas vía DM. Primero, se examina en retrospectiva como la ciencia ha descubierto los secretos de estos ensamblajes biológicos, a partir de los distintos modelos propuestos para las membranas biológicas. Luego, desde una perspectiva experimental se presentan las características de estos sistemas, la composición lipídica de distintas células y organelas, el comportamiento de fase y, las propiedades físicas y dinámicas de estos ensamblajes. Finalmente, se examina los fundamentos físicos para llevar a cabo simulaciones computacionales para estos sistemas complejos. Para ello, se hace un comparativo de los distintos modelos matemáticos que se pueden emplear para la comprensión de cualquier compuesto químico. Una vez establecida la DM como la metodología más aceptada para la comprensión de estos ensamblajes biológicos, se detallará el modelo matemático (el Campo de Fuerza), los algoritmos y los paquetes computacionales necesarios para la implementación de este método computacional en sistemas de bicapas lipídicas.

2.1. Membranas Biológicas

Toda la vida en la Tierra es mucho más similar de lo que es diferente. Los organismos vivos comparten una serie de propiedades bioquímicas esenciales, denominadas colectivamente "Threads of life". Dentro de estas propiedades esenciales se incluye la presencia de una membrana plasmática circundante que separa el entorno interior de la célula del medio externo. El concepto de membrana biológica fue concebido y desarrollado a partir del siglo XIX [2,3]. En 1825, Overton sugirió que la célula tenía una barrera de carácter hidrofóbico, la cual delimitaba el medio exterior. En 1925, Gorter y Grendel sugirieron que los lípidos forman bicapas en contacto con el agua [47]. Posteriormente, en 1950, Robertson propuso una estructura de tres capas, donde dos de estas capas eran proteínas que se unían a una capa de lípidos ubicada en el medio de éstas [139]. Unos años más tarde, Lenard y Singer sugirieron un modelo revisado, en el que las proteínas no solo se encontraban ancladas a las superficies de estas estructuras lipídicas, sino que también se encontraban embebidas en el medio lipídico [82].

El concepto actual de la estructura de la membrana se basa en el modelo de mosaico fluido descrito por Singer y Nicolson en 1972 [146]. En este modelo, las membranas biológicas se componen de una mezcla compleja de lípidos, proteínas y carbohidratos, cuya composición es dependiente del tejido y las organelas. En el modelo de Singer y Nicolson, la función de las membranas biológicas no se limita a

un mecanismo de barrera. Por el contrario, este ensamble biológico adquiere un rol dinámico y funciones diversas y vitales para el mantenimiento de las células, entre las cuales se encuentra el transporte de moléculas y la regulación del pH. De hecho, la membrana actúa como una barrera selectiva, es decir, permite que los nutrientes se concentren dentro del medio celular, excluyendo los productos de desecho de la célula y, manteniendo los gradientes iónicos, los cuales posteriormente se transforman en energía química.

2.1.1. Composición lipídica de las membranas biológicas

Los mayores componentes de las membranas biológicas son proteínas y lípidos (especialmente fosfolípidos y esteroides) [34, 40, 102]. De hecho, se ha estimado que la variación en los grupos de las cabezas polares y las cadenas alifáticas de los fosfolípidos permiten la existencia de más de 1,000 especies diferentes de lípidos en cualquier célula eucariota [150]. Curiosamente, los fosfolípidos y esteroides no están distribuidos homogéneamente a través de las organelos principales de los mamíferos [102, 101], lo cual permite a las distintas organelas y células tener características propias a sus funciones celulares (p.ej. la permeabilidad, la curvatura, la elasticidad, la formación de dominios y la fluidez). De hecho, diversos estudios han puesto de manifiesto que el cambio en la composición lipídica de las membranas biológicas se encuentra asociado con diferentes patologías [148, 159].

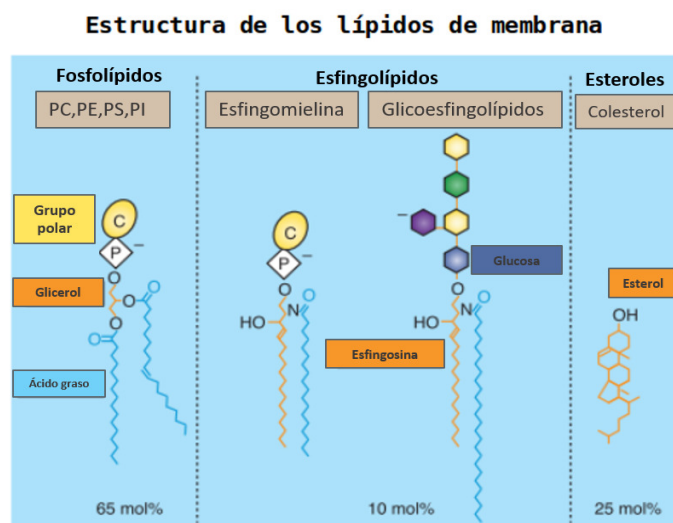


FIGURA 2.1: Estructura molecular general de los lípidos presentes en las distintas membranas de mamíferos. Adaptado de [102]

Las membranas biológicas de las bacterias, arqueas y eucariotas comparten el glicerol como el constituyente primordial de la mayor parte de sus lípidos [101, 102]. En particular, las membranas de los mamíferos están constituidas esencialmente de glicerofosfolípidos disaturados, esfingolípidos complejos y colesterol (**Figura 2.1**). Desafortunadamente no se conoce con precisión la composición lipídica detallada de la membrana de cada organela [102]. Esto, dado que los análisis cuantitativos de

composición se han restringido a ciertas clases de lípidos, principalmente a glicerofosfolípidos y esfingolípidos que contienen fosfato, y escasamente se han incluido glicosfingolípidos y colesterol en estos análisis. Además, en múltiples estudios no se ha obtenido una purificación por encima del 50% de las membranas de estas organelas, impidiendo así conocer detalladamente su composición. No obstante, es un hecho que estas organelas difieren ampliamente en su composición lipídica [163].

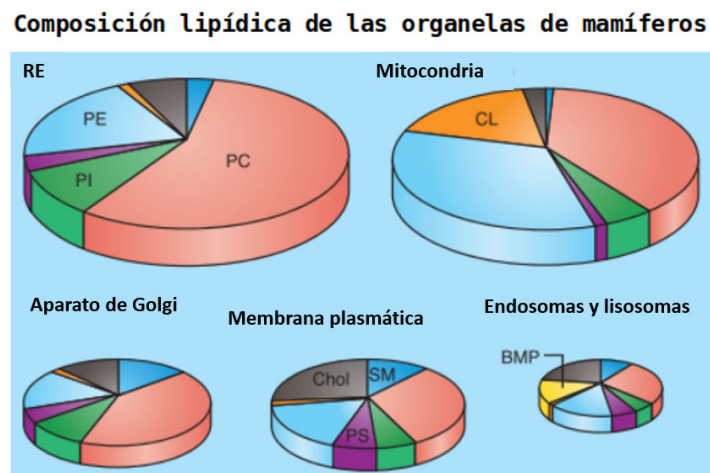


FIGURA 2.2: Distribución de fosfolípidos y colesterol en las distintas organelas de mamíferos. Adaptado de [102]

Las biomembranas de los mamíferos típicamente contienen entre cinco a diez clases principales de lípidos (**Figura 2.2**), que son necesarios para procesos tales como la fusión y escisión de vesículas y la transducción de señales [102]. Los fosfolípidos más abundantes que componen las membranas de estos organismos son: PC, PI, PS, PE, PG y CL; esta última encontrada en mayor proporción en las mitocondrias [71]. La PC y el PI son los glicerofosfolípidos eucariotas más abundantes [102]. Debido a sus dos cadenas de ácidos grasos y una gran cabeza polar, la PC tiene una forma cilíndrica. Por lo general, las PC contienen una cadena saturada y una no saturada [163, 40, 159]. En contacto con el agua se produce un efecto hidrofóbico, lo cual le confiere una organización en forma de membrana fluida [129]. Por el contrario, la mayoría de las moléculas de PE que se encuentran en las membranas biológicas tienen forma de cono y no forman bicapas lipídicas por sí mismas. La inclusión de PE en bicapas con PC impone un esfuerzo de curvatura sobre la membrana, el cual se emplea para la incorporación funcional de las proteínas de membrana y para procesos tales como la fusión y la fisión [163]. En condiciones de neutralización de carga, la CL también tiene una preferencia por una configuración que no es de tipo bicapa. Cabe resaltar, que la propensión a no formar bicapa de PE y CL depende de la longitud y el nivel de insaturación de sus cadenas de ácidos grasos [163].

Además de los fosfolípidos a base de glicerol, los eucariotas invariablemente poseen esfingolípidos y esteroides. Los esfingolípidos generalmente contienen un ácido graso saturado que está en un rango de 16 a 32 carbonos con un enlace amida en la base esfingoide (**Figura 2.2**). Los esfingolípidos generalmente adoptan una fase tipo

“gel”, no obstante, adquieren un carácter fluido por los esteroides, que preferentemente interactúan con ellos en la membrana. Los esfingolípidos y esteroides se encuentran de forma abundante en la membrana plasmática y en los endosomas [163]. Hecho que les confiere a estas membranas una resistencia mecánica extraordinaria. El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi se encuentran conformados principalmente por PC y PI. Además de las diferencias claras entre los organelos, considerando una estratificación de la membrana con respecto a la orientación del lípido al citosol. Todos los lípidos, a excepción de las esfingomielina (un esfingolípido) y los complejos de glicosfingolípidos, se distribuyen de forma simétrica en las valvas de las membranas del RE, el aparato de Golgi y las membranas plasmáticas y endosomales en el lado no citosólico (lado luminal), con una gran abundancia de PS y PE [101]. Esta distribución asimétrica de los lípidos tiene importantes consecuencias funcionales. Por ejemplo, cuando se expone en la superficie de la célula, PS actúa como una señal de susceptibilidad para la fagocitosis y como una señal de propagación en la coagulación de la sangre [163].

2.1.2. Cambio en la composición y su relevancia fisiológica

Las variación de lípidos y el colesterol en las membranas celulares son lo suficientemente amplias para alterar la fluidez de la membrana y afectar diversas funciones celulares, entre las cuales se encuentra el transporte mediado por portadores, las propiedades de ciertas enzimas unidas a la membrana, la unión a la insulina y los receptores opiáceos, la fagocitosis, la endocitosis, la exocitosis dependiente de la despolarización, la producción de prostaglandinas y crecimiento celular [148, 78, 117, 118]. Muchas de las respuestas funcionales probablemente son causadas directamente por los cambios estructurales de los lípidos de la membrana, que en efecto altera de forma global la fluidez de la membrana o los dominios lipídicos [148]. La conformación o las estructuras cuaternarias de ciertos transportadores, receptores y enzimas probablemente se vean afectados por los cambios en la estructura de su microambiente lipídico, lo cual conduce a cambios en su actividad [163]. No obstante, los efectos de la modificación de los lípidos de membranas en la función celular son muy complejos y a menudo varían de un tipo de célula a otro [148]. Por lo tanto, aún no es posible hacer generalizaciones o predecir cómo un sistema determinado responderá a un tipo particular de modificación de lípidos [148, 57].

Para evidenciar con más precisión lo dicho anteriormente se expondrán algunas patologías asociadas con los componentes de estas membranas biológicas. Algunos estudios han mostrado cómo el cambio en la composición de fosfolípidos trae consigo beneficios para inhibir tumores y la metástasis [93, 44]. Las membranas de células tumorales de próstata y mama presentan una mayor concentración de balsas lipídicas (ricas en colesterol), lo cual se encuentra asociado con una mayor propensión a la apoptosis; así, en el estudio llevado a cabo por Clement et al., [93] lograron poner en evidencia que la PC reduce fuertemente la adhesión a las células tumorales. Por otro lado, Fukunaga et al., [44] alimentaron ratas con fosfolípidos abundantes en ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), mostrando así un incremento significativo en la tasa de apoptosis de las células cancerosas inducidas

a carcinogénesis de colon con 1,2-dimetilhidracina. Por otro lado, en un modelo de metástasis utilizando células de melanoma de ratón B16. F10, en pretratamiento con liso fosfatidilcolina hidrogenado resultó en la inhibición de al menos el 50% de las lesiones metastásicas en ratones [62].

Por otro lado, se ha evidenciado cómo los fosfolípidos reducen los niveles de colesterol total en plasma. Un estudio realizado por Rossmeisl et al., [140] en ratones, contrastaron dietas compuestas por triglicéridos contra fosfolípidos con alto contenido de EPA y DHA, encontrando que el grupo alimentado con dietas ricas en fosfolípidos presentaron una mayor capacidad para conservar un perfil metabólico saludable en condiciones obesogénicas. El estudio realizado por Wilson et al., [175] en monos y ratones mostró que los suplementos con PC de soya, disminuyen los niveles del colesterol plasmático sin afectar los niveles de HDL en plasma, los cuales se tienden a reducir durante una dieta hipolipídica; exponiendo una vez más el efecto positivo de los fosfolípidos al ser asociados en las membranas celulares de diferentes órganos. Adicionalmente, los fosfolípidos se caracterizan por tener un rol esencial en la integridad y función adecuada de las membranas neuronales, incluyendo las membranas sinápticas [160, 35]. La pérdida de la sinapsis y la disfunción característica del Alzheimer se ha relacionado con la degeneración de las membranas de las neuronas y aumento en la degradación de los fosfolípidos de membrana [125]. Finalmente, estudios realizados con suplementos de fosfolípidos de soya demostraron ser efectivos con relación a la reducción del estrés, mejorando la memoria, motilidad y cognición, disminuyendo así la neurodegeneración en pacientes con enfermedad de Alzheimer, y mejorando parámetros asociados a la concentración en humanos y animales [35].

2.1.3. Comportamiento de fase

Los lípidos se autoensamblan en una amplia variedad de fases, las cuales se generan en función de la estructura química y de las variables externas como el contenido de agua, la temperatura, la presión y la composición de la fase acuosa [152, 75]. Estas fases tienen una arquitectura muy particular, las cuales se agregan por el efecto hidrofóbico. Estas formas están relacionadas entre sí y se transforman unas en otras mediante transiciones de fase impulsadas por las variables ya mencionadas. No obstante, la temperatura y el contenido de lípidos son las variables que más alteran el comportamiento de fase. Experimentalmente, este comportamiento termotrópico se puede recrear y analizar a partir de la calorimetría diferencial de barrido de alta sensibilidad (DSC). Esencialmente, esta técnica es ideal para la determinación de las transiciones de fase para membranas compuestas de lípidos puros y de mezclas de lípidos con otros componentes. De hecho, esta técnica permite calcular las temperaturas de transición de fase (T_m) y las entalpías de transición para fases lamelares [61, 8]. Una secuencia generalizada de la transición de fase de los glicerofosfolípidos en relación a la temperatura es [152]:

$$L_c \Leftrightarrow L_\beta \Leftrightarrow P_{\beta'} \Leftrightarrow L_\alpha \Leftrightarrow Q_{II}^B \Leftrightarrow H_{II} \Leftrightarrow Q_{II}^M \Leftrightarrow M_{II}$$

Al incrementar la temperatura de estos sistemas, la fase lamelar subgel o líquido-ordenado (L_c) se transforma en una fase lamelar gel (L_β), ésta sucesivamente toma

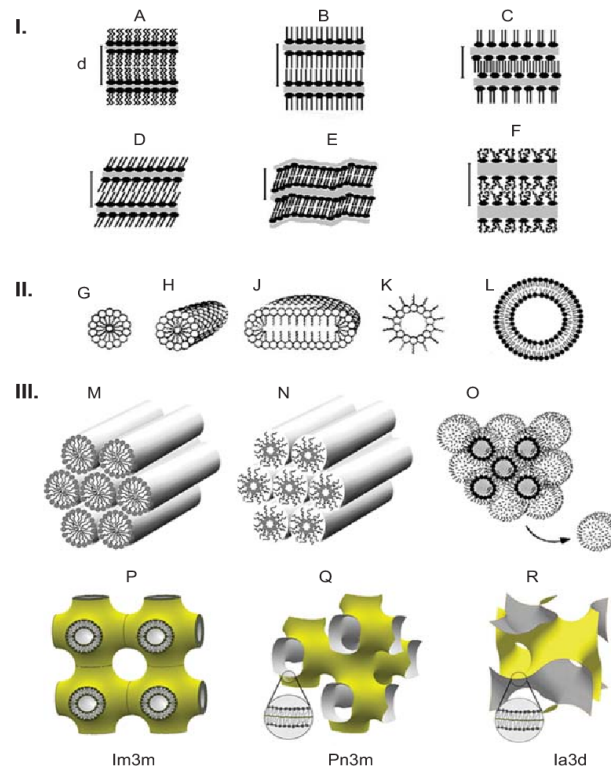


FIGURA 2.3: Representación gráfica de las diferentes fases lipídicas. I. Fase Lamelar: (A) subgel, L_c ; (B) gel, $L\beta$; (C) gel interdigitado, $L\beta$ int; (D) gel de cadenas inclinadas, $L\beta'$; (E) gel ondulado, $P\beta'$; (F) líquido cristalino, $L\alpha$. II. Agregados micelares; (G) micelas esféricas, MI; (H) micelas cilíndricas (Tubulares); (J) discos; (K) micelas invertidas, MII; (L) Liposoma; III. Diferentes topologías de fases líquido-cristalinas no laminares; (M) fase hexagonal HI; (N) fase hexagonal invertida HII; (O) fase cúbica micelar invertida QII M; (P) fase cúbica de bicapas (QII) $Im3m$; (Q) fase cúbica de bicapas $Pn3m$; (R) fase cúbica de bicapas $Ia3d$. Tomado de [75]

una estructura lamelar líquido-cristalina ($L\alpha$). Tras un aumento adicional de la temperatura, una serie de transiciones de fase mesomórficas continúan en la secuencia, la fase de bicapa cúbica $L\alpha-Q_{II}^B$, hexagonal invertido H_{II} , cúbico micelar invertido Q_{II}^M y, finalmente micelar M_{II} . De hecho, algunos lípidos pueden formar dos o más modificaciones de una fase dada, por ejemplo, fases de gel de diferentes estructuras (interdigitadas, inclinadas, onduladas; ver **Figura 2.3** C-E) y fases cúbicas de dos capas de topología diferente (ver **Figura 2.3** P-R). También se han reportado fases intermedias de lípidos, por ejemplo, el estado líquido ordenado ubicado entre las fases de gel y la fase líquido-cristalina.

Sin duda el mayor descubrimiento de la biología de membranas fue el establecimiento de las membranas biológicas como un ensamble compuesto por una bicapa lipídica líquido-cristalina con proteínas embebidas en ellas [146]. No obstante, la fase líquido-cristalina de estos ensambles puede variar en respuesta a la temperatura y la composición lipídica, induciendo una serie de propiedades que le permite a las células y organelas adaptarse a una serie de cambios ambientales o a diversos mecanismos celulares [106, 14, 17, 53]. Por ejemplo, la fase gel de las membranas

biológicas ha cobrado gran importancia en la función de los dominios y en la modulación de la actividad enzimática de las proteínas de membrana. De hecho, diferentes estudios han mostrado el rol activo de las estructuras no lamelares en los procesos de fusión y fisión. Asimismo, en algunos tipos de membranas biológicas se producen estructuras de bicapas de larga vida con un pequeño radio de curvatura (p.ej. el retículo endoplásmico, la membrana mitocondrial interna y los cuerpos prolamelares).

2.1.4. Dinámica y propiedades físicas

La dinámica de las membranas biológicas se lleva a cabo en diferentes escalas espaciales y temporales. Las fluctuaciones espaciales en las membranas biológicas van desde movimientos colectivos de miles de lípidos que abarcan micrómetros, hasta movimientos moleculares individuales en fracciones de nanómetros. Por otro lado, las fluctuaciones temporales van desde vibraciones en los enlaces de hidrógeno, que se producen en femtosegundos hasta la formación de poros en segundos.

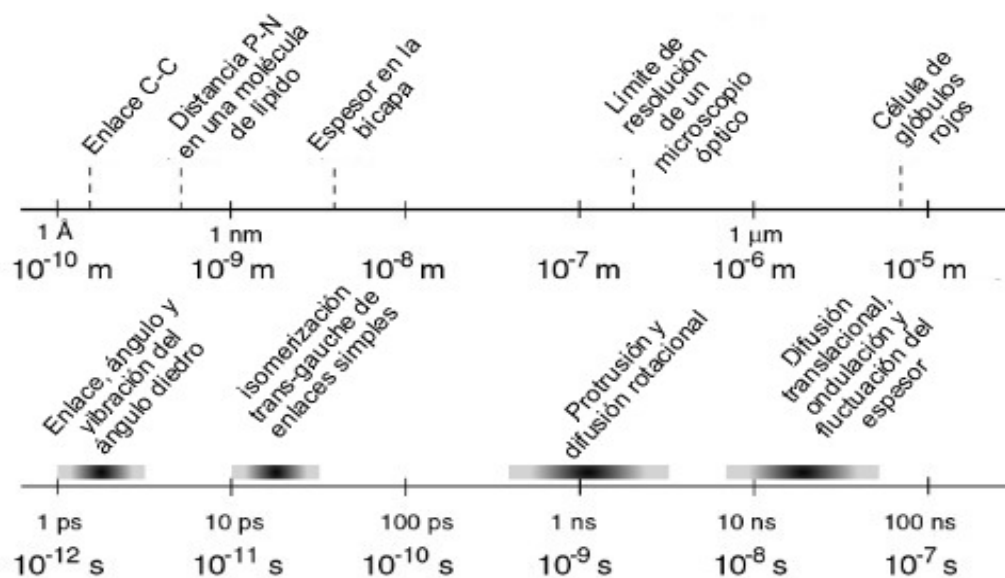


FIGURA 2.4: Escalas espaciales y temporales de la dinámica de las membranas biológicas. Tomado de [59]

Diferentes técnicas experimentales se han implementado para develar la estructura molecular y comportamiento de estos sistemas biológicos [154]. La difracción de neutrones y rayos X son probablemente las técnicas más poderosas para determinar estructuras químicas en una escala atómica. Desafortunadamente, la fase líquida-cristalina está altamente desordenada y solo se observan unos pocos picos de difracción. No obstante, se han hecho progresos considerables para dilucidar experimentalmente la estructura de una bicapa. Desde 1994 Nagle et al. [158] han empleado técnicas de difracción de rayos X para descifrar la organización estructural de sistemas de bicapas lipídicas. De hecho, en 2018 caracterizaron a través de difracción de rayos X de ángulo corto de alta resolución un sistema de DPPC, logrando determinar

los factores de forma y parámetros estructurales para este sistema en una fase tipo gel [111].

La técnica experimental que más facilita la validación de las simulaciones para modelos de bicapas es sin duda la RMN [154]. Esta técnica permite la obtención de dinámicas que se llevan a cabo en tiempos cortos, dado que permite conocer el tiempo de relajación de distintos grupos químicos de las moléculas de lípidos. En los últimos años, la RMN se ha reconocido nuevamente la robustez de esta técnica para validar simulaciones por DM [115] e incluso se ha creado un repositorio colectivo para el almacenamiento de información de estos parámetros predichos por simulaciones por DM (www.nmr lipids .fi .). El parámetro de orden es una de las propiedades experimentales determinadas con mayor precisión y se encuentran fácilmente disponibles a partir de simulaciones [154]. De hecho, Nagle et al. [109] han demostrado que las estimaciones para el área por lípido, otra de las propiedades esenciales para la validación, puede derivarse de los perfiles de parámetros de orden. La mejor estimación para el área por lípido en DPPC usando la RMN fue 0.622 nm^2 , en buen acuerdo con el valor (0.63 nm^2) determinado recientemente por difracción de rayos X.

Adicionalmente, se han implementado numerosas técnicas experimentales para caracterizar la organización y las propiedades físico-químicas de estos sistemas; técnicas como la Espectroscopia de Resonancia Magnética Electrónica, las mediciones de fluorescencia, la espectroscopía Raman, la calorimetría diferencial de barrido para estudiar las transiciones de fase y, sin duda, muchas otras. Aunque estos resultados disponen información valiosa sobre estos sistemas, estos resultados generalmente no son lo suficientemente generales o precisos como para proporcionar pruebas críticas para la validez de una simulación por DM [153].

Como se había mencionado anteriormente, una de las propiedades que se pueden adquirir de forma experimental y vía simulación por DM es el área por lípido, A_L . A menudo, es considerada como una propiedad clave en los estudios de simulación, dado que se encuentra relacionada con el nivel de fluidez de la bicapa [130]. Por lo tanto, además de ser fundamental para validar el campo de fuerza (como se discutirá más adelante), se emplea como un indicador de la relevancia de este modelo matemática en interpretar el modelo biológico. Las fluctuaciones térmicas en la estructura lateral y transversal de las bicapas lipídicas impiden la determinación inequívoca del A_L [41, 86]. De hecho, la dificultad de determinar el valor de A_L experimentalmente se evidencia por el hecho de que los valores revisados se publican regularmente [130]. Los enfoques utilizados para derivar el área por lípido contienen incertidumbres intrínsecas y suposiciones críticas. Experimentalmente, el A_L normalmente se infiere a partir de propiedades que se obtienen de forma directa. Por ejemplo, Petrace et al. [124] propuso que el valor del A_L de una especie de lípidos k en una fase dada podría derivarse de los datos volumétricos y los perfiles de densidad electrónica de las bicapas que consisten solo en el lípido k o un lípido de referencia, solo si el lípido de referencia y el lípido k tienen el mismo grupo polar [130].

Es notable que los valores del A_L han variado sustancialmente con el perfeccionamiento de las técnicas experimentales durante las últimas décadas [130]. De hecho, los valores del A_L varían usando la misma técnica experimental. La incertidumbre en el valor de esta propiedad indica que el A_L no permite comprender de forma precisa la calidad del campo de fuerza o el comportamiento de fase de estos sistemas [130]. Por lo tanto, se requiere evaluar ésta y otras propiedades para tener mayor certeza de la validez del campo de fuerza y el comportamiento de fase de estos ensamblajes biológicos. En las simulaciones por DM, el área por lípido se define como el área de la sección transversal (A_{XY}) de todo el sistema a lo largo del plano superficial de la bicapa (plano XY), dividido por la mitad de las moléculas del total de lípidos (N_L) presentes en la bicapa, es decir,

$$A_L = \frac{A_{XY}}{2N_L} \quad (2.1)$$

Por otro lado, los parámetros de orden de deuterio ($-S_{cd}$) cuantifican el grado de orden en las cadenas carbonadas que comprenden la región del núcleo hidrofóbico de una bicapa, con valores más bajos que implican más desorden. Los parámetros de orden promediados en conjunto y en el tiempo para las bicapas ensambladas se calculan en función de θ , el ángulo entre el vector C–H de un átomo de carbono en la cadena hidrocarbonada y un vector normal de la bicapa. Este parámetro de orden se obtiene usando la siguiente ecuación:

$$-S_{cd} = \frac{1}{2} \langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle \quad (2.2)$$

El parámetro de espacio real más común derivado de rayos X y experimentos de dispersión de neutrones es el espesor de la bicapa [130]. Sin embargo, no existe una definición única del grosor de la bicapa. Una forma de determinar este espesor de la bicapa lipídica es usar la siguiente expresión matemática:

$$D_{PP} = D - D_W \quad (2.3)$$

Donde, D es la longitud en el eje Z de la bicapa y el contenido de agua; D_{PP} es la longitud en el eje Z de la bicapa, D_w es la longitud en el eje Z donde están contenidas las capas de agua. El módulo de compresibilidad (K_A) se obtiene insertando la constante de Boltzmann (K_B), la temperatura de simulación (T), el área media por lípido ($\langle A_L \rangle$) y la varianza del área por lípido ($\sigma^2(A_L)$):

$$K_A = \frac{2K_B T \langle A_L \rangle}{\sigma^2(A_L)} \quad (2.4)$$

El módulo de rigidez (del inglés *Bending Rigidity Modulus*) se calcula empleando la siguiente expresión:

$$K^B = \frac{K_A \xi^2}{24} K_B T \quad (2.5)$$

Donde K_A representa el módulo de compresibilidad, ξ es el espesor 'efectivo' de bicapa, es decir, $\xi = D_{PP} - 1nm$, siendo D_{PP} la distancia de pico a pico en el perfil de la densidad de electrones.

2.2. Modelos físicos

“A model is a simplification or approximation of reality and hence will not reflect all of reality. ... Box noted that “all models are wrong, but some are useful.” While a model can never be “truth,” a model might be ranked from very useful, to useful, to somewhat useful to, finally, essentially useless”

Burnham & Anderson

Teóricamente, el mayor entendimiento de un sistema químico puede ser alcanzado a través de la mecánica cuántica [10, 142, 7]. En 1926, el físico Erwin Schrödinger publicó su famosa ecuación, $\hat{H}\Psi = E\Psi$, la cual es el resultado de combinar mediante la relación de De Broglie, $\lambda = h/m_e v$, la ecuación que caracteriza una onda estacionaria, $d^2\Psi/dx^2 = m_e v^2 + U$, con la ecuación que representa la energía total de un sistema de una partícula, $E = E_c + U = 1/2(m_e v^2) + V$. La idea central de la teoría de Schrödinger es que toda la información de un sistema está contenida en la función de onda (Ψ) [142]. Por tanto, a este nivel de resolución, es posible simular la ruptura y formación de enlaces químicos, como también los procesos de transferencia de carga [113, 7].

A pesar de que la mecánica cuántica es sin duda la herramienta más versátil y precisa para explorar la materia a escalas inaccesibles a los sentidos humanos; para sistemas con una composición de más de un electrón no es posible resolver con exactitud la ecuación de Schrödinger, como manifestó Paul Dirac en 1928: “Las leyes físicas subyacentes necesarias para la teoría matemática de una gran parte de la física y el conjunto de la química son completamente conocidas, y la dificultad es que la aplicación exacta de estas leyes lleva a ecuaciones demasiado complicadas para ser solubles.” [132]. Esta limitación en la teoría cuántica se debe a que las interacciones entre las partículas crean correlación, en consecuencia, la función de onda para los sistemas de múltiples electrones contiene una inmensa cantidad de información física, lo cual imposibilita los cálculos analíticos de esta ecuación para sistemas polielectrónicos [7, 10].

Las limitaciones en resolver de forma analítica la ecuación de Schrödinger condujo al desarrollo de los cimientos de los cálculos de la estructura electrónica, con la comprensión de la naturaleza cuántica de los enlaces en sólidos, las aproximaciones de Hartree y Fock y el teorema de Bloch [10, 7]. Consecutivamente, se desarrollaron aproximaciones como los métodos *ab initio* (del latín “desde el principio”), los métodos semiempíricos y la mecánica molecular [7]. La diferencia general de estas aproximaciones radica en las consideraciones matemáticas que se hacen sobre el sistema molecular. Los métodos *ab initio* resuelven con precisión la estructura molecular usando como modelo matemático la ecuación de Schrödinger, las constantes

fundamentales y, el número de átomos del sistema [7, 166]. Por otro lado, los métodos semiempíricos usan aproximaciones de datos empíricos para proporcionar la entrada de los modelos matemáticos [166]. A diferencia de estas dos aproximaciones, la mecánica molecular explica e interpreta el comportamiento de los átomos y las moléculas desde los principios de la física clásica [166, 70].

En la naturaleza existen diversos sistemas de interés que no pueden ser descritos directamente desde la mecánica cuántica, entre ellos se destacan los sistemas biológicos. La estrategia que se emplea para modelar estos sistemas es la mecánica molecular, específicamente la DM; la cual propone una expresión algebraica simple para expresar la energía total de una molécula, sin acudir a cálculos que tomen en cuenta una función de onda o la densidad electrónica [70, 10]. La expresión de energía permite recrear los movimientos internos y cambios conformacionales de las moléculas a través del tiempo [70], a partir de ecuaciones clásicas simples (**Figura 2.5**), como la ecuación del oscilador armónico para describir la energía asociada con el estiramiento, la flexión, la rotación, y las fuerzas intermoleculares de los enlaces, como las interacciones de van der Waals y los enlaces de hidrógeno. Todas las constantes de estas ecuaciones se obtienen a partir de datos experimentales o de cálculos *ab initio* [70, 10].

$$V(R)_{bonded} = \sum_{bonded} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{angles} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torsions} \sum_n k_\phi \cos(n\phi - \gamma)$$

$$V(R)_{nonbonded} = \sum_{van\ der\ waals} \left(\frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{B}{r_{ij}^6} \right) + \sum_{electrostatic} \left(\frac{q_i q_j}{\epsilon_D r_{ij}} \right)$$

FIGURA 2.5: Representación gráfica y matemática de la expresión de energía potencial empleada en DM. Tomado de [165]

2.2.1. Dinámica Molecular

Los métodos de DM fueron concebidos originalmente dentro de la comunidad de física teórica durante la década de 1950 [167]. En 1957, Alder y Wainwright realizaron la primera simulación vía DM empleando el modelo de esfera dura, en el que los átomos interactúan sólo a través de colisiones perfectas [3]. Posteriormente, en 1964 Rahman aplicó un potencial continuo y suave para recrear las interacciones atómicas del Argón líquido [133]. Durante la década de 1970, a medida que se desarrollaban computadoras de alta velocidad se empezaron a llevar a cabo simulaciones por DM de sistemas más complejos, que culminaron en 1977 con la primera simulación de

una pequeña proteína utilizando una función de energía empírica construida con métodos *ab initio* [100].

Los trabajos pioneros en simulaciones de bicapas lipídicas se centraron en determinar las propiedades de monocapas lipídicas, bicapas lipídicas sin solvatar y, pequeñas micelas inmersas en una fase acuosa [121]. Unos años más tarde, Scott et al. [143] hicieron estudios combinando metodologías como Monte Carlo y DM para simulaciones de membranas lipídicas. En la década de los 90 surgieron una serie de estudios interesantes sobre bicapas lipídicas hidratadas, los cuales condujeron al desarrollo y perfeccionamiento de los campos de fuerza para estos sistemas [153]. De hecho, se desarrollaron tanto modelos de alta resolución (p.ej. CHARMM-36, LIPID17, Slipids) como modelos de baja resolución (p.ej. MARTINI, ELBA). Actualmente, las simulaciones por DM se han enfocado en la compresión de sistemas de bicapas monocomponentes en presencia de proteínas o fármacos que interactúan en el medio lipídico [95]. Adicionalmente, diferentes estudios han empleado modelos de baja resolución para comprender la diversidad lipídica y la complejidad de las membranas biológicas con la formación de dominios o el desplazamiento de moléculas de lípidos de una capa a otra [95].

2.2.2. Aspectos generales de la Dinámica Molecular

Las simulaciones con DM se han convertido en una herramienta importante en el estudio de biomoléculas ya que ofrecen un modelo de resolución de nivel atómico para el sistema de interés, develando así mecanismos bimoleculares a escalas espaciales y temporales que son difíciles de observar experimentalmente [46, 70]. Esta técnica de simulación consiste en resolver numéricamente las ecuaciones del movimiento clásico para un grupo de moléculas o átomos.

$$\mathbf{F}_i = m \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} \quad (2.6)$$

Donde \mathbf{r}_i es la posición de la partícula i en un tiempo t . \mathbf{F}_i , la fuerza momentánea sobre cada átomo se puede calcular a partir de las interacciones que ocurren entre los átomos en el sistema. La fuerza \mathbf{F}_i que actúa sobre cada partícula en el sistema se puede calcular como el gradiente negativo de la función de energía potencial (U) que a su vez es una función de las coordenadas de los átomos.

$$\mathbf{F}_i = -\nabla_{\mathbf{r}_i} U(r_1, r_2, \dots, r_N) \quad (2.7)$$

No obstante, la función de la DM no se limita únicamente a resolver dichas ecuaciones del movimiento [46, 134]. Estas simulaciones permiten recrear un sistema de acuerdo con ciertas demandas de temperatura y presión, lo cual, no sería posible usando una solución simple de las ecuaciones de movimiento estándar. En la **Figura 2.6** se representan los pasos a seguir para hacer una simulación vía DM. En primer lugar, se requiere una ley que revele cómo los átomos interactúan entre sí en el sistema [167, 134]; esto combinado con las posiciones atómicas arroja la energía

potencial asociada, las fuerzas sobre los átomos y el estrés en las paredes del contenedor. Aunque generalmente se desconoce dicha ley, se pueden usar aproximaciones que difieren en precisión y realismo dependiendo de un campo de fuerza, o modelos construidos después de realizar cálculos de estructura electrónica, que también se pueden realizar en diferentes niveles de teoría [49]. Además, se requiere de un algoritmo que incorpore numéricamente las ecuaciones de movimiento para los átomos en el sistema. Hasta ahora, se han propuesto muchos enfoques diferentes en esta dirección. Por supuesto, no se puede resolver las ecuaciones de movimiento a menos que se proporcione al sistema los valores iniciales de velocidad y posición para cada átomo en el sistema [167, 65].

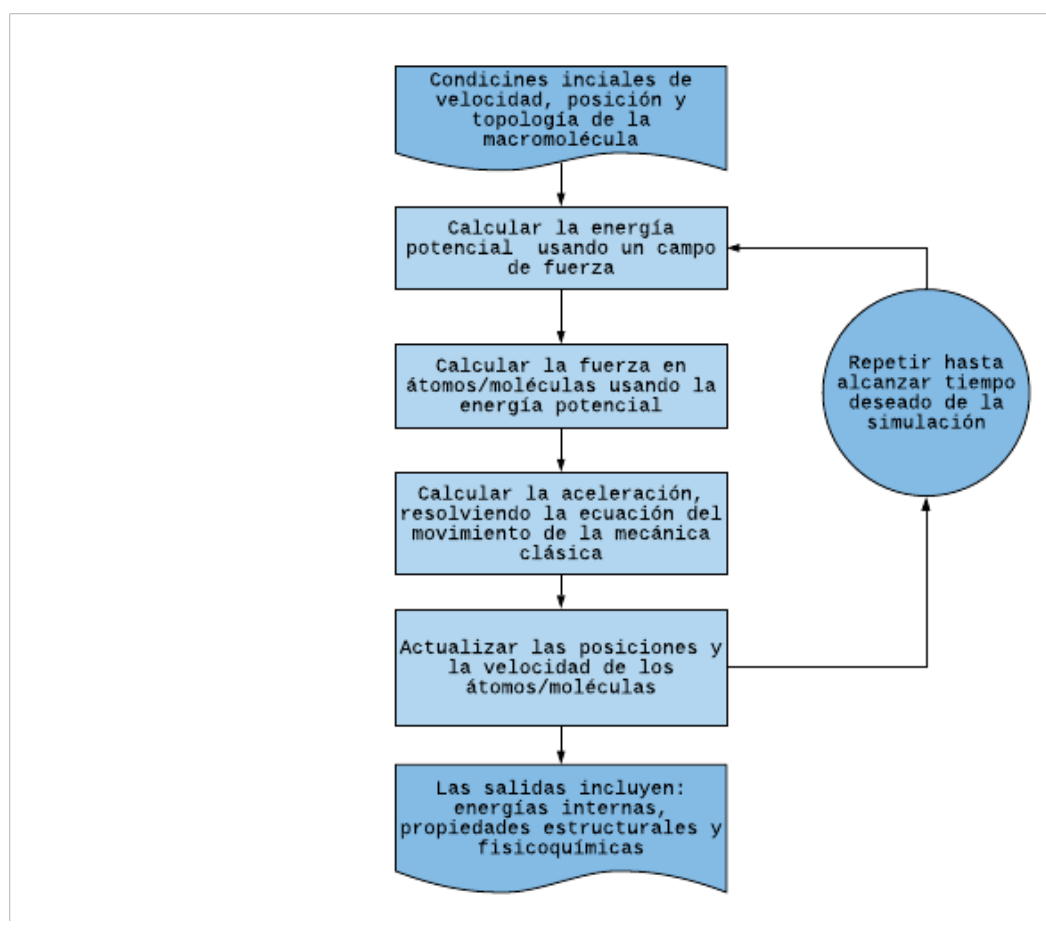


FIGURA 2.6: Diagrama de flujo que resume los procesos realizados en una simulación de DM.

2.2.2.1. Construcción del sistema molecular

Una de las tareas críticas para llevar a cabo una simulación por DM es la construcción del sistema a tratar [63]. En principio cualquier sistema molecular puede ser construido manualmente, a partir del conocimiento de la estructura química y con la ayuda de alguna herramienta computacional. Dado que nuestro interés recae en el

entendimiento de las membranas biológicas, a continuación, se presenta una serie de herramientas para la construcción de estos sistemas biológicos, ya sea haciendo esto de forma manual o empleando algún proceso automatizado.

Los lípidos comparados con otras moléculas son relativamente pequeños y presentan una conectividad simple [101]. Estas moléculas se pueden construir usando cualquier editor químico, por ejemplo, Avogadro, Open Babel, Gaussian, entre otros [51, 114, 43]. Además, algunas estructuras y archivos de topologías se pueden descargar de repositorios web, como lipidbook, CHARMM-GUI, Slipids y Martini [33, 66, 96, 64]. Aunque la construcción de la bicapa parezca una tarea ardua, la verdadera dificultad recae en los parámetros del campo de fuerza de estas estructuras [63]. En particular, la parametrización tiene grandes retos, debido a los cálculos cuánticos que se deben efectuar para conocer las cargas parciales, los potenciales diedrales y, las interacciones de Lennard-Jones [63]. Este proceso de construcción manual es útil cuando se quiere imitar una membrana con una composición lipídica de la cual no se tenga la estructura ni los parámetros que componen el campo fuerza.

Para evitar la construcción manual de estos sistemas biológicos se puede emplear herramientas automatizadas. Estas herramientas pueden ser divididas en dos categorías: servicios web (CHARMM-GUI, Membuilder, LipidBuilder) y aplicaciones distribuidas (Packmol e Insane) [66, 45, 33, 97, 172]. Las aplicaciones web tienen una interfaz gráfica amigable, además, estos sitios web generan archivos de coordenadas, archivos con las topologías y los parámetros para llevar a cabo la simulación. Las desventajas de usar estos servidores es que únicamente pueden ser modificados por los desarrolladores, además, está limitado a un número de lípidos, como también a paquetes de DM y campos de fuerza [63]. A diferencia de estos portales web, las aplicaciones distribuidas apenas están en proceso de desarrollo. Insane permite generar membranas para el campo de fuerza Martini [172]. Mientras que Packmol es una aplicación más versátil que permite generar configuraciones iniciales de las membranas. No obstante, este paquete considera las moléculas como entidades rígidas [97].

2.2.2.1. Campo de Fuerza

El campo de fuerza es una representación matemática que describe la dependencia de la energía de un sistema en las partículas que lo componen [46]. Este modelo, consiste de una forma analítica del potencial de energía interatómico $U(r_1, r_2, \dots, r_N)$ y, un conjunto de parámetros obtenidos de forma experimental o empleando métodos *ab initio*. La consistencia de estos parámetros permiten encontrar un modelo capaz de aproximarse con mayor precisión a los valores experimentales [46, 112]. La mayoría de los campos de fuerza empleados para sistemas moleculares se pueden definir mediante una expresión matemática que incluye las interacciones covalentes y no covalentes del sistema:

$$\begin{aligned}
U = & \sum_{\text{enlace}} \frac{k_r}{2} (r - r_{eq})^2 + \sum_{\text{angulo}} \frac{k_\theta}{2} (\theta - \theta_{eq})^2 + \\
& \sum_{\text{torison}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \\
& \sum_{\text{vdW}} \frac{a_{AB}}{r_{AB}^{12}} - \frac{b_{AB}}{r_{AB}^6} + \sum_{\text{elect}} \frac{q_A q_B}{4\pi\epsilon_0 r_{AB}}
\end{aligned} \tag{2.8}$$

Los términos de potenciales covalentes incluyen el término de enlace, ángulo y torsión, es decir, características de los enlaces covalentes entre los átomos del sistema a tratar (**Figura 2.5**). Los términos no covalentes se definen por un término de atracción-repulsión de tipo Lennard-Jones para las fuerzas de van der Waals y un término Coulómbico para las interacciones electrostáticas [112].

El término de enlace se encarga de mantener las longitudes de enlace cercanas a los valores de equilibrio, obtenidos ya sea experimentalmente o por cálculos de la mecánica cuántica. En términos generales, la energía potencial para un enlace covalente se define mediante una función de Morse [112, 144, 83, 6]. Sin embargo, el potencial de Morse no es de uso común en los campos de fuerza, dado que rara vez en los cálculos de Dinámica Molecular los enlaces se desvían significativamente de sus valores de equilibrio. En consecuencia, se emplean expresiones más simples como la ley de Hooke, en la cual la energía varía en función del desplazamiento desde la longitud de referencia del enlace r_{eq} :

$$E_{\text{enlace}}(r) = \frac{k_r}{2} (r - r_{eq})^2 \tag{2.9}$$

Donde k , es la constante de fuerza del enlace o resorte; r_{eq} es el mínimo de la función para tener una energía potencial de cero. Cabe resaltar que por tratarse de una expansión de Taylor truncada, funciona mejor en regiones cercanas a su punto de referencia, en este caso r_{eq} . Por lo tanto, si principalmente el sistema consta de estructuras moleculares donde ningún enlace está abruptamente distorsionado de su valor óptimo, se obtiene una expresión matemática de mucha utilidad para representar esta interacción. En caso tal que la energía de enlace sea cada vez más grande, es decir, se aleje de r_{eq} ; la solución práctica a tal inexactitud es incluir términos adicionales en la expansión de Taylor, como lo es el término cúbico [112, 144, 83, 6].

La espectroscopía vibracional revela que, para pequeños desplazamientos desde el equilibrio, variaciones de energía asociada con la deformación del ángulo de enlace también están modelados por expansiones polinomiales como lo son las variaciones asociadas con el estiramiento de los enlaces [112, 144, 83, 6]. Por lo tanto, la función de campo de fuerza incluye *el término de ángulo*, representado mediante un potencial armónico de Hooke:

$$E_{\text{angulo}}(\theta) = \frac{k_{\theta}}{2}(\theta - \theta_{eq})^2 \quad (2.10)$$

Donde θ es el ángulo entre los enlaces y, k_{θ} la constante de fuerza.

El término de torsión describe la variación de la energía asociada a la rotación alrededor de un enlace B-C dentro de una serie de cuatro átomos A-B-C-D donde A-B, B-C, y C-D están unidos [144, 83, 6]. Se caracteriza por presentar una periodicidad en el ángulo ϕ : si el enlace rota 360° la energía debe volver al mismo valor. Su perfil energético se expresa como una serie de Fourier:

$$E_{\text{torsional}} = \frac{V_n}{2}[1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad (2.11)$$

La constante V_n determina la altura de la barrera de torsión alrededor del enlace B-C; n describe la multiplicidad (el número de mínimos en la función cuando se rota 360°), ϕ el ángulo de torsión y, γ el ángulo de fase (indica en qué punto pasa la torsión por mínimo energético) [112, 144, 83, 6].

Los términos de potenciales no covalentes incluyen las interacciones de van der Waals e interacciones electrostáticas, las cuales sugieren que las moléculas y los átomos independientes interactúan entre ellos a través de potenciales que no dependen de una relación específica de enlace entre átomos [112, 144, 83, 6]. La interacción de van der Waals entre dos átomos se origina a partir de un balance entre fuerza atractivas y repulsivas. Esta energía de interacción varía en función de la distancia entre ambos átomos, la cual es cero a una distancia interatómica infinita (e incluso despreciable a distancias relativamente cortas) [112, 144]. Al reducirse la distancia, la energía disminuye hasta llegar a un mínimo, es decir, el punto máximo de energía potencial. Después, la energía crece rápidamente al continuar disminuyendo la distancia. Estas interacciones de atracción y repulsión entre átomos y moléculas pueden ser calculadas usando mecánica cuántica [112, 144, 83, 6]. Sin embargo, dado la gran cantidad de interacciones de van der Waals, se hace necesario emplear una función que las calcule de manera más eficiente. La función más conocida para calcular dichas interacciones es el potencial de Lennard-Jones:

$$E_{\text{vdW}}(r_{AB}) = \frac{a_{AB}}{r_{AB}^{12}} - \frac{b_{AB}}{r_{AB}^6} \quad (2.12)$$

Donde a y b son dos constantes específicas del par de átomos A y B.

Las interacciones electrostáticas a partir de la distribución de la carga en una molécula se puede representar como una ordenación de las cargas puntuales. Estas cargas reproducen las propiedades electrostáticas de la molécula [112, 144, 83, 6]. En el caso de que las cargas estén centradas en los núcleos, se las denomina cargas atómicas parciales. La interacción electrostática de una molécula se calcula, por tanto, como la suma de las interacciones entre pares de cargas puntuales según la ley de Coulomb:

$$E_{\text{elec}}(r_{AB}) = \frac{q_A q_B}{4\pi\epsilon_0 r_{AB}} \quad (2.13)$$

Donde q_A y q_B son las cargas puntuales de cada átomo, r_{AB} la distancia entre ellos y ϵ_0 la constante dieléctrica del medio que las separa [112, 144, 83, 6]. Si las cargas puntuales de dos átomos son contrarias éstos se atraerán entre sí, pero si las cargas son del mismo signo se repelerán.

2.2.2.3. Métodos de integración

La energía potencial que representa las interacciones atómicas es una función de las posiciones atómicas ($3N$) de todos los átomos del sistema. Dada la naturaleza compleja de esta función, se debe resolver de forma numérica la ecuación del movimiento. Para resolver de forma acertada estas ecuaciones se requiere de un algoritmo de integración de alta precisión, que permita hacer la integración numérica de la **Ecuación 2.6** con pasos de tiempo pequeños [42, 55]. Numerosos algoritmos numéricos para integrar las ecuaciones del movimiento se han desarrollado, entre los cuales se incluyen: el Algoritmo de Verlet, el Algoritmo de salto-rana, Velocity Verlet algorithm, el algoritmo Beeman. Todos estos algoritmos de integración asumen que las posiciones, velocidades y aceleraciones pueden aproximarse mediante una serie de Taylor:

$$r(t + \partial t) = r(t) + v(t) \partial t + \frac{1}{2} a(t) \partial t^2 + \dots \quad (2.14)$$

$$v(t + \partial t) = v(t) + a(t) \partial t + \frac{1}{2} b(t) \partial t^2 + \dots \quad (2.15)$$

$$a(t + \partial t) = a(t) + b(t) \partial t + \dots \quad (2.16)$$

Donde r es la posición, v la velocidad (la primera derivada de la posición respecto al tiempo), a la aceleración (la segunda derivada de la posición respecto al tiempo) y, b la tercera derivada respecto a la posición con respecto al tiempo. El algoritmo de Verlet, fue desarrollado por Loup Verlet en 1967 [48], este método utiliza las posiciones y aceleraciones en el tiempo t y las posiciones desde el tiempo $t - \partial t$ para calcular nuevas posiciones en el tiempo $t + \partial t$.

$$r(t + \partial t) = r(t) + v(t) \partial t + \frac{1}{2} a(t) \partial t^2 + \dots \quad (2.17)$$

$$r(t - \partial t) = r(t) - v(t) \partial t + \frac{1}{2} a(t) \partial t^2 + \dots \quad (2.18)$$

Sumando ambas ecuaciones (eq 2.13 y 2.14) se obtiene

$$r(t + \partial t) = 2r(t) - r(t - \partial t) + a(t) \partial t^2 + \dots \quad (2.19)$$

Este algoritmo ofrece una ventaja, el primer y tercer orden de la expansión de Taylor se cancela, lo cual hace que el algoritmo de Verlet sea más preciso que una simple expansión de Taylor.

$$r(\partial t) \approx r(0) - v(0) \partial t + \frac{1}{2} a(0) \partial t^2 + \dots \quad (2.20)$$

Las ventajas de usar el algoritmo Verlet son su fácil implementación y los requisitos de almacenamiento son modestos. La desventaja es que el algoritmo es de precisión moderada. El método de integración salto de rana (del inglés leap-frog), es un versión modificada del algoritmo de Verlet. En este método, las velocidades iniciales se emplean de forma más acertada que en el algoritmo de Verlet, estas son calculadas en el tiempo $(t + \partial t/2)$; las cuales se usan para calcular las posiciones r , en el tiempo $(t + \partial t)$. En este enfoque, las velocidades 'saltan' sobre las posiciones, luego las posiciones saltan sobre las velocidades

$$r(t + \partial t) = r(t) + v\left(t + \frac{1}{2}\partial t\right) \partial t \quad (2.21)$$

$$v\left(t + \frac{1}{2}\partial t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\partial t\right) + a(t) \partial t \quad (2.22)$$

La ventaja de usar este algoritmo es que las velocidades son explícitamente calculadas y es más eficiente computacionalmente que el algoritmo de Verlet. Sin embargo, la desventaja de este algoritmo es que no calcula simultáneamente las posiciones. Las velocidades en el tiempo t pueden ser aproximadas por la siguiente expresión:

$$v(t) = \frac{1}{2} \left[v\left(t + \frac{1}{2}\partial t\right) + v\left(t - \frac{1}{2}\partial t\right) \right] \quad (2.23)$$

Otro algoritmo de uso común es el algoritmo de velocidad Verlet; este usa un enfoque similar pero incorpora explícitamente la velocidad, resolviendo el problema del primer paso en el algoritmo de Verlet

$$r(t + \partial t) = r(t) + v(t) \partial t + \frac{1}{2} a(t) \partial t^2 \quad (2.24)$$

$$v(t + \partial t) = v(t) + \frac{1}{2} [a(t) + a(t + \partial t)] \partial t \quad (2.25)$$

La ventaja de este algoritmo es que ocupa menos espacio en la memoria que el algoritmo de Verlet. Otro algoritmo de uso común es el algoritmo de Beeman, el cual está estrechamente relacionado con el algoritmo Verlet. Éste produce posiciones idénticas al algoritmo de Verlet, pero es más preciso en el cálculo de las velocidades y ofrece una mejor conservación de la energía. La desventaja de usar este método es que las expresiones matemáticas son más complejas, lo cual hace que el cálculo sea más costoso.

$$r(t + \partial t) = r(t) + v(t) \partial t + \frac{2}{3} a(t) \partial t^2 - \frac{1}{6} a(t - \partial t) \partial t^2 \quad (2.26)$$

$$v(t + \partial t) = v(t) + v(t) \partial t + \frac{1}{3} a(t) \partial t + \frac{5}{6} a(t) \partial t - \frac{1}{6} a(t - \partial t) \partial t \quad (2.27)$$

2.2.2.3. Algoritmos de restricción

Pese a que las simulaciones por DM se llevan a cabo en coordenadas internas que satisfacen las restricciones de longitud y ángulo de enlace; al incrementar el tiempo

de paso se generan errores sucesivamente más grandes en los movimientos, lo cual hace que la simulación diverja y finalice en unos cuantos pasos de tiempo. En consecuencia, los algoritmos de restricción se suelen emplear en simulaciones vía DM con el fin de extender más las simulaciones usando un paso de tiempo mayor [42, 55]. Estos algoritmos eliminan completamente algunos enlaces o los grados de libertad del sistema. En general, estas fuerzas de restricción explícitas acortan el paso de tiempo significativamente, haciendo que la simulación sea menos eficiente computacionalmente; en otras palabras, se requiere más potencia de la computadora para calcular una trayectoria de una longitud determinada, pero evita los errores al integrar oscilaciones de los enlaces. Los algoritmos SHAKE y LINCS son los más empleados en simulaciones por DM de macromoléculas biológicas [42, 55, 2].

El algoritmo SHAKE fue el primero en ser desarrollado y el más empleado para satisfacer las restricciones de la geometría de los enlaces durante las simulaciones por DM. Este algoritmo resuelve el sistema de ecuaciones de restricción utilizando el método de Gauss-Seidel para aproximar la solución del sistema lineal de ecuaciones. En este algoritmo para cada par de los átomos involucrados en un enlace (o triplete en un ángulo), se calcula la fuerza necesaria para restablecer el valor de equilibrio. En un sistema macromolecular debido a que muchos enlaces están conectados, el algoritmo debe repetirse continuamente hasta que se logre la convergencia. Esto limita un poco la implementación de este método para pasos de tiempo superiores a 2 fs. De hecho, este algoritmo no siempre converge y, la iteración lo hace inadecuado para computadoras paralelas ya que incurre en mucha comunicación adicional entre los procesadores [2].

El algoritmo LINCS es un método alternativo al modelo EEMM [61]. Este algoritmo restablece los enlaces a sus longitudes correctas después de una actualización sin restricciones y, tiene un enfoque no iterativo, ya que siempre utiliza dos pasos. Esta característica permite extender el tiempo de paso al menos a 3 o 4 fs. De hecho, este algoritmo es 3 o 4 veces más rápido que algoritmo SHAKE [63], pero solo se puede usar con restricciones de enlace y restricciones de ángulo aisladas.

2.2.2.5. Ensembles

En una simulación por DM la integración de las ecuaciones de movimiento de Newton proporciona los medios para muestrear las características físicas de un sistema dado a través de su evolución en un ensemble microcanónico (NVE) [14]. Sin embargo, para muestrear otros colectivos, se deben agregar variables adicionales, las cuales se describen como grados de libertad extendidos. En consecuencia, para mantener una temperatura constante en la simulación, se requiere el uso de un 'termostato' para controlar las variables adicionales [15-17]. De manera similar, para mantener una presión constante durante la simulación, se debe agregar un 'barostato' construido con variables adicionales de control de presión [18, 19]. De esta manera, la temperatura y la presión promedio se regulan dentro de estas variables y su dinámica. Con el objetivo de lograr dicha regulación de temperatura y presión sin perturbar la dinámica newtoniana de las partículas a corto plazo, los grados de libertad extendidos generalmente están determinados para evolucionar lentamente y con un acoplamiento débil a la dinámica de las partículas físicas.

2.2.2.5. Paquetes computacionales

Existen una gran cantidad de paquetes computacionales capaces de resolver de forma numérica las ecuaciones mostradas en las secciones anteriores. Muchos de estos software están disponibles a través de licencia, de forma gratuita o algunos incluso como software de código abierto. Sin embargo, estos paquetes difieren drásticamente en la funcionalidad que proporcionan, así como en su compatibilidad con campos de fuerza, tipos de archivos y con los software de análisis. No obstante, uno de los factores más cruciales para la selección del software es la velocidad a la que se realiza la integración y otros cálculos relacionados. Los software más empleados para simulación de macromoléculas son: LAMMPS, GROMACS, AMBER, NAMD y CHARMM.

LAMMPS (del inglés Large-scale Atomic/Molecular Massively Parallel Simulator) es un código clásico de DM que modela el ensamblaje de partículas en un estado sólido, líquido o gaseoso. Este software es de libre acceso y es distribuido bajo los términos de GNU Public License. LAMMPS permite modelar átomos, polímeros, sistemas biológicos, granulares o metálicos. Esto, lo hace implementando una variedad de campos de fuerza (OPLS-AA, AMBER, CHARMM) y condiciones de borde que se pueden ajustar por el usuario. Además, este software permite correr sistemas con pocas partículas o sobre los millones o miles de millones de partículas [127].

GROMACS (del inglés Groningen Machine for Chemical Simulations) es un paquete versátil para simular macromoléculas biológicas como proteínas y lípidos que tienen interacciones complejas entre ellos. Este software es de libre acceso y es distribuido bajo los términos de GNU Public License [55, 162]. GROMACS proporciona un rendimiento extremadamente alto en comparación con todos los demás programas. De hecho, se puede ejecutar en paralelo empleando la librería MPI. Además, admite diversos campos de fuerza: Martini [96], Berger, OPLS-AA [73], CHARMM-36 [72], Lipid14[31] y SIpids [37]. Además, GROMACS proporciona una gran cantidad de herramientas de análisis integradas que pueden ampliarse con el software Visual Molecular Dynamics (VMD) [58]; de hecho, los formatos de salida de este paquete son compatibles con MDAAnalysis, PyBILT, GridMAT-MD.

AMBER (del inglés Assisted Model Building with Energy Refinement) es un conjunto de programas para simulaciones con mecánica molecular y DM. Este software fue diseñado principalmente para modelar proteínas y ácidos nucleicos. AMBER proporciona simulaciones rápidas (en hardware paralelo de CPU o GPU) y, es distribuido con una licencia y pago separada para diferentes aplicaciones [21].

NAMD (del inglés NANoscale Molecular Dynamics) es un paquete de simulación de dinámica molecular escrito usando el modelo de programación paralela Charm ++, conocido por su eficiencia paralela y a menudo usado para simular sistemas grandes (millones de átomos) [126]. NAMD utiliza el popular programa de gráficos moleculares VMD para la configuración de la simulación y el análisis de trayectoria, sin embargo, también es compatible con archivos AMBER, CHARMM y X-PLOR.

CHARMM (del inglés Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) es un paquete de simulación muy distinguido y ampliamente utilizado. El enfoque principal de este software es la modelación de moléculas de interés biológico, incluidas proteínas, péptidos, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y moléculas pequeñas. Este paquete proporciona un amplio conjunto de herramientas computacionales que incluyen numerosos métodos de muestreo conformacional, estimadores de energía libre, minimización molecular, dinámica y técnicas de análisis y, capacidades de construcción de modelos. Además, permiten incluir en los cálculos métodos combinados de mecánica cuántica y DM. La principal ventaja de CHARMM sobre los paquetes sin costo es que cuenta con una gran cantidad de herramientas para el análisis estadístico y termodinámico de las trayectorias moleculares [18].

2.2.3. Campos de Fuerza para Lípidos

Los primeros campos de fuerza para simulaciones de macromoléculas fueron desarrollados por primera vez hacia 1970 [50, 170, 171]. Desde entonces un gran número de campos de fuerza empíricos para DM han sido desarrollados para la simulación de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otras moléculas biológicas [69]. En la literatura se encuentran disponibles diferentes campos de fuerza, los cuales tienen diferente grado de complejidad y, además están orientados a tratar diferentes tipos de sistemas [46], entre los más comunes para lípidos se encuentran: Berger, AMBER [28], CHARMM [91], Slipids, GROMOS [26] y, OPLS [73]. La diferencia entre estos campos de fuerza recae en la metodología que se emplea para parametrizar los potenciales de interacción.

Berger fue el primer campo de fuerza desarrollado para lípidos y es tal vez el campo de fuerza más implementado en las últimas décadas. Este es un modelo de átomos unidos, en el cual los parámetros de Lenard-Jones se encuentran basados en los parámetros propuestos por Essex et al. [38]. Aunque originalmente se desarrolló solo para lípidos, este campo de fuerza se combinó más tarde con una amplia gama de campos de fuerza para proteínas como AMBER [31], CHARMM [66], OPLS [73] y GROMOS [26]. A partir de la implementación de este modelo se puede determinar las características estructurales y dinámicas de sistemas de bicapas y monocapas lipídicas, también permite el estudio del transporte a través de membranas y, de proteínas embebidas en el medio lipídico.

El campo de fuerza CHARMM para lípidos fue propuesto inicialmente en el 2010 [72], este fue el primero de estos modelos en incluir las interacciones entre todos los átomos del sistema. Este modelo proporciona parámetros adecuados para representar las propiedades estructurales como el espesor, el parámetro de orden y factores de forma de la bicapa [72, 122]. Actualmente, cuenta con más de 200 estructuras lipídicas parametrizadas y, con distintos refinamientos de los parámetros de los ángulos de los enlaces. Este modelo fue parametrizado para usar el modelo de agua mTIP3P.

El campo de fuerza Slipids se encuentra basado en los parámetros de enlace del modelo CHARMM-36. No obstante, se diferencia en los valores que hace este modelo sobre las cargas parciales y los parámetros de Lenard-Jones [37]. La estrategia

de parametrización de las cargas de este modelo es similar a la implementada por AMBER, en la cual se emplea el método HF/6-31G* a un nivel de B3LYP/6-31G*. Estos ajustes a los parámetros hacen que Slipids sea compatible con la mayoría de los campos de fuerza de AMBER. Los parámetros de Slipids disponibles actualmente incluyen moléculas de PC, PE, PG y PS saturadas e insaturadas, así como esfingomielina y colesterol.

El conjunto de campos de fuerza de AMBER se amplió en 2014 con el campo de fuerza para lípidos Lipid14 [31]. Este campo de fuerza permite numerosas combinaciones de los grupos polares y las cadenas hidrocarbonadas para crear diferentes tipos de lípidos, lo que permite la fácil inserción de nuevas especies de lípidos. Los parámetros de Lennard-Jones y de torsión de los grupos polares y cadenas hidrocarbonadas de los lípidos se han revisado y se han calculado las cargas parciales actualizadas. De hecho, dado que la derivación de este campo de fuerza es coherente con la filosofía de desarrollo de AMBER, Lipid14 es compatible con los campos de fuerza de proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y moléculas pequeñas de AMBER.

2.2.1.1. Validación

Esencialmente, las simulaciones vía DM para sistemas de bicapas lipídicas se han convertido en el medio principal para explorar la organización espacial y temporal de estos sistemas. Sin embargo, el valor predictivo de cualquier simulación mediante DM depende de la precisión del modelo subyacente que describe las interacciones interatómicas (campo de fuerza). Por tanto, uno de los aspectos cruciales posterior a la simulación es la validación del campo de fuerza empleado [105, 60, 88]. La precisión y la confianza de estos modelos físicos orientados a sistemas de bicapas lipídicas están determinadas por su capacidad de reproducir correctamente la estructura de los lípidos y las fases lipídicas, como también el comportamiento individual y colectivo de los lípidos en un conjunto dado de condiciones (temperatura, hidratación, heterogeneidad en la composición) [130].

Idealmente, la validación del campo de fuerza debe estar basada en la comparación de los datos simulados con los datos experimentales primarios (*p.ej.* datos de difracción de rayos X y de neutrones, tasas de desintegración de isótopos y medidas de intensidad de fluorescencia) [130]. Sin embargo, esto no siempre es posible, dado que muchos de estos fenómenos son cuánticos y las simulaciones por DM tienen un fundamento en la física clásica. Además, la comparación entre simulaciones y datos experimentales puede ser limitada debido a diferencias entre los sistemas experimentales y los simulados. De hecho, los sistemas experimentales son macroscópicos y a menudo la información se obtiene en minutos u horas. En contraste, la simulación de estos sistemas consiste en una única bicapa compuesta de unos cientos o miles de moléculas de lípidos, que en el mejor de los casos son del orden de los microsegundos [130]. En vista de estas limitaciones al acercamiento de los datos teóricos; la validación de estos modelos físicos se encuentra basada en datos indirectos, es decir, se hace un contraste entre propiedades que se han inferido de los datos experimentales primarios basados en un modelo dado (*ver* 2.1.4. Dinámica y propiedades

físicas), por ejemplo, el área por lípido, el espesor de la bicapa lipídica, el parámetro de orden; logran responder a la organización y geometría de estos sistemas biológicos [130, 88].

2.2.4. Campos de Fuerza para el agua

El agua es sin duda alguna el solvente más importante en la naturaleza, sus propiedades inusuales se originan tanto por su tamaño molecular pequeño como por la capacidad de estas moléculas de formar una red espacial de enlaces de hidrógeno. La predicción de las propiedades del agua a partir de simulaciones por computadora es una tarea compleja. En los últimos 30 años se ha desarrollado números modelos para representar la energía potencial de las interacciones de estas moléculas [149, 68, 12]. Estos modelos han logrado predecir distintas propiedades físicas del agua como la densidad, la constante dieléctrica, la compresibilidad, el coeficiente de autodifusión, las funciones de distribución radial y la dependencia de la temperatura y la presión de estas propiedades. Estos modelos también se han utilizado para reproducir procesos más complejos, como la hidratación hidrofóbica o la influencia del agua en la conformación de las biomoléculas en solución.

Los resultados de las simulaciones por computadora todavía dependen del modelo de agua implementado [68, 120] y la estructura del agua líquida simulada. Los modelos de agua más destacados son: SPC [11], SPCE [12], TIP4P [67], TIP3P [68] y TIP5P [92]. No obstante, en un estudio llevado a cabo por Zielkiewicz [177], donde se contrastaron los modelos SPC [11], SPCE [12], TIP4P [67], y TIP5P [92]; a partir de los cálculos de entropía y los enlaces de hidrógeno se determinó que los modelos que mejor reproducen los valores experimentales son SPC y TIP4P.

No obstante, una de las limitaciones en la selección de estos modelos de agua es la denominada regla de combinación, es decir, tanto el campo de fuerza que representa el solvente y el soluto deben tener sus cargas parciales optimizadas. La familia de campos de fuerza de CHARMM se optimizó con el modelo de agua mTIP3P [15]. Este modelo de agua tiene una constante dieléctrica anormalmente alta y baja viscosidad, lo cual limita su precisión en el cálculo de cantidades como los coeficientes de permeabilidad. Sin embargo, Sajadi et al. [141] compararon los modelos mTIP3P, TIP3P-FB y TIP4P-FB empleando el campo de fuerza CHARMM-36 para dos sistemas de bicapas monocomponentes de DPPC y POPC. Ambos modelos lograron ajustarse a los parámetros experimentales de modelos de bicapas, lo cual sugiere que este campo de fuerza puede ser implementado con cualquiera de estos modelos de agua para conseguir buenos ajustes a lo experimental.

Capítulo 3

Optimización del tamaño del sistema

3.1. Introducción

Las simulaciones por computadora se han convertido en una herramienta versátil para explorar en detalle los eventos moleculares de modelos de bicapas lipídicas [70]. A pesar de la complejidad y diversidad lipídica de estos sistemas biológicos, la mayor parte de los estudios por DM se han realizado con modelos que consideran como máximo dos especies lipídicas diferentes, en los que se incluyen dos especies de fosfolípidos o mezclas de fosfolípidos y colesterol. No obstante, utilizar estos sistemas de baja complejidad es de gran utilidad para comprender en detalle las interacciones previo al estudio de modelos de bicapas de mayor complejidad y relevancia biológica. Además, dado que la mayor parte de la información experimental disponible actualmente es de modelos monocomponentes, llevar a cabo simulaciones de estos sistemas permite validar y establecer la relevancia biológica de los diferentes campos de fuerza [130, 111, 61].

Dada la diversidad de algoritmos para tratar las interacciones electrostáticas y los requerimientos de temperatura y presión del sistema; se han explorado los efectos de estas consideraciones sobre las simulaciones [5]. Sin embargo, a pesar del gran avance en las simulaciones por DM, aún no se ha explorado el efecto del tamaño del sistema molecular con campos de fuerza de alta resolución [95]. De hecho, tanto los estudios llevados a cabo para la validación de los campos de fuerza y el entendimiento de los sistemas de bicapas, seleccionan arbitrariamente un número de moléculas de lípidos y agua, el cual está entre 64 a 128 moléculas de lípidos y, entre 20 y 50 moléculas de agua por lípido [128, 72]. Asimismo, en 1997 Berger et al. [13] publicaron un modelo de simulación de lípidos que todavía es de uso común y es conocido como el 'mínimo estándar' en las simulaciones de lípidos. Este modelo consiste en un sistema de bicapa de 64 moléculas de DPPC y 23 moléculas de agua por lípido. Sin embargo, distintos estudios han puesto en evidencia como las propiedades de las bicapas lipídicas se ven afectadas por el tamaño del sistema simulado.

Por lo tanto, en este capítulo optimizamos el tamaño mínimo de bicapas lipídicas requerido para la comprensión de las propiedades fisicoquímicas de un sistema de bicapa monocomponente de DPPC empleando un campo de fuerza que considere todas las interacciones atómicas. Todo ello con el fin de establecer una relación entre moléculas de lípidos y aguas para la construcción de los sistemas de las posteriores simulaciones.

3.2. Metodología

3.2.1. Sistemas de bicapas lipídicas

Con el ánimo de optimizar la proporción de moléculas de agua y lípidos necesarias para representar de forma acertada las propiedades físicas y mecánicas de estos ensamblajes biológicos, se construyeron modelos de bicapas monocomponentes de DPPC, con una composición variada de este lípido y de moléculas de agua de la siguiente forma: 10, 20, 30, 40, 50 y 60. Las moléculas de DPPC se variaron de la siguiente forma: 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 y 300. Estas cantidades fueron combinadas, obteniendo así un total de 72 sistemas simulados. Estos sistemas fueron construidos usando la opción Membrane Builder de la plataforma CHARMM-GUI [66] <http://www.charmm-gui.org/>.

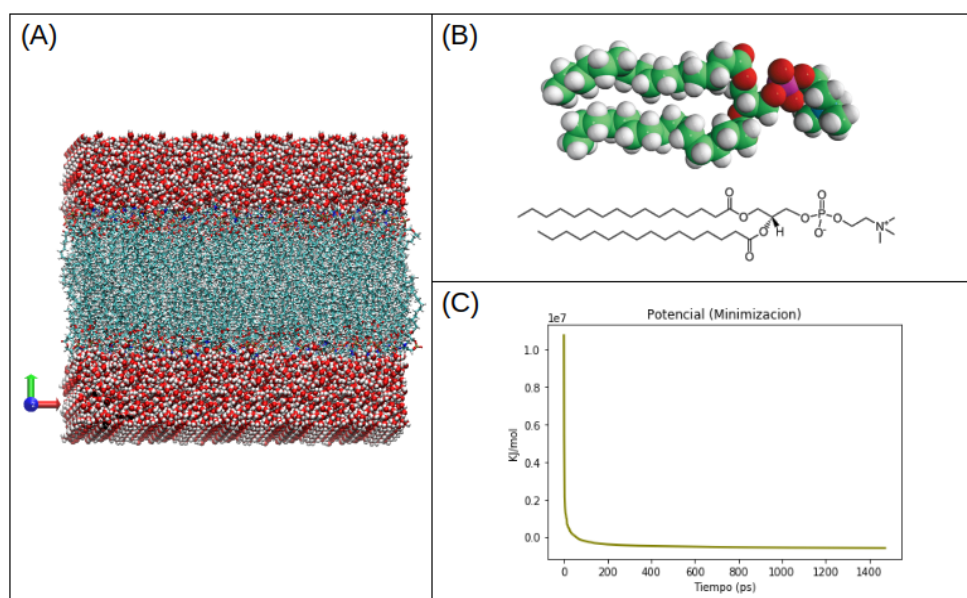


FIGURA 3.1: (A) Visualización del sistema minimizado de 300 moléculas de DPPC y 12000 moléculas de agua. (B) Estructura química del DPPC. (C) Minimización predinámica, únicamente se considera la energía potencial para la minimización.

3.2.2. Detalles computacionales

Todos los sistemas fueron construidos empleando una celda unitaria rectangular, el volumen de ésta depende de la cantidad de moléculas consideradas, para el sistema más pequeño ($N_L=90$ y $N_W/N_L=10$) y más grande ($N_L=300$ y $N_W/N_L=60$) fue 155.16 nm^3 y 996.78 nm^3 , respectivamente. Inicialmente, decidimos seleccionar el campo de fuerza CHARMM-36 para representar las interacciones entre lípidos [91, 72]. Esta selección se debe a que este modelo es robusto y ha sido ampliamente implementado en otras simulaciones. Sin embargo, en el capítulo 4 se exponen las ventajas de trabajar con este modelo y se hace una breve comparación entre este campo de fuerza

y Slipids. Para las moléculas de agua se empleó el modelo mTIP3P [15], el cual es una versión modificada del modelo original TIP3P [68], dado que en este modelo los átomos de hidrógeno cuentan con un término adicional en la componente de van der Waals, la cual se considera con el fin de evitar contactos cercanos con otros átomos cargados y evitar energías electrostáticas demasiado grandes.

Todas las simulaciones de Dinámica Molecular se llevaron a cabo empleando el software computacional GROMACS 5.0 [55, 162], para ello se emplearon los scripts generados por la plataforma CHARMM-GUI. Los sistemas fueron minimizados en energía utilizando 5000 pasos del algoritmo de máxima pendiente (del inglés steepest descent algorithm), seguido de seis pasos de equilibración. En los dos primeros pasos de la equilibración se consideró un colectivo canónico (NVT) y, para los pasos restantes se consideró un colectivo isotérmico-isobárico (NPT). Para la equilibración considerando ambos colectivos se empleó el termostato Berendsen a una temperatura de 323 K. Finalmente, en la producción se consideró un ensamble NPT a una temperatura de 323 K, para el acoplamiento de ésta se empleó el termostato Nose-Hoover [39] y, para el acoplamiento de la presión se empleó el barostato Parrinello-Rahman [119] con un escalamiento semi-isotrópico a una presión de 1 bar. Las simulaciones se llevaron a cabo bajo condiciones de frontera periódicas y, se usó la malla de partículas Ewald para los cálculos de las interacciones electrostáticas [29]. Además, se empleó el algoritmo de cambio de fuerza para las interacciones de tipo Lennard-Jones con un radio de corte de 1.0–1.2 nm. Tanto para la equilibración como para la producción de la DM se usó el método de integración salto de rana (del inglés leap-frog) para resolver la ecuación del movimiento de Newton. Adicionalmente, se usó el algoritmo LINCS para restringir las longitudes de los enlaces de hidrógeno [56]. Para la producción se empleó un tiempo de paso de 2 fs y se guardaron las coordenadas, velocidades y fuerzas cada 5000 pasos, para un tiempo total de producción de 10 ns.

3.2.3. Análisis de datos

Para los 72 sistemas simulados se hizo una comparación entre las propiedades estructurales, dinámicas y mecánicas: área por lípido, espesor de la bicapa, densidad electrónica, parámetro de orden y, los módulos de compresibilidad y rigidez. Para los análisis, se estableció el plano de las bicapas lipídicas a lo largo de los ejes XY, con el eje Z atravesando la bicapa de forma perpendicular, como lo indica la convención. El área por lípido (A_L) de una bicapa lipídica monocomponente se define como el área de la sección transversal (A_{XY}) de todo el sistema a lo largo del plano superficial de la bicapa (plano XY), dividido por la mitad de moléculas del total de lípidos (N_L) presentes en la bicapa, es decir, $A_L = A_{XY}/(N_L/2)$. El espesor de la bicapa (D_{PP}) se calculó como la distancia de los puntos máximos entre los dos picos del perfil de densidad electrónica. Para observar la variabilidad del espesor en el plano XY de la bicapa se empleó la herramienta GridMAT-MD [4]. El módulo de compresibilidad K_A se calculó a partir de la fluctuación en el área por lípido. Los perfiles de densidad electrónica se calcularon utilizando la herramienta *gmx density* en GROMACS, con la caja de simulación dividida en 500 bloques paralelos al plano XY. El parámetro de orden ($-S_{cd}$) fue calculado empleando la opción *gmx order*

en GROMACS. Para visualizar e inspeccionar el sistema se empleó la herramienta VMD. Todos los gráficos fueron contruidos empleando las herramientas GNUplot [174], XMGRACE [174] y Python 3.6 [164].

3.3. Resultados

3.3.1. Propiedades estructurales de la bicapa

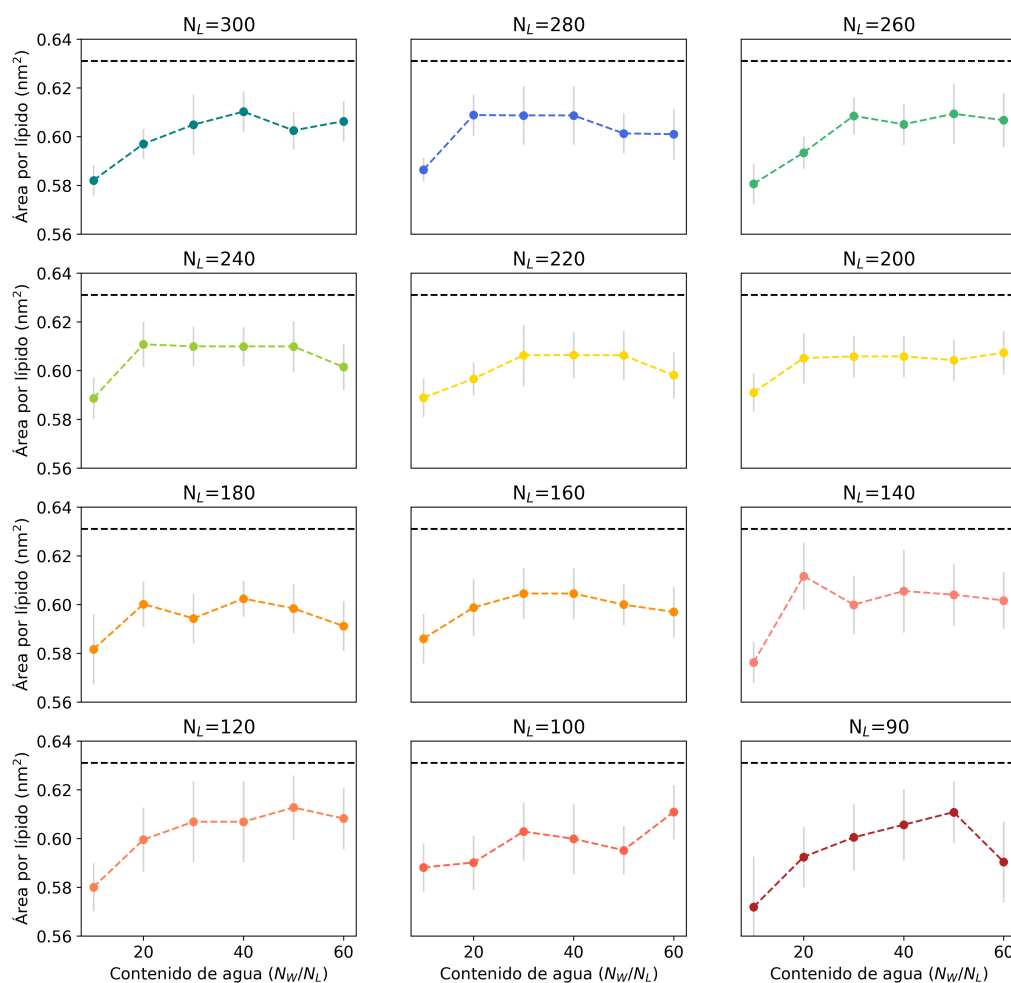


FIGURA 3.2: Valor promedio del parámetro de área por lípido para los 72 sistema contruidos. Las barras grises representan la desviación estándar. La línea discontinua representa el valor experimental de esta medida [77, 76]

El área por lípido es una medida indirecta que permite medir fácilmente el ordenamiento de los lípidos que componen la membrana, además, suele ser empleada para validar la calidad de la simulación y reconocer si el sistema simulado alcanza el equilibrio. De hecho, este parámetro representa la fase y el grado de libertad de las cadenas carbonadas de las moléculas de lípido. Como se puede observar en la **Figura 3.2** el área por lípido para los 72 sistemas simulados se ajusta en gran medida con el valor reportado experimentalmente para esta medida (0.631 nm²) [77, 76].

No obstante, como se puede apreciar en la **Figura 3.2** los valores de área por lípido se ven afectados con la variación en la composición de los sistemas de bicapas. A diferencia de los cambios en la composición de moléculas de DPPC, la variación en la hidratación genera cambios marcados en la dinámica del área por lípido **Figura 3.2**. Para soportar la anterior idea, si se considera dos sistemas de 300 moléculas de DPPC con una hidratación de 10 y de 60 N_w/N_L se obtiene un valor promedio de 0.582 y 0.606 nm², respectivamente. Por el contrario, al considerar dos sistemas con una hidratación de 10 N_w/N_L y, 90 y 300 moléculas de DPPC se obtiene un valor de área por lípido promedio de 0.572 y 0.582 nm², respectivamente.

CUADRO 3.1: Propiedades estructurales para los sistemas simulados con 40 N_w/N_L y las diferentes variaciones en el contenido de DPPC. Los porcentajes de error respecto al valor experimental para el A_L y el D_{PP} se representan como $E\langle A_L \rangle$ y $E\langle D_{PP} \rangle$, respectivamente.

DPPC (N_L)	A_L (nm ²)	$E\langle A_L \rangle$ (%)	D_{PP} (nm)	$E\langle D_{PP} \rangle$ (%)	DPPC (N_L)	A_L (nm ²)	$E\langle A_L \rangle$ (%)	D_{PP} (nm)	$E\langle D_{PP} \rangle$ (%)
90	0.605	4.120	4.2	7.6	200	0.611	3.169	4.0	2.5
100	0.599	5.071	3.9	0.0	220	0.606	3.961	4.0	2.5
120	0.611	3.169	4.0	2.5	240	0.605	4.120	4.0	2.5
140	0.605	4.120	4.2	7.6	260	0.605	4.120	4.2	7.6
160	0.602	4.595	4.0	2.5	280	0.600	4.912	4.0	2.5
180	0.609	3.486	4.2	7.6	300	0.610	3.328	4.1	5.1

No obstante, cuando los sistemas se hidratan con más de 50 N_w/N_L se comienza a tener dinámicas más fluctuantes y valores promedio del área por lípido más alejados del experimental. Por tanto, además de que incrementar al máximo número de moléculas de aguas seleccionadas (60 N_w/N_L) requiere de un mayor costo computacional, introduce un mayor ruido en las simulaciones, el cual genera que las propiedades de estos sistemas no se ajusten tan bien con relación al valor experimental. En el **Cuadro 3.1** se resumen las propiedades estructurales (área por lípido y el espesor de la bicapa) de los sistemas de bicapa analizados con una hidratación de 40 N_w/N_L y, las diferentes variaciones en la composición de moléculas de DPPC. En términos generales, todos los sistemas expuestos en la **Cuadro 3.1** muestran un buen ajuste en relación a lo experimental, es decir, el porcentaje de error para el espesor de la bicapa está por debajo del 8% y por debajo del 6% para el parámetro de área por lípido. Todas estas propiedades son bastante dicientes de la calidad del modelo empleado.

El espesor de la bicapa caracteriza la estructura transversal de la membrana. Esta propiedad es fundamental para describir el comportamiento de fase de estos sistema. En concordancia con los valores de área por lípido, el espesor de la bicapa se ajustó en buena medida a los valores experimentales **Cuadro 3.1**, oscilando en un error del 2.5 a 5.0%.

3.3.2. Propiedades elásticas

Se realizó un análisis de las propiedades elásticas para los sistemas simulados. Primero, se evaluó el módulo de compresibilidad, el cual describe la capacidad del sistema de bicapa a ser deformado. Posteriormente, a partir de los cálculos del módulo de compresibilidad y el espesor de la bicapa se determinó el módulo de rigidez. Ambos parámetros representan propiedades mecánicas fundamentales de las bicapas lipídicas. En el **Cuadro 3.2** se resumen las propiedades elásticas para los sistemas de bicapas con una hidratación de $40 N_W/N_L$. Los módulos calculados mostraron una consistencia con las medidas experimentales.

CUADRO 3.2: Propiedades elásticas de los sistemas simulados con $40 N_W/N_L$ y las diferentes variaciones en el contenido de DPPC.

DPPC (N_L)	K_A (mN/m)	K^b ($K_B T$)	DPPC (N_L)	K_A (mN/m)	K^b ($K_B T$)
90	280	26.8	200	294	24.7
100	260	20.4	220	278	23.4
120	312	26.2	240	278	23.4
140	133	12.7	260	297	28.4
160	601	50.5	280	367	30.9
180	327	31.3	300	255	22.9

El módulo de compresibilidad para las simulaciones realizadas toma valores entre 122.64 mN/m y 601.33 mN/m. De hecho, el sistema que más logra aproximarse a la medida experimental, 237 mN/m [137], es el sistema de 300 moléculas de lípido con un valor de 255.59 mN/m para este módulo. Adicionalmente, las medidas obtenidas para el módulo de rigidez se aproximan en gran medida a los diferentes valores experimentales: $16.7 K_B T$ obtenido con datos de difracción de rayos X [137], $13.5 K_B T$ a partir de la aspiración de micropipeta [27], $31.4 K_B T$ de la fluctuación de forma excitada térmicamente [103] y $32.1 K_B T$ obtenida con una medición totalmente óptica [79].

A partir de las propiedades adquiridas, determinamos que la cantidad de moléculas de agua necesarias para llevar a cabo una simulación por DM de sistemas de bicapas lipídicas es $40 N_W/N_L$. Esto debido a que el parámetro de área por lípido y el espesor de la bicapa se acercan más al valor experimental. Adicionalmente, el valor de moléculas de DPPC que mejor representa todas estas propiedades son 300 moléculas de este lípido. Esto, dado los valores obtenidos en las propiedades elásticas como en los parámetros estructurales. De hecho, como se puede observar en el **Cuadro 3.1** el valor de moléculas de lípido no cambia de forma sustancial el valor de estas propiedades estructurales. En consecuencia, crecer más el sistema en términos de moléculas lipídicas va implicar un mayor costo computacional y una resolución en las propiedades fisico-químicas muy similar a un sistema de menor contenido de estos lípidos.

3.3.3. Sistema de interés

Una vez establecido que el tamaño óptimo del sistema es $40 N_W/N_L$ y $300 N_L$ considerando las propiedades estructuras y elásticas seleccionadas, se examinaron diferentes aspectos de la trayectoria y estabilidad termodinámica del sistema para asegurar la validez física de la simulación. A partir de la inspección visual se pudo observar que no hubo interacciones anormales entre los átomos ni hubo ruptura de los enlaces químicos. Adicionalmente, se pudo verificar que bajo las condiciones de la simulación, la membrana tuvo un comportamiento de fase líquido-cristalina (**Figura 3.4**). Adicionalmente, se observó la validez física de las simulación a partir del perfil de densidad electrónica. Además de que esta medida se puede adquirir vía difracción de rayos X; lo que esencialmente representa es la exclusión de las moléculas de agua del núcleo hidrofóbico de la bicapa y, la interacción favorable de estas moléculas de agua con la región polar de las moléculas de DPPC.

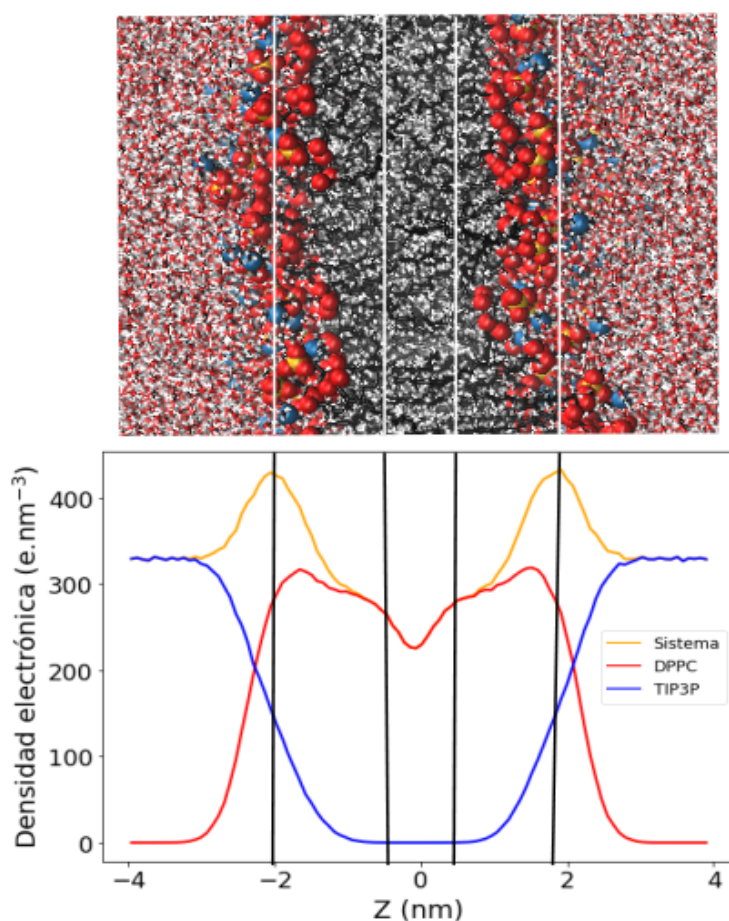


FIGURA 3.3: Representación gráfica del sistema de 300 moléculas de DPPC y $40 N_W/N_L$ en ajuste a la densidad electrónica.

El perfil de densidad es una propiedad bien interesante, dado que es un parámetro que se puede obtener de forma experimental y a partir de las simulaciones por DM. La densidad de la membrana depende esencialmente de la composición de lípidos,

el tamaño y el grado de insaturaciones de las cadenas carbonadas. Como se puede observar en la **Figura 3.4**, la densidad electrónica representa de forma acertada el ensamblaje y minimización de este sistema biológico, dado que muestra el núcleo hidrofóbico excluyendo las moléculas de agua y, el grupo polar de los lípidos en contacto con el solvente. La mayor distribución de cargas está en la parte polar de estos sistemas. El buen ajuste del perfil de densidad a lo esperado de forma experimental es también un soporte para la selección del tamaño del sistema.

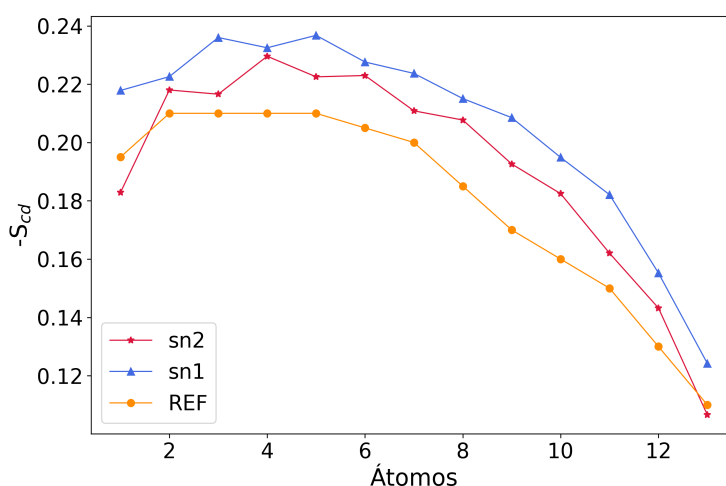


FIGURA 3.4: Parámetro de orden para las cadenas carbonadas de DPPC. El color naranja muestra el valor experimental [123].

Adicionalmente, otro parámetro bien interesante que soporta la selección de la proporción de moléculas lipídicas y agua, es el parámetro de orden. Esta propiedad estructural representa las torsiones que tienen los carbonos de las cadenas carbonadas, en consecuencia un mayor parámetro de orden da cuenta de un mayor grado de libertad en estas cadenas. Este parámetro es adquirido de forma experimental usando como técnica la RMN. En efecto, el comportamiento encontrado para este propiedad da cuenta de la calidad de la simulación, dado que representa el comportamiento de un sistema en fase líquido-cristalina.

Por otro lado, contrastamos la función de distribución radial P-P del sistema seleccionado y usando como referencia una simulación llevada a cabo con un campo de fuerza de átomos unidos (AMBER). Esta propiedad permite determinar la probabilidad de encontrar un átomo de fósforo en la vecindad de otro átomo de fósforo. Ambas curvas mostraron un comportamiento similar, a pesar de que ambos sistemas se trataron con diferentes número de moléculas y con un marco de interacciones diferentes. Esto nuevamente, confirma la validez de este campo de fuerza y la adecuada selección del tamaño del sistema.

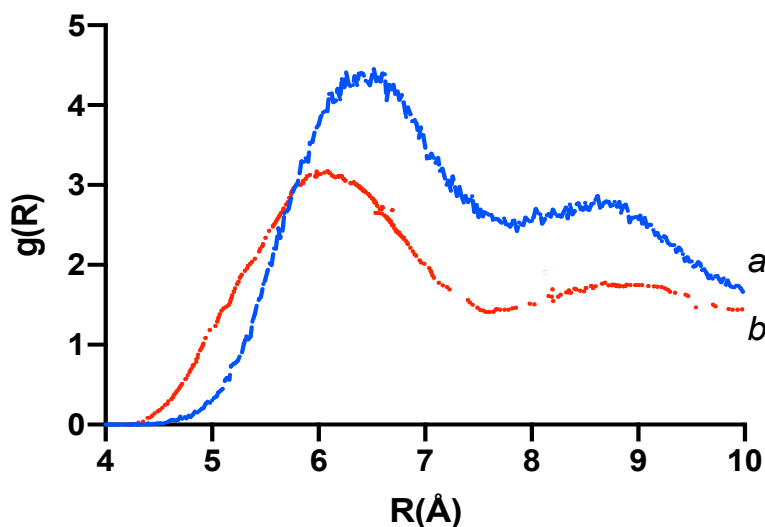


FIGURA 3.5: Función de distribución radial para P-P sistemas de DPPC. (a) Curva obtenida a partir de la simulación para un sistema de DPPC con 40 N_W/N_L . (b) Valor de referencia, curva obtenida con una simulación de átomos unidos [147].

3.4. Conclusiones

En general, todas las simulaciones recreadas mostraron un buen ajuste a lo experimental en relación a todas las propiedades seleccionadas para la comparación. Sin embargo, como se pudo apreciar, la composición de las bicapas tiene un efecto marcado en el comportamiento estructural, es decir, no es una característica trivial del sistema. En consecuencia, a partir de las propiedades estructurales y elásticas predichas, determinamos que la cantidad de moléculas de agua suficientes para llevar a cabo una simulación de un sistema de bicapa son 40 N_W/N_L y, 300 moléculas de lípidos. No obstante, cabe señalar que esta optimización del sistema puede no ser la adecuada para un sistema que considere interacciones con proteínas o algún ligando.

Capítulo 4

Variación del Campo de Fuerza

4.1. Introducción

En DM una molécula es descrita como una serie de esferas rígidas (partículas) cargadas y unidas por “resortes” (enlaces). Por tanto, para describir la evolución del sistema en el tiempo se debe emplear una construcción matemática (campo de fuerza) que represente las interacciones entre los distintos átomos que componen el sistema [70]. Los campos de fuerza para simulaciones de macromoléculas fueron desarrollados por primera vez hacia 1970. Desde entonces un gran número de campos de fuerza empíricos han sido desarrollados para la simulación de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otras moléculas biológicas [89]. Inicialmente, el desarrollo de parámetros para estos modelos se centró en la reproducción de datos *ab-initio* para moléculas pequeñas y datos estructurales de proteínas [136]. La segunda generación de campos de fuerza, desarrollada desde el comienzo de los años 90 tenía como objetivo reproducir, además de la estructura, propiedades termodinámicas como la densidad y la energía libre de hidratación, lo que permite el estudio de estados condensados [153].

Esencialmente, el valor predictivo de estas simulaciones dependerá de la precisión del modelo subyacente que describe las interacciones interatómicas. Por tanto, para llevar a cabo una simulación vía DM es fundamental la selección y validación del campo de fuerza empleado [105, 60, 88]. No obstante, la selección del modelo dependerá de las propiedades y la escala temporal que se requiera para la evolución del sistema. Los campos de fuerza difieren en su grado de resolución, es decir, según las distintas consideraciones que hacen sobre las partículas del sistema y, en consecuencia sobre los potenciales de interacción. El modelo de mayor resolución considera explícitamente todos los átomos del sistema en los cálculos; los campos de fuerza para lípidos a este nivel de resolución son: Lipid14 [31], Slipids [37], CHARMM-36 [72] y OPLS-AA [73]. Por otro lado, en menor nivel de resolución se encuentran los modelos de átomos-unidos y de *grano grueso* (del inglés, *coarse-grained*), en los cuales se forman pseudo-átomos, ya sea agrupando los hidrógenos no polares en los átomos más pesados o agrupando grupos funcionales como una sola partícula. Los modelos más empleados a este nivel de resolución son: Berger, GROMOS54a7 [26] y Martini [96].

En general, la selección de un campo de fuerza que incluya todos los átomos permite obtener una mayor comprensión de los mecanismos moleculares encargados de la estabilidad y dinámica de estos sistemas químicos [72], dado que facilita

la descripción detallada de los parámetros de orden y la dinámica de estos ensamblajes biológicos. En este capítulo hacemos una comparación de los campos de fuerza CHARMM-36 y Slipids, con el propósito de comprender las ventajas de seleccionar alguno de estos campos de fuerza; para ello emplearemos un modelo de bicapa monocomponente de DPPC.

4.2. Metodología

4.2.1. Sistemas de bicapas lipídicas

Con el ánimo de seleccionar un campo de fuerza que represente de forma acertada las propiedades físicas y mecánicas de estos ensamblajes biológicos, se hicieron simulaciones empleando el modelo de bicapas monocomponentes de DPPC, con una composición de 300 moléculas de lípido y 12000 moléculas de agua. Todos los sistemas fueron construidos empleando una celda unitaria rectangular. El modelo de DPPC se seleccionó debido a la vasta información experimental que se tiene de este. Para las moléculas de agua se utilizó el modelo CHARMM TIP3P [15]. Estos sistemas fueron construidos usando la opción Membrane Builder de la plataforma CHARMM-GUI [91, 72]. <http://www.charmm-gui.org/>. Los parámetros del campo de fuerza Slipids fueron obtenidos de <http://www.fos.su.se/~sasha/SLipids/Downloads.html> [37].

4.2.2. Detalles computacionales

Todas las simulaciones de Dinámica Molecular se llevaron a cabo empleando el software computacional GROMACS 5.0 [55, 162], para ello se emplearon los scripts generados por la plataforma CHARMM-GUI. Los sistemas fueron minimizados en energía utilizando 5000 pasos del algoritmo de máxima pendiente (del inglés steepest descent algorithm), seguido de seis pasos de equilibración. En los dos primeros pasos de la equilibración se consideró un colectivo canónico (NVT) y, para los pasos restantes se consideró un colectivo isotérmico-isobárico (NPT). Para la equilibración considerando ambos colectivos se empleó el termostato Berendsen a una temperatura de 323 K. Finalmente, en la producción se consideró un ensamble NPT a una temperatura de 323 K, para el acoplamiento de ésta se empleó el termostato Nose-Hoover [39] y, para el acoplamiento de la presión se empleó el barostato Parrinello-Rahman [119] con un escalamiento semi-isotrópico a una presión de 1 bar. Las simulaciones se llevaron a cabo bajo condiciones de frontera periódicas (PBC), y se usó la malla de partículas Ewald (PME) para los cálculos de las interacciones electrostáticas [29]. Además, se empleó el algoritmo de cambio de fuerza para las interacciones de tipo Lennard-Jones con un radio de corte de 1.0–1.2 nm. Tanto para la equilibración como para producción se usó el método de integración salto de rana (del inglés leap-frog) para resolver la ecuación del movimiento de Newton. Adicionalmente, se usó el algoritmo LINCS para restringir las longitudes de los enlaces de hidrógeno [56]. Para la producción se empleó un tiempo de paso de 2 fs y se guardaron las coordenadas, velocidades y fuerzas cada 50000 pasos, para un tiempo total de 100 ns.

4.2.3. Análisis de datos

Para los sistemas simulados se hizo una comparación entre las propiedades estructurales, dinámicas y mecánicas: área por lípido, espesor de la bicapa, densidad electrónica, parámetro de orden, la autodifusión de los lípidos en la bicapas y el módulo de compresibilidad. Para los análisis, se estableció el plano de las bicapas lipídicas a lo largo de los ejes XY, con el eje Z atravesando la bicapa de forma perpendicular, como lo indica la convención. El área por lípido (A_L) de una bicapa lipídica monocomponente se define como el área de la sección transversal (A_{XY}) de todo el sistema a lo largo del plano superficial de la bicapa (plano XY), dividido por la mitad de moléculas del total de lípidos (N_L) presentes en la bicapa, es decir, $A_L = A_{XY}/(N_L/2)$. El valor espesor de la bicapa (D_{PP}) y su respectiva variación en el plano XY de la bicapa se calculó con la herramienta GridMAT-MD [4]. Los perfiles de densidad electrónica se calcularon utilizando la herramienta *gmx density* en GROMACS, con la caja de simulación dividida en 500 bloques paralelos al plano XY. El parámetro de orden ($-S_{cd}$) fue calculado empleando la opción *gmx order* en GROMACS. El módulo de compresibilidad fue calculado empleando el modelo de variación en el área de la caja de simulación. Para visualizar e inspeccionar el sistema se empleó la herramienta VMD [58]. Todos los gráficos fueron contruídos empleando las herramientas GNUplot [174], XMGRACE [174] y Python 3.6 [164].

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Estabilidad del sistema

Se examinaron los diferentes aspectos de la trayectoria y estabilidad termodinámica del sistema para asegurar la validez física de la simulación. A partir de la inspección visual se pudo observar que no hubo interacciones anormales entre los átomos ni hubo ruptura de los enlaces químicos. Adicionalmente, se pudo verificar que bajo las condiciones de la simulación, la membrana tuvo un comportamiento de fase líquido-cristalina **Figura 4.1**. Adicionalmente, la validez física de las simulaciones con ambos campos de fuerza se puede apreciar en el perfil de densidad electrónica (la cual puede ser verificado por difracción de rayos X), dado que este diagrama representa la exclusión del agua del núcleo hidrofóbico de la bicapa y, la interacción favorable de estas moléculas de agua con la región polar de las moléculas de DPPC.

4.3.2. Propiedades estructurales

Las propiedades estructurales y elásticas de los sistemas de bicapas simuladas se resumen en el **Cuadro 4.1** con sus respectivos valores experimentales obtenidos a una temperatura de 323 K. Cabe resaltar que los valores del área por lípido y el espesor de la bicapa dependen esencialmente del método experimental que se emplea para extraer la información de estos sistemas. No obstante, el método que brinda un mejor valor para el área por lípido es la difracción de rayos X [130]; con un valor reciente de 0.631 nm^2 para bicapas de DPPC [77, 76]. Por otro lado, la técnica experimental que arroja un valor más certero para el espesor de la bicapas es difracción de rayos X [130]; la estimación actual para este parámetro es 3.9 nm (cite).

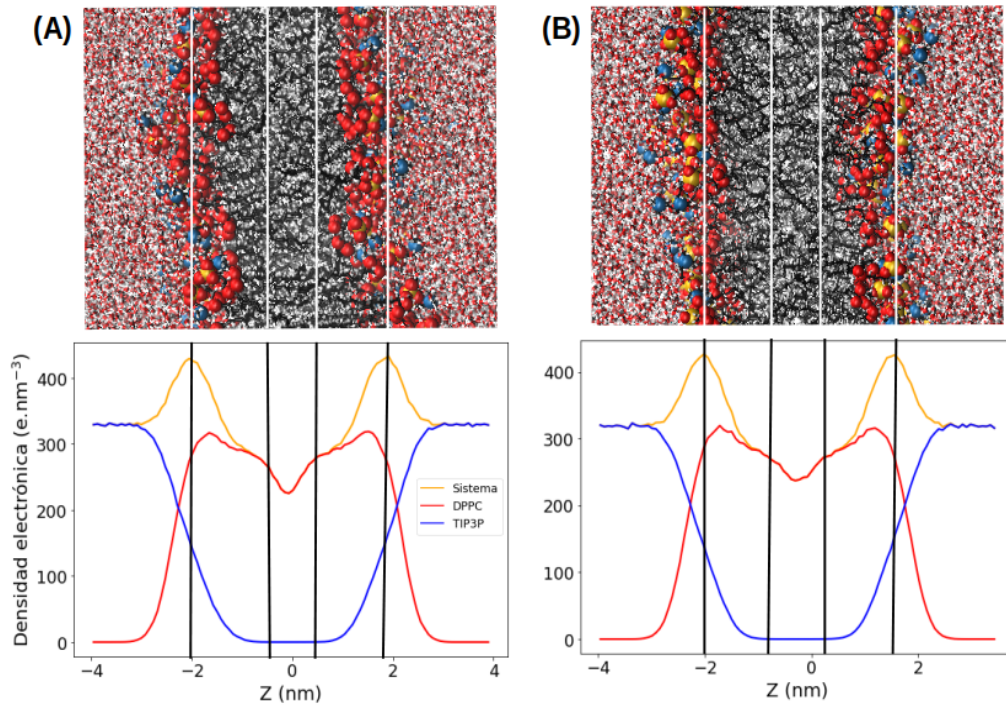


FIGURA 4.1: Densidad electrónica para los dos campos de fuerza. (A) CHARMM-36. (B) Slipids.

A pesar de que ambos campos de fuerza se han validado para una gran cantidad de moléculas de lípidos, a partir las propiedades determinadas se puede observar claramente que ambos campos de fuerza difieren en los valores predichos. Si bien ambos modelos logran representar acertadamente estos sistemas. No obstante, el error asociado con los parámetros predichos con el modelo Slipids es mayor al obtenido con CHARMM-36. De hecho, el campo de fuerza Slipids subestima el espesor de la bicapa con un 5.1 % de error en esta medida. Los valores obtenidos para el desplazamiento cuadrático medio se encuentran un orden de magnitud por debajo de lo experimental [116], no obstante, este comportamiento se ha reportado en otras simulaciones de DM [80].

CUADRO 4.1: Comparación de las propiedades de los sistemas de bicapa empleando CHARMM-36 y Slipids y, sus respectivos valores experimentales. Los valores en paréntesis muestran el porcentaje de error respecto al valor experimental.

Campo de Fuerza	A_L (nm^2)	MSD (cm^2/s) 10^{-5}	D_{PP}	K_A (mN/m)	K^b ($K_b\text{T}$)
CHARMM-36	0.610	0.0087	4.1	255	22.9
Slipids	0.652	0.0301	3.6	205	12.9
Referencia	0.631	0.13	3.9	231	12.023

El área por lípido, por ejemplo, es un valor muy sensible a las interacciones del

sistema y es crucial para la validación del mismo. Como se puede observar en la **Figura 4.2**, este parámetro como es de esperar, presenta una gran fluctuación en todo el tiempo muestreado. No obstante, además de que el modelo de Slipids sobreestima este valor, durante toda la trayectoria tiene una gran fluctuación, con una desviación estándar de 0.009 nm^2 . El valor arrojado por los modelos empleados indica un mayor grado de libertad en las cadenas carbonadas, lo cual es indicador de la fase líquido-desordenado de estos sistemas.

De hecho, este comportamiento de fase también se evidencia por el valor del espesor arrojado por ambos modelos, 4.1 y 3.6 nm, para CHARMM-36 y Slipids, respectivamente. No obstante, al igual que el área por lípido, el espesor predicho por el campo de fuerza Slipids tiene un comportamiento más heterogéneo sobre el plano XY de la bicapa **Figura 4.3**. Además, a partir del valor del espesor se puede confirmar una vez más el comportamiento líquido-cristalino de estos sistemas.

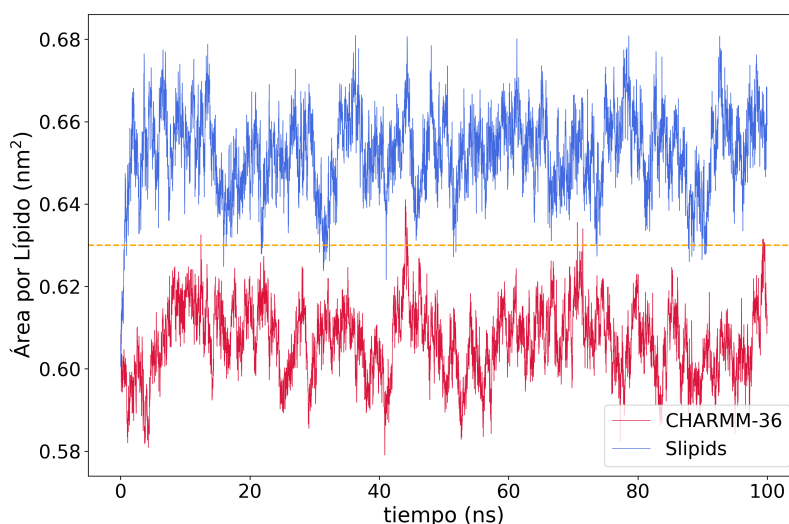


FIGURA 4.2: Comparación del parámetro de área por lípido para el modelo de DPPC empleando los campos de fuerza CHARMM-36 (Púrpura) y Slipids (Azul). La línea discontinua de color naranja representa el valor experimental de este parámetro.

A partir del análisis de las propiedades elásticas para los sistemas simulados se evidenció una gran consistencia con las medidas experimentales (**Cuadro 4.1**). Primero, se evaluó el módulo de compresibilidad, el cual describe la capacidad de la bicapa de ser deformada. Posteriormente, a partir de los cálculos del módulo de compresibilidad y el espesor de la bicapa se determinó el módulo de rigidez. Ambos parámetros representan propiedades mecánicas fundamentales de las bicapas lipídicas. El módulo de compresibilidad para las simulaciones realizadas toma valores de 255 mN/m y 205 mN/m. El campo de fuerza CHARMM-36 logra reproducir mejor esta propiedad respecto a la medida experimental, 237 mN/m [137], con un error del 8% y, un error 14% usando Slipids como campo de fuerza. Adicionalmente, las

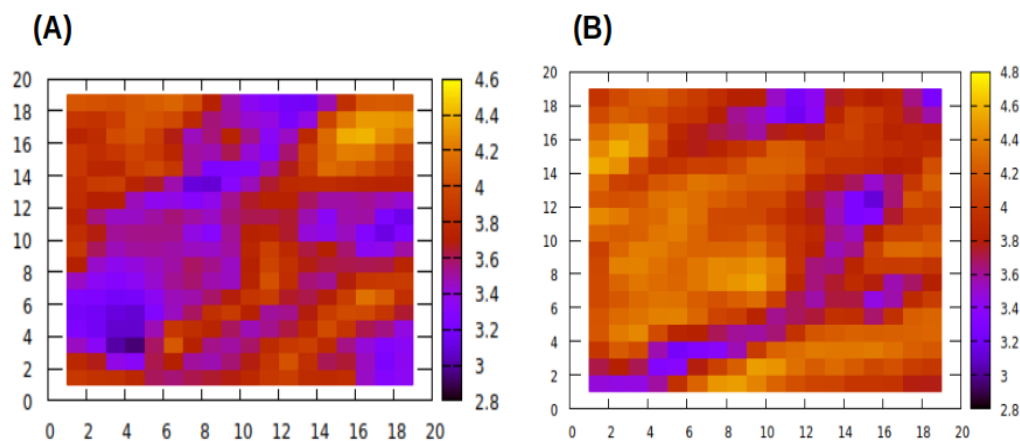


FIGURA 4.3: Comparación del espesor de los sistemas de bicapa empleando los campos de fuerza. (A) Slipids. (B) CHARMM-36.

medidas obtenidas para el módulo de rigidez se aproximan en gran medida a los diferentes valores experimentales: $16.7 K_B T$ obtenido con datos de difracción de rayos X [137], $13.5 K_B T$ a partir de la aspiración de micropipeta [27], $31.4 K_B T$ de la fluctuación de forma excitada térmicamente [103] y $32.1 K_B T$ obtenida con una medición totalmente óptica [79].

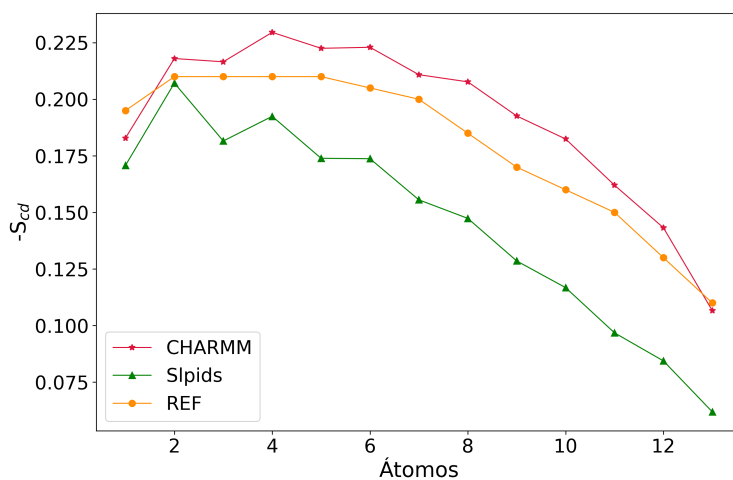


FIGURA 4.4: Comparación del parámetro de orden (correspondiente al valor promedio para las dos cadenas carbonadas) para los sistemas de bicapas de DPPC empleando los campos de fuerza CHARMM-36 (Púrpura) y Slipids (Verde). Los valores experimentales para este parámetro se muestran en color naranja [123].

Una de las propiedades más importante para la validación de los campos de fuerza son los parámetros que se obtienen a partir de técnicas de RMN, como el parámetro de orden y el espesor de la bicapa. El parámetro de orden, para ambos modelos está en concordancia con los valores experimentales. Sin embargo, al igual que con las

otras propiedades adquiridas, el campo de fuerza CHARMM-36 se ajusta más a los datos experimentales **Figura 4.5**. De hecho, esta propiedad nos permite verificar que este campo de fuerza representa mejor la fase L_α , dado que los grados de libertad en los enlaces de las cadenas carbonada son mayores para este modelo.

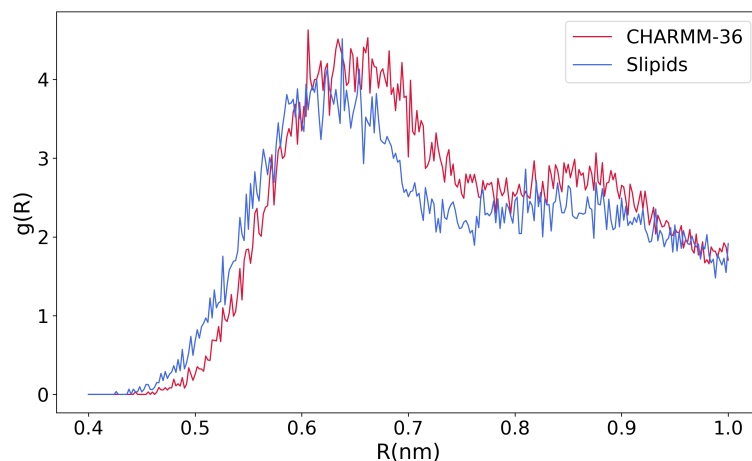


FIGURA 4.5: Comparación de la función de distribución radial empleando los campos de fuerza CHARMM-36 (Púrpura) y Slipids (Azul) de P-P.

4.4. Discusión y conclusiones

Recientemente se han desarrollado numerosos campos de fuerza que incluyen las interacciones entre todos los átomos. Sin embargo, el modelo Lipid14 no es de libre acceso y el campo de fuerza OPLS-AA se restringe a un tamaño específico del sistema. En consecuencia, contrastamos la validez de los modelos Slipids y CHARMM-36, los cuales son de uso libre y están parametrizados para distintas moléculas de lípidos. Esencialmente, los dos campos de fuerza estudiados mostraron un buen rendimiento computacional y en la predicción del comportamiento de los sistemas de bicapas. No obstante, CHARMM-36 logró predecir de forma más acertada todas las propiedades analizadas. Este campo de fuerza fue el primero de estos modelos en incluir las interacciones entre todos los átomos de un sistema de bicapas. De hecho, este modelo proporciona parámetros adecuados para representar las propiedades de orden de la bicapa [72].

Por otro lado, Slipids se encuentra basado en los parámetros de enlace del modelo CHARMM. No obstante, se diferencia en los valores de las cargas parciales y los parámetros de Lennard-Jones. La estrategia de parametrización de las cargas de este modelo es similar a la implementada por AMBER, en la cual se emplea el método HF/6-31G* a un nivel de B3LYP/6-31G*. Estos ajustes a los parámetros hacen que Slipids sea compatible con la mayoría de los campos de fuerza de AMBER. Los parámetros de Slipids disponibles actualmente incluyen moléculas de PC, PE, PG y PS saturadas e insaturadas, así como esfingomielina y colesterol. No obstante, por lo

general este modelo se emplea cuando se consideran sistemas de bicapas con proteínas embebidas en ellas.

A partir de este trabajo, logramos evidenciar que el campo de fuerza CHARMM-36 en comparación al modelo Slipids muestra un mejor ajuste en la propiedades estructurales y dinámicas del sistema de bicapa DPPC usando la metodología mencionada. Sin embargo, los resultados obtenidos difieren en gran medida de la validación del campo de fuerza. Esto esencialmente, se puede deber a un sesgo metodológico, dado que para la construcción de los sistemas usamos la plataforma CHARMM-GUI. Por tanto, el uso de esta plataforma puede crear un sesgo en el sistema haciendo que el modelo Slipids requiera de un mayor tiempo computacional para ajustarse más las propiedades experimentales.

A pesar de que ambos campos de fuerza mostraron un buen comportamiento, seleccionaremos el modelo CHARMM-36 para las posteriores simulaciones. Esto, dado que en primer lugar usando la metodología ya mencionada fue el que mejor logró ajustarse a las medidas experimentales. En segundo lugar, la selección de este campo de fuerza se debe a que tiene parametrizado más de 200 lípidos y pequeñas moléculas, lo cual permite la construcción y simulación de sistemas de mayor complejidad [72]. En contraste, Slipids solo cuenta con 30 moléculas parametrizadas [37]. En consecuencia, para las posteriores simulaciones implementaremos únicamente el campo de fuerza CHARMM-36 para determinar el comportamiento de otros sistemas de bicapas lipídicas monocomponente y sistemas de composición heterogénea.

Capítulo 5

Comportamiento de fase en bicapas lipídicas monocomponentes

5.1. Introducción

La base estructural principal de las membranas biológicas es la bicapa lipídica [101]. Dependiendo de la composición, la temperatura, la presión entre otros factores externos; la estructura de la bicapa puede adoptar distintas fases lamelares, cristalina (L_c), gel ($L_{\beta'}$), ondulado ($P_{\beta'}$) y líquido-desordenado (L_{α}). Estas distintas fases se pueden conseguir en ese orden con el incremento gradual en la temperatura [75]. La transición de fase tipo gel al líquido-desordenado ocurre a una temperatura crítica de fusión (T_m), durante el proceso de calentamiento. Esta transición de fase se caracteriza por el ordenamiento de las cadenas de hidrocarburos en el interior de la bicapa [138]. Las transiciones de fase de las membranas biológicas han cobrado bastante interés en los últimos años, dado que este fenómeno biológico puede afectar drásticamente los procesos celulares esenciales como la permeabilidad de la membrana [110, 16], los procesos de fusión de la membrana [22, 153] y la propagación del pulso nervioso [54]. Este fenómeno se ha abordado para sistemas de DPPC en simulaciones considerando un modelo de todos los átomos [131, 74] y, empleando modelos de grano grueso, para comprensión de la coexistencia de distintas fases [94, 108]. En este capítulo determinamos los cambios estructurales asociados con el comportamiento termotrópico de bicapas monocomponentes de DPPC, DPPE, DPPS y PSM. Esto con el fin de comprender con mayor detalle los eventos moleculares asociados a las distintas fases que experimentan estos sistemas de composición simple.

5.2. Metodología

5.2.1. Sistemas de bicapas lipídicas

Para comprender y caracterizar el comportamiento de fase de distintos modelos de bicapas de fosfolípidos y esfingolípidos, se construyeron modelos monocomponentes de DPPC, DPPE, DPPS y PSM con una composición de 300 moléculas de cada uno de estos lípidos y 12000 moléculas de agua. Todos los sistemas fueron ensamblados usando la opción Membrane Builder de la plataforma CHARMM-GUI [91, 72]. <http://www.charmm-gui.org/>. Para tratar las interacciones se usó el modelo de CHARMM TIP3P [15]. Para las moléculas de lípidos se empleó el modelo CHARMM-36 [72].

5.2.2. Detalles computacionales

Todas las simulaciones de Dinámica Molecular se llevaron a cabo empleando el software computacional GROMACS 5.0 [55, 162], para ello se emplearon los scripts generados por la plataforma CHARMM-GUI. Para cada uno de los sistemas construidos se hicieron variaciones en la temperatura para capturar el comportamiento de fase. Para cada uno de los lípidos se hicieron variaciones en la temperatura cercanas al valor de transición de fase. Los sistemas fueron minimizados en energía utilizando 5000 pasos del algoritmo de máxima pendiente (del inglés steepest descent algorithm), seguido de seis pasos de equilibración. En los dos primeros pasos de la equilibración se consideró un colectivo microcanónico (NVT) y, para los pasos restantes se consideró un colectivo isotérmico-isobárico (NPT). Para la equilibración considerando ambos colectivos se empleó el termostato Berendsen. Finalmente, en la producción se consideró un ensamble NPT, para el acoplamiento de ésta se empleó el termostato Nose-Hoover [39] y, para el acoplamiento de la presión se empleó el barostato Parrinello-Rahman [119] con un escalamiento semi-isotrópico a una presión de 1 bar. Las simulaciones se llevaron a cabo bajo condiciones de frontera periódicas (PBC), y se usó la malla de partículas Ewald (PME) para los cálculos de las interacciones electrostáticas [29]. Además, se empleó el algoritmo de cambio de fuerza para las interacciones de tipo Lennard-Jones con un radio de corte de 1.0–1.2 nm. Tanto para la equilibración como para producción se usó el método de integración salto de rana (del inglés leap-frog) para resolver la ecuación del movimiento de Newton. Adicionalmente, se usó el algoritmo LINCS para restringir las longitudes de los enlaces de hidrógeno [56]. Para la producción se empleó un tiempo de paso de 2 fs y se guardaron las coordenadas, velocidades y fuerzas cada 5000 pasos, para un tiempo total de 100 ns.

5.2.3. Análisis de datos

Para los sistemas simulados se hizo una comparación entre las propiedades estructurales, dinámicas y mecánicas: área por lípido, espesor de la bicapa, densidad, parámetro de orden, la autodifusión de los lípidos en la bicapa y el módulo de compresibilidad. Para los análisis, se estableció el plano de las bicapas lipídicas a lo largo de los ejes XY, con el eje Z atravesando la bicapa de forma perpendicular, como lo indica la convención. El área por lípido (A_L) de una bicapa lipídica monocomponente se define como el área de la sección transversal (A_{XY}) de todo el sistema a lo largo del plano superficial de la bicapa (plano XY), dividido por la mitad de moléculas del total de lípidos (N_L) presentes en la bicapa, es decir, $A_L = A_{XY}/(N_L/2)$. El espesor de la bicapa (D_{PP}) se calculó con la herramienta GridMAT-MD [4]. Los perfiles de densidad se calcularon utilizando la herramienta *gmx density* en GROMACS, con la caja de simulación dividida en 500 bloques paralelos al plano XY. El parámetro de orden ($-S_{cd}$) fue calculado empleando la opción *gmx order* en GROMACS. Para visualizar e inspeccionar el sistema se empleó la herramienta VMD. Todos los gráficos fueron contruídos empleando las herramientas GNUplot [174], XMGRACE [174] y Python 3.6 [164].

5.3. Resultados y discusión

Estudiar el comportamiento de los modelos de bicapas lipídicas de un solo componente en distintas fases vía simulaciones computacionales tiene muchos beneficios. En primer lugar, estas simulaciones dan cuenta de la capacidad que tiene un campo de fuerza para representar la estructura de la fase ordenada, lo cual es una medida de la precisión este modelo. Además, permite esclarecer los mecanismo moleculares que tienen lugar en las distintas fases. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio es obtener una mejor comprensión de las propiedades dinámicas asociadas a las distintas fases de bicapas de diferentes fosfolípidos y esfingomielna. Todo ello con la finalidad de comprender la precisión del campo de fuerza para capturar la dinámica de diferentes lípidos, contribuir al conocimiento de las propiedades de estos sistemas a diferentes temperaturas y, llevar a cabo simulaciones de bicapas heterogéneas que contengan estos lípidos.

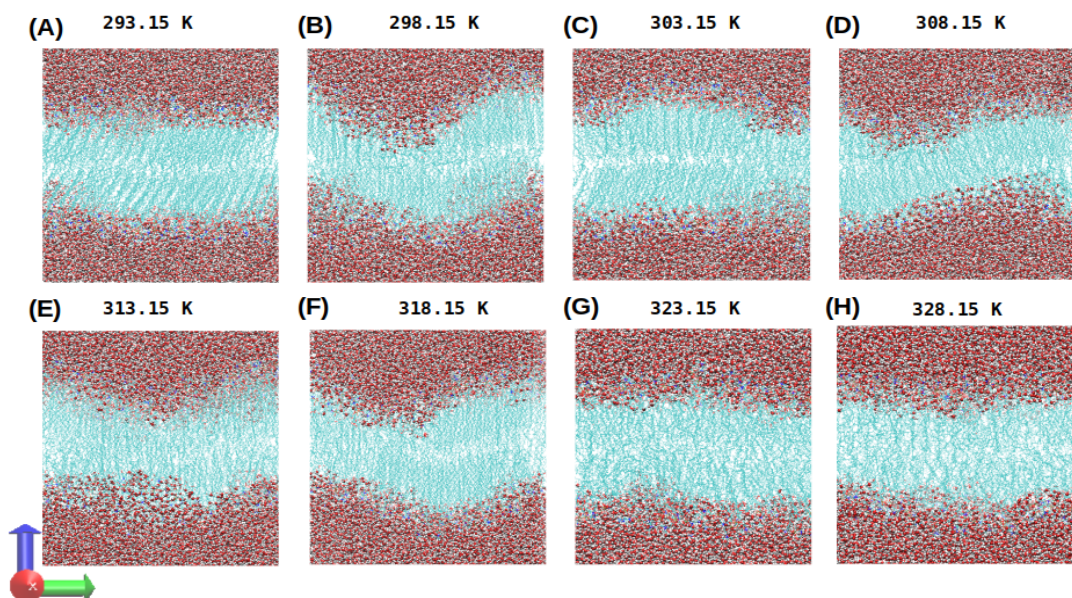


FIGURA 5.1: Visualización del comportamiento de fase para sistemas de bicapas de DPPC, cada una de las imágenes son pantallazos de los últimos 30 ns de la simulación en el plano YZ. En color cian se representan los lípidos y las moléculas de agua tienen una representación de tipo van der Waal.

Las membranas biológicas pueden dividirse en tres fases generales: (L_c), (L_β) y fase líquido-desordenado (L_α). Usualmente, en el estado gel-cristalino, todas las moléculas de lípidos se ordenan a lo largo del eje Z de la misma forma (82). Durante la transición del gel-ordenado a la fase el valor promedio de área por lípido incrementa y las cadenas hidrocarbonadas comienzan a tener una dinámica bien particular; los lípidos además comienzan a tener una mayor movilidad en la bicapa, son más desordenados y están menos empaquetados, lo cual incrementa el desorden del sistema. La transición del gel a la fase cristalina líquido-desordenada también se acompaña de un aumento en el área por lípido y una reducción del espesor de la bicapa. Por lo tanto, la fase (L_α) a altas temperatura se caracteriza por un desorden estructural

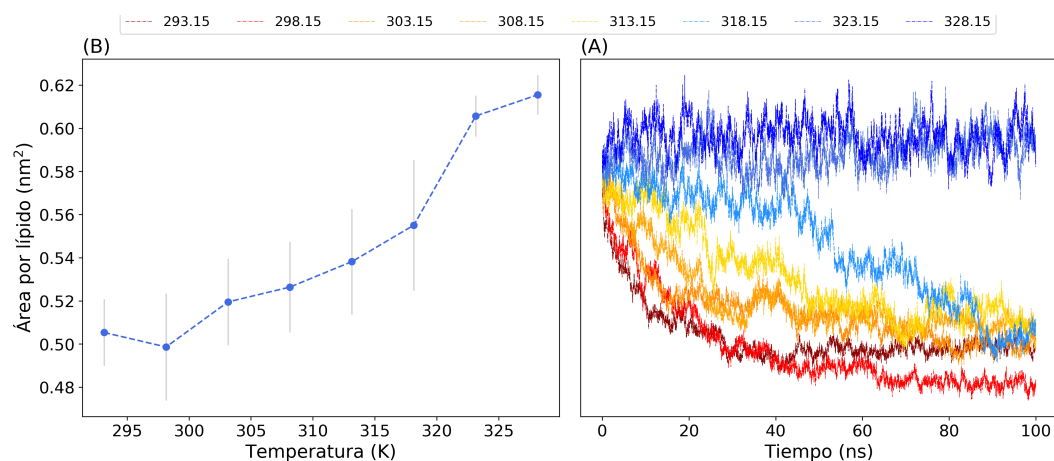


FIGURA 5.2: Comportamiento del área por lípido. (A) Valor promedio del área por lípido y su respectiva desviación estándar a diferentes temperaturas. (B) Comportamiento del área por lípido durante toda la producción de la DM.

considerable.

Inicialmente, hicimos una inspección visual de los sistemas de DPPC a diferentes temperaturas; con esto pudimos observar la transición desde un estado ordenado o tipo gel (**Figura 5.1 A**) a un estado líquido desordenado (**Figura 5.1 G-H**) con el incremento de la temperatura. De hecho, para los fosfolípidos se ha reportado experimentalmente la existencia de una fase gel ondulada ($P_{\beta'}$) previa en la transición de fase ($T_m = 315.15$ K), la cual también se logra apreciar en los sistemas simulados a temperaturas que van desde 298.15 K a 318.15 K (**Figura 5.1 B-F**). La fase $L_{\beta'}$ se caracteriza por tener una apariencia ondulada en micrografías electrónicas, lo cual también se ve claramente en las visualizaciones del sistema. La fase líquido-cristalina se puede observar a partir de los 323.15 K (**Figura 5.1 G**), donde claramente los lípidos presentan un mayor desorden en las cadenas hidrocarbonadas.

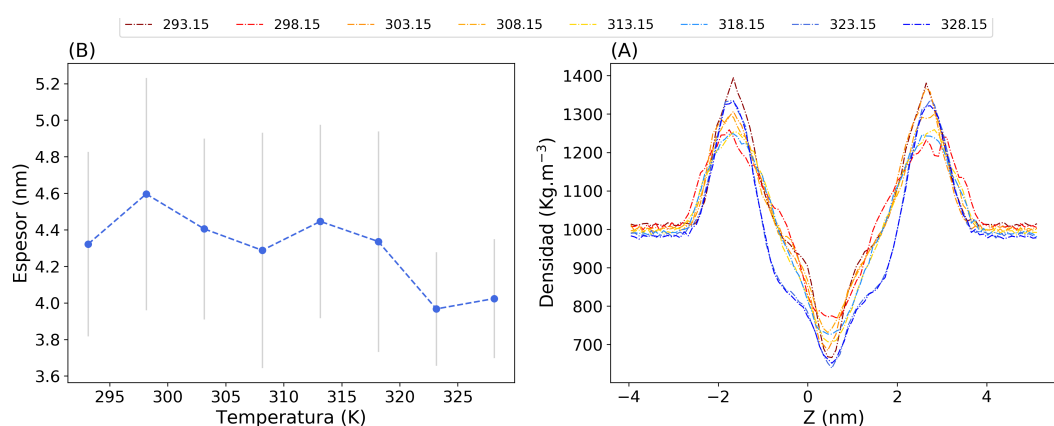


FIGURA 5.3: Comportamiento del espesor y (B) el perfil de densidad para los distintos sistemas DPPC a varias temperaturas.

Además de la inspección visual, los mecanismos asociados a los cambios en la

transición de fase se pueden cuantificar con el área por lípido, el espesor de la bicapa, el grado de orden de las cadenas hidrocarbonadas, la autodifusión de los lípidos en la bicapa y, las propiedades elásticas de estos sistemas. Como se muestra en la **Figura 5.2** los sistemas de DPPC simulados a diferentes temperaturas alcanzan una convergencia de la DM y, con el aumento en la temperatura se obtiene un incremento gradual del parámetro de área por lípido, es decir, a bajas temperaturas los lípidos tienen un mayor empaquetamiento en comparación con los sistemas simulados a altas temperaturas. De hecho, en el intervalo de 318.15 K a 323.15 se obtiene un incremento sustancial en este parámetro, lo cual da cuenta de la transición de fase del gel al líquido.

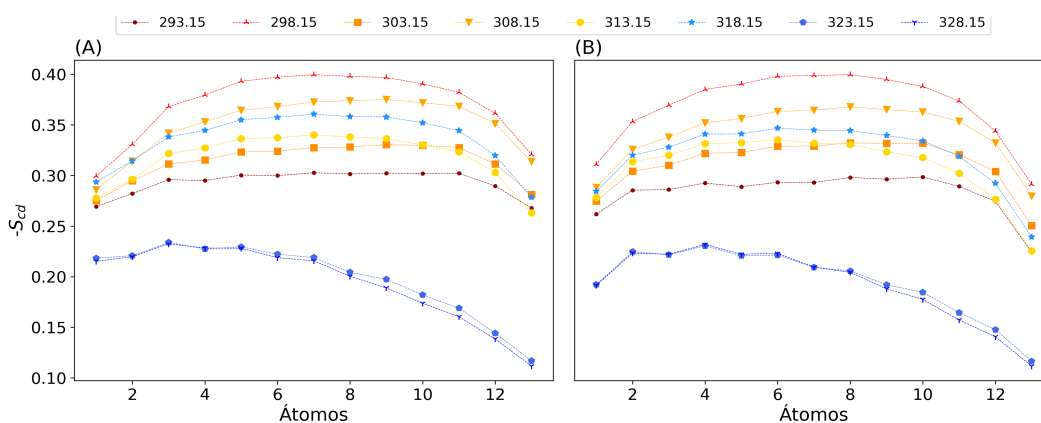


FIGURA 5.4: Variación en el parámetro de orden para el DPPC a distintas temperaturas. (A) Cadena hidrocarbonada sn-1. (B) Cadena hidrocarbonada sn-2.

El espesor también se cuantificó para el DPPC a diferentes temperaturas. Como se expone en la **Figura 5.3** el valor del espesor cae en función de la temperatura. De hecho, a temperaturas por debajo de la transición de fase del DPPC, el espesor presenta una mayor desviación estándar, la cual es introducida por las ondulaciones presentes en la fase $L_{\beta'}$. Los sistemas desordenados presentan un comportamiento más homogéneo en esta medida **Figura 5.3**. Los valores del área por lípido y el espesor son factores claves para determinar la calidad de la simulación y el tiempo muestreado. Por tanto, el comportamiento de ambos parámetros verifica que el tamaño del sistema y el tiempo de trayectorias son los adecuados para describir este comportamiento de fase. De hecho, diferentes estudios computacionales han puesto en evidencia el comportamiento de fase de sistemas de DPPC empleando campos de fuerza de átomos unidos y de grano grueso [151]. Para ello emplean mecanismos de calentamiento y enfriamiento durante el proceso de la DM [81]. Sin embargo, reportaron la transición de fase a 295.7 K, la cual está por debajo del valor experimental (315.15 K). En este estudio, tratamos de determinar la temperatura de transición de fase a partir de los valores de la capacidad calórica del sistema. No obstante, para determinar esta variable termodinámica se deben incluir más de 1000 moléculas de lípidos al sistema y trayectorias extensas, lo cual requiere de un costo computacional elevado.

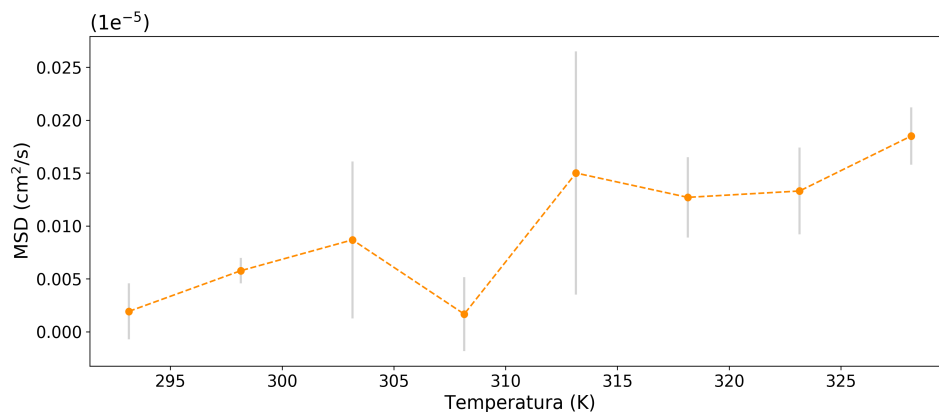


FIGURA 5.5: Variación promedio en el desplazamiento cuadrático medio para el DPPC a distintas temperaturas. Las barras grises representan la desviación estándar.

A pesar de que no se tuvieron medidas de la capacidad calórica, las variables que analizamos son bastantes dicentes de las transiciones conformaciones del DPPC en respuesta a la temperatura. De hecho, los parámetros de área por lípido y el espesor nos dan una pista del rango de temperatura (318.15 a 323.15 K) donde se alcanza el mayor pico de capacidad calórica o la temperatura de fusión, la cual es cercana al valor reportado de forma experimental (315.15 K). Uno de los parámetros para observar la calidad de la simulación es el perfil de densidad. Esencialmente la longitud de los valores mínimos y máximos de la figura varían en función de la temperatura. Esencialmente, al incrementar la temperatura las cadenas hidrocarbonadas se expanden a lo largo del plano XY lo cual se ve reflejado en este perfil.

Uno de los métodos más comunes y el más preciso para caracterizar el orden en las membranas es el parámetro de orden, el cual se puede obtener experimentalmente mediante RMN de deuterio. Los parámetros proporcionan una medida de la alineación de las cadenas de hidrocarburos en la membrana. Específicamente, los parámetros de orden dan una idea de la orientación de las cadenas de los lípidos con respecto a la normal de la bicapa (eje Z). Nuevamente, la medida obtenida de este parámetro para el DPPC a diferentes temperaturas (**Figura 5.4 A-B**) concuerda con lo obtenido para los otros parámetros. De hecho, claramente se puede observar que a menor temperatura las cadenas hidrocarbonadas se encuentran alineadas con la normal de la bicapas, mientras que a altas temperaturas las cadenas carbonadas adquieren un menor parámetro de orden, es decir, se comportan como un líquido-desordenado. Cabe señalar que el parámetro de orden al igual que los otros parámetro analizados tiene un comportamiento marcado en las temperaturas superiores a 318.15 K, lo cual nos lleva a concluir que este comportamiento está asociado con una transición de fase para DPPC. El comportamiento inclinado de los lípidos en la fase $L_{\beta'}$ genera comportamiento variables en el parámetro de orden; no obstante se conservan muy cercanos estos valores entre la fase gel y la fase gel ondulada.

La **Figura 5.5** muestra el comportamiento del desplazamiento cuadrático medio

en función de la temperatura para un sistema de DPPC. Claramente se puede apreciar un crecimiento de este parámetro en función a la temperatura. De hecho, estos valores están en concordancia con valores determinados para el DPPC a diferentes temperaturas empleando un modelo de grano grueso y de todos los átomos [80]. Los valores de MSD para nuestros sistemas varían desde 0.001925 a 0.018500 cm^2/s . Adicionalmente, se puede apreciar un alto valor (313.15 K) en este parámetro antes de alcanzar la transición al líquido desordenado. Por lo general, para calcular coeficientes de difusión se requiere de un mayor tiempo computacional.

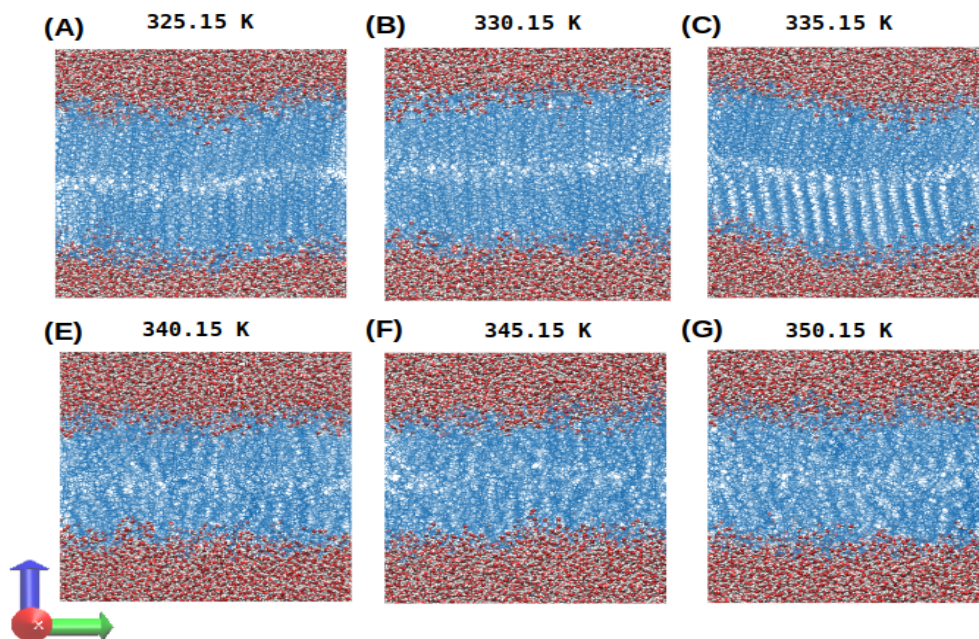


FIGURA 5.6: Visualización comportamiento de fase para sistemas de bicapas de DPPE, cada una de las imágenes son pantallazos de los últimos 30 ns de la simulación en el plano YZ. En color azul se representan los lípidos y las moléculas de agua tienen una representación de tipo van der Waals, con el hidrógeno de color blanco y el oxígeno de color rojo.

5.3.1. Comportamiento termotrópico del DPPE

Inicialmente, hicimos una inspección visual de los sistemas de DPPE a diferentes temperaturas; con esto pudimos observar la transición desde un estado ordenado o tipo gel (**Figura 5.6 A-B**) a un estado líquido desordenado (**Figura 5.6 E-G**) con el incremento de la temperatura. A pesar de que experimentalmente se ha reportado para fosfolípidos la existencia de una fase gel ondulada ($P_{\beta'}$) previa en la transición de fase, para el DPPE no se ha conseguido obtener esta fase de forma experimental [107, 25, 84]. Sin embargo, a partir de nuestras simulaciones logramos apreciar a 335.15 K un comportamiento tipo gel ondulada (**Figura 5.6 B-F**). La fase $L_{\beta'}$ se caracteriza por tener una apariencia ondulada en micrografías electrónicas, lo cual también se ve claramente en las visualizaciones del sistema. La fase líquido-cristalina se puede observar a partir de los 340.15 K (**Figura 5.6 E**), donde claramente los lípidos presentan un mayor desorden en las cadenas hidrocarbonadas, lo cual coincide con

valores de temperatura de fusión ($T_m = 336.55$ K) reportados experimentalmente para el DPPE [84]. De hecho, la transición de fase para el DPPE fue similar a la observada para el DPPC, excepto que, debido a su propiedad estructural del grupo polar del lípido (la etanolamina), la bicapa por debajo de la temperatura de fusión consistió principalmente en fases tipo gel, mientras que el DPPC tuvo un comportamiento por debajo de esta temperatura de transición dominado por una fase tipo gel ondulada.

Como se había señalado anteriormente, el comportamiento de fase se ve reflejado en las propiedades estructurales de los sistemas de bicapas lipídicas. Los parámetros medidos para el DPPE tuvieron las mismas tendencias que para el sistema de DPPC. Por ejemplo, al incrementar la temperatura del sistema se obtienen valores mayores del área por lípido. Sin embargo, un hecho bastante interesante es que a diferencia del DPPC, el DPPE refleja a menores temperaturas un mayor empaquetamiento en los lípidos (ver **Figura 5.7**). Esta reducción en este parámetro se encuentra asociada a las características químicas y estructurales del grupo polar, como se había reportado en otras simulaciones [161].

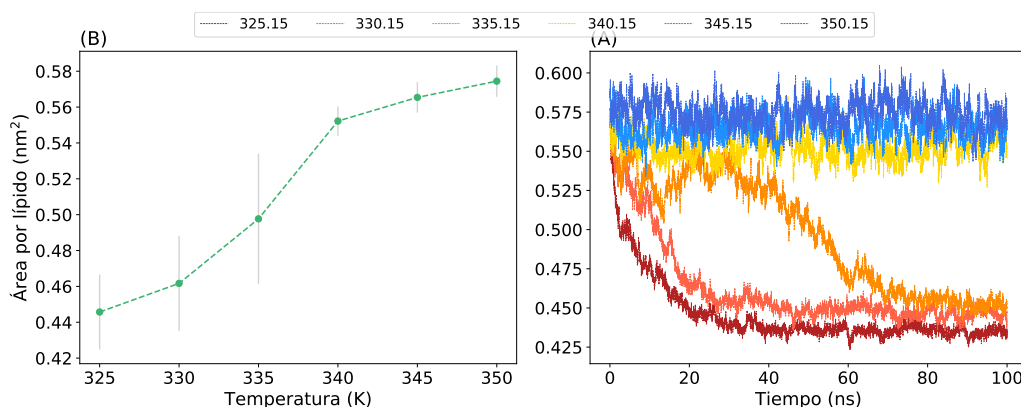


FIGURA 5.7: (A) Valor promedio del área por lípido y su respectiva desviación estándar a diferentes temperaturas para el DPPE. (B) Comportamiento del área por lípido durante toda la producción de la DM.

Adicionalmente, el desorden en las cadenas hidrocarbonadas se ve reflejado en la disminución del espesor (ver **Figura 5.8**). De hecho, después de la transición de fase se observa una disminución sustancial en este parámetro, lo cual indica un reordenamiento significativo en las cadenas hidrocarbonadas. A diferencia de lo establecido en los estudios experimentales [176] y por simulaciones [81], nosotros logramos identificar una fase líquido desordenada estable para los sistemas a temperatura mayores a los 340 K, esto dado el comportamiento convergente de las trayectorias a estas temperaturas (ver **Figura 5.7-A**) y, la metodología usada, es decir, simulaciones con trayectorias extendidas a 100 ns a una sola temperatura.

En concordancia con lo establecido en las simulaciones llevadas a cabo por Lee-kumjorn et al. [81] el parámetro de orden sufre alteraciones por la temperatura. De hecho, a medida que se incrementa la temperatura disminuye este parámetro (ver **Figura 5.10**), indicando así un mayor desorden o mayores cambios conformacionales

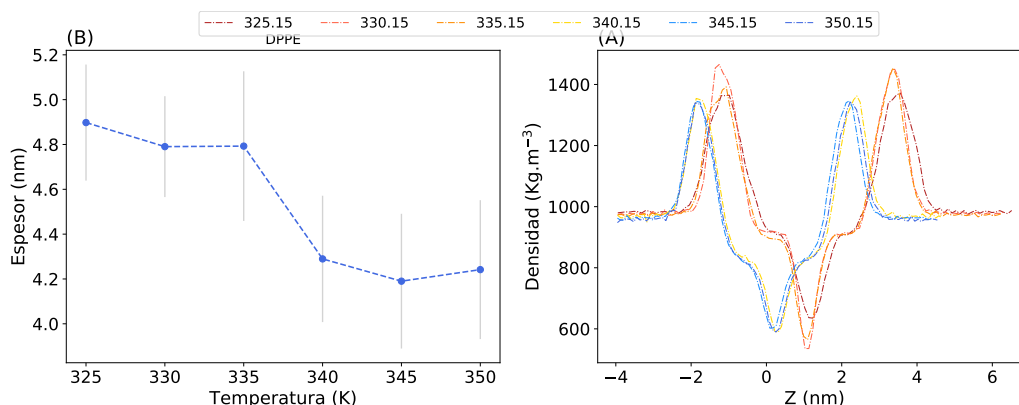


FIGURA 5.8: (A) Valor promedio del espesor de las bicapas y su respectiva desviación estándar a diferentes temperaturas. (B) Perfil de densidad.

en los núcleos hidrofóbicos de estos sistemas. De hecho, a partir de la información arrojada por el desplazamiento cuadrático medio, para los sistemas simulados a temperaturas mayores a 340 K se consigue incrementar sustancialmente este parámetro; lo cual sugiere que los lípidos se pueden autodifundir más en el medio lipídico, en consecuencia, una vez más este parámetro resalta que el sistema de DPPE se encuentra en una fase líquida desordenada sobre esta temperatura.

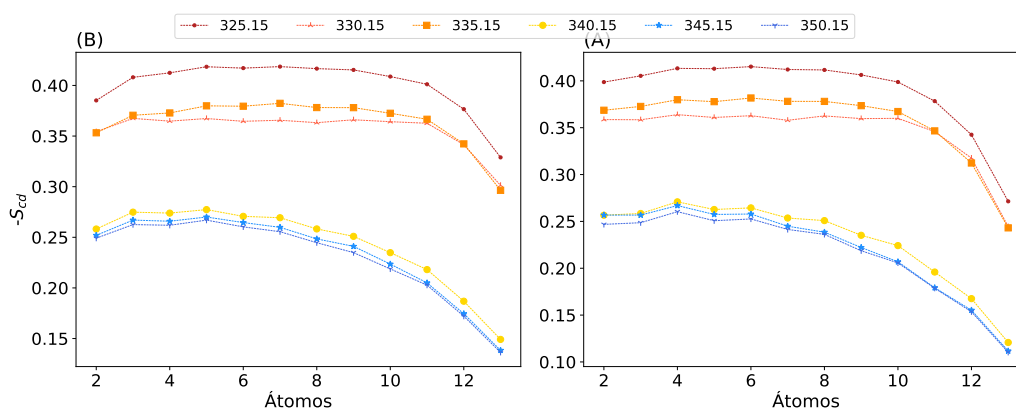


FIGURA 5.9: Variación en el parámetro de orden para el DPPE a distintas temperaturas. (A) Cadena hidrocarbonada sn-1. (B) Cadena hidrocarbonada sn-2.

5.3.2. Comportamiento termotrópico del DPPS

Los lípidos de fosfatidilserina (PS) son constituyentes de las membranas de las células eucariotas con una fracción molar de aproximadamente el 7%. De hecho, son considerados los fosfolípidos con carga negativa más importantes en condiciones fisiológicas, dado que juegan un papel importante en las células del sistema nervioso central y, tienen un rol en diversas patologías asociado a cambios estructurales por los cambios en las concentraciones de iones. A pesar de esto, poca información experimental existe disponible de este fosfolípidos en comparación a lípidos como el PC

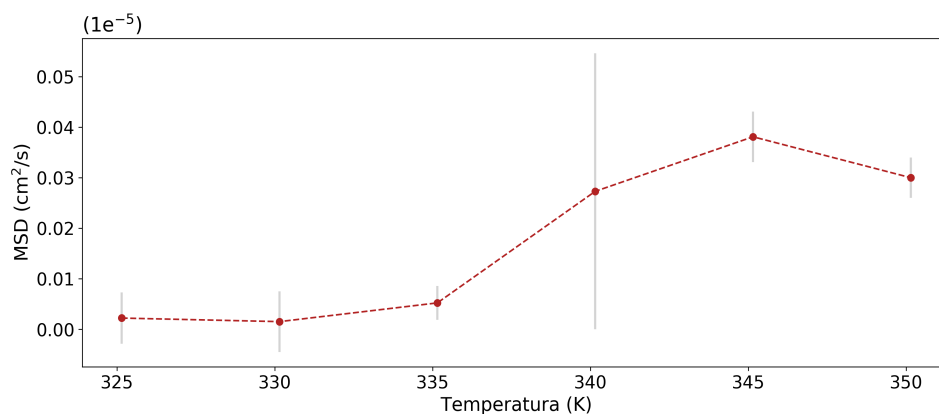


FIGURA 5.10: Variación en el desplazamiento cuadrático medio para el DPPE a distintas temperaturas.

y la PE [87, 52]. En consecuencia, decidimos estudiar en mayor detalle las características estructurales de ensamblajes compuesto de este lípido a diferentes temperaturas. Inicialmente, hicimos una inspección visual de los sistemas de DPPS a diferentes temperaturas; con esto pudimos observar la transición desde un estado ordenado o tipo gel (**Figura 5.12 A**) a un estado líquido desordenado (**Figura 5.12 E-G**) pasando por un estado ondulado tipo gel (**5.12 B-C**) en respuesta a la temperatura. De hecho, la transición de fase para el DPPS fue similar a la observada para el DPPC y el DPPE. Sin embargo, a temperaturas inferiores a las de la transición de fase ($T_m = 327$ K) no estuvo dominado por el comportamiento de fase tipo gel ondulada como en el caso del DPPC.

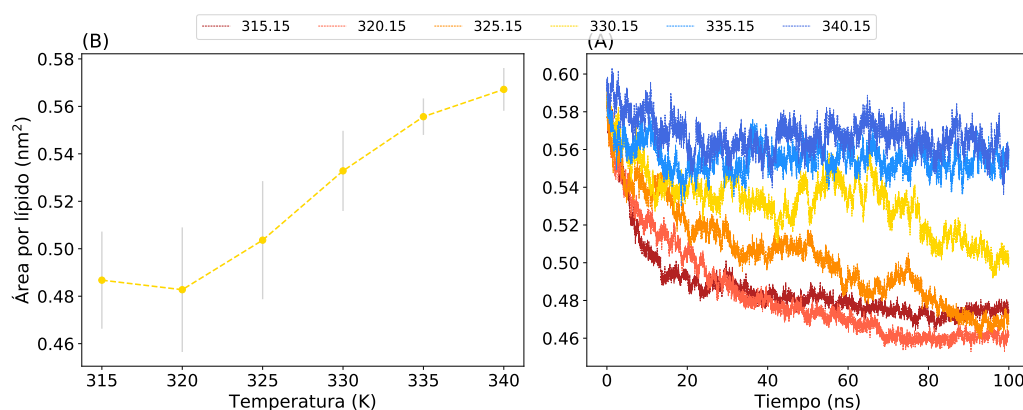


FIGURA 5.11: Comportamiento del área por lípido para DPPS. (A) Valor promedio del área por lípido y su respectiva desviación estándar a diferentes temperaturas. (B) Comportamiento del área por lípido durante toda la producción de la DM.

Además de la inspección visual, el comportamiento de fase se ve reflejada en cada una de la propiedades analizadas. En concordancia con los otros fosfolípidos analizados, el DPPS experimenta un incremento en el área por lípido. De hecho, en

concordancia con otras simulaciones y con medidas experimentales, el área por lípido para la fase líquido cristalina se ha reportado con valores que van desde 0.50 a los 0.55 nm² [23, 90, 30, 87]. Dado las características electrostáticas de los grupos polares del DPPS se ha evidenciado que reducen el parámetro de área por lípido en un 10% respecto al DPPC (ver **Figura 5.2-5.11**)[87]. Esto dado que las interacciones del solvente con las cabezas polares son mucho más intensas que las de carácter repulsivo que se dan entre los fosfolípidos.

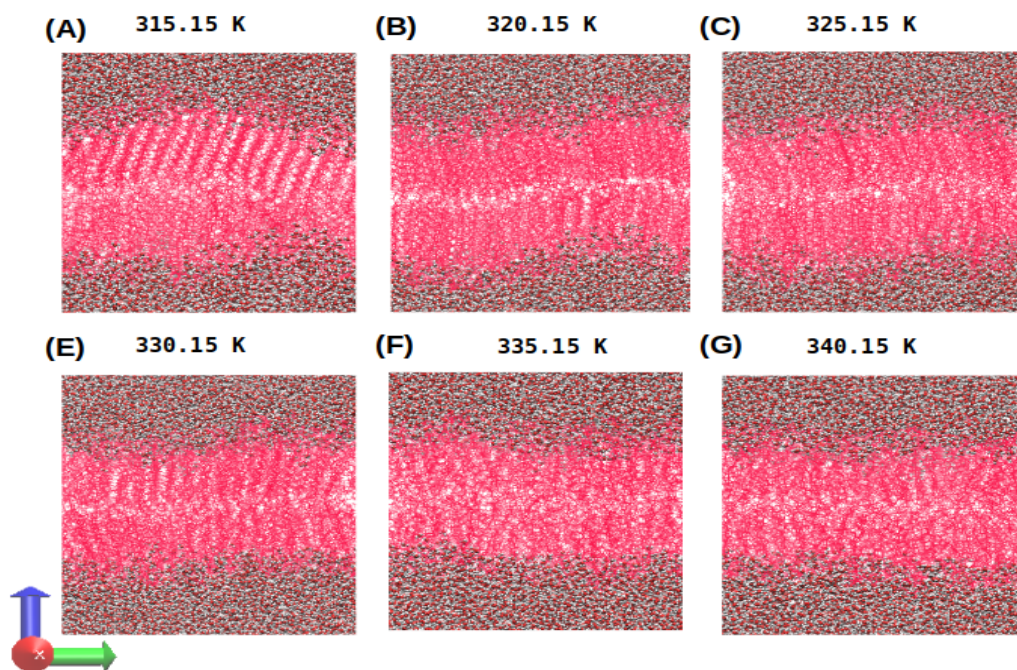


FIGURA 5.12: Visualización comportamiento de fase para sistemas de bicapas de DPPS, cada una de las imágenes son pantallazos de los últimos 30 ns de la simulación en el plano YZ. En color rosa se representan los lípidos y las moléculas de agua tienen una representación de tipo van der Waals, con el hidrógeno de color blanco y el oxígeno de color rojo.

Como se había establecido anteriormente, el espesor de la bicapa es una de las propiedades más dicientes del comportamiento de fase. De forma similar a lo encontrado para el DPPE y DPPC, se encuentra una disminución en el espesor de los ensamblajes de DPPS en respuesta a los incrementos en la temperatura **Figura 5.13**. Lo cual está en correspondencia con el incremento de los grados de libertad conformacional del núcleo hidrofóbico asociados al cambio de fase de gel a líquido desordenado. Para este sistema se ha determinado de forma experimental el valor del espesor a una temperatura de 350 K (3.3 nm) [20], nosotros encontramos un valor a 340.15 de 4.2 nm; lo cual reafirma la tendencia a disminuir de este parámetro.

En concordancia con lo esperado termodinámicamente y lo evidenciado para los demás sistemas monocomponentes, el incremento en la temperatura produce una disminución en el parámetro de orden (ver **Figura 5.15**), indicando así un mayor desorden o mayores cambios conformacionales en los núcleos hidrofóbicos de estos

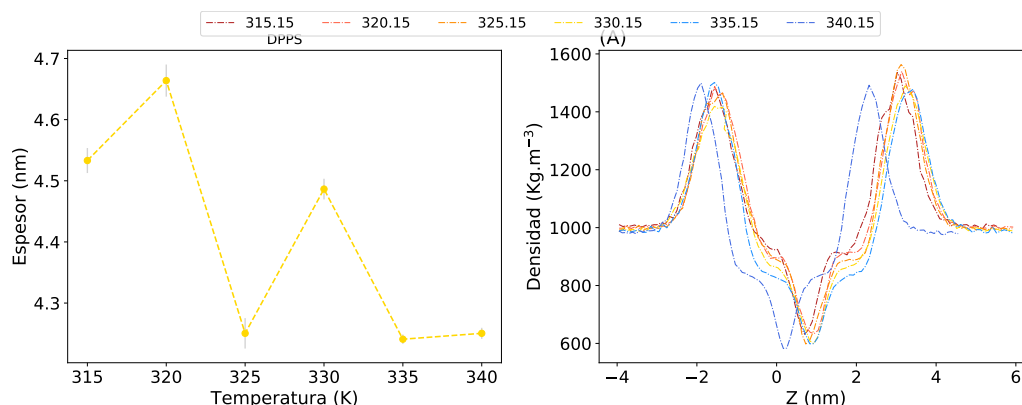


FIGURA 5.13: (A) Valor promedio del espesor de las bicapas y su respectiva desviación estándar a diferentes temperaturas. (B) Perfil de densidad para los distintos sistemas.

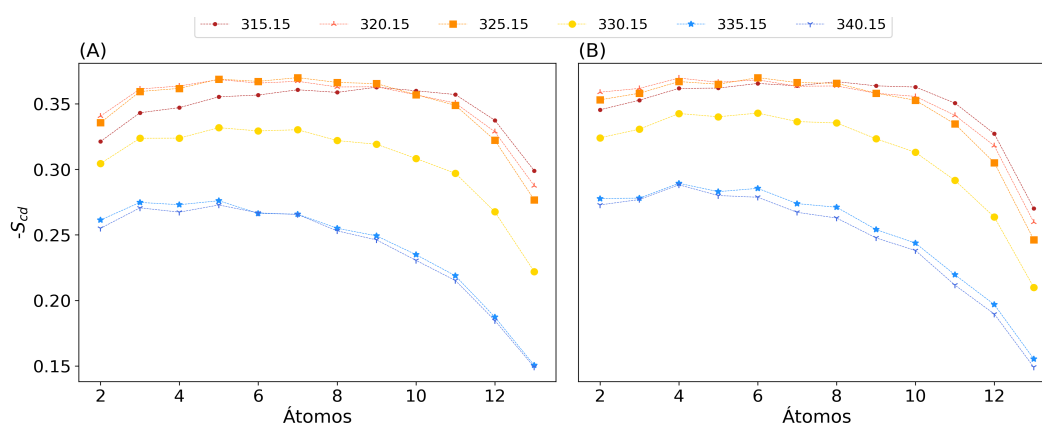


FIGURA 5.14: Variación en el parámetro de orden para el DPPE a distintas temperaturas. (A) Cadena hidrocarbonada sn-1. (B) Cadena hidrocarbonada sn-2.

sistemas. De hecho, a partir de la información arrojada por el desplazamiento cuadrático medio, para los sistemas simulados a temperaturas mayores a 330 K se consigue incrementar sustancialmente este parámetro; lo cual sugiere que los lípidos se pueden autodifundir más en el medio lipídico, en consecuencia, una vez más este parámetro resalta que el sistema de DPPS se encuentra en una fase líquida desordenada sobre esta temperatura.

5.3.3. Comportamiento termotrópico del PSM

Las esfingomielina junto con las fosfatidilcolinas son una de las principales clases de lípidos de la membrana eucariota, dado que constituyen el 50 % del contenido total de los glicerofosfolípidos. La SM y la PC se ubican principalmente en la capa externa de las membranas plasmáticas [163]. Aunque la SM y la PC se parecen entre sí en la estructura molecular, existen ciertas diferencias, como el mayor estado de saturación

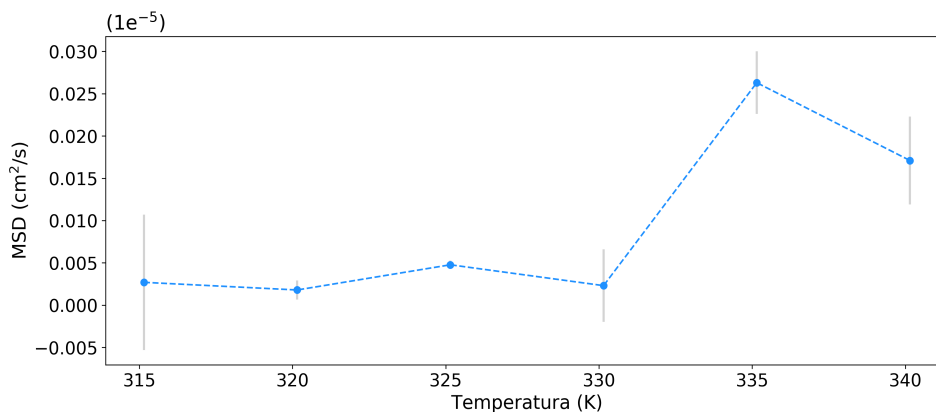


FIGURA 5.15: Variación en el desplazamiento cuadrático medio para el DPPE a distintas temperaturas.

promedio de las cadenas hidrocarbonadas de la SM y la mayor capacidad de la SM para formar enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares que conducen a desviaciones significativas en las propiedades macroscópicas de bicapas SM y PC [135]. De hecho, es importante resaltar que, junto con el colesterol, se ha observado que tanto las moléculas de SM como las PC saturadas se enriquecen en dominios dinámicos ordenados en las membranas, conocidos como "balsas lipídicas"[19, 99]. Estas estructuras de la membrana desempeñan un papel importante en una amplia gama de procesos celulares, incluido el tráfico de membranas y la clasificación de proteínas, destacando así la importancia de comprender el papel y las propiedades a escala atómica de SM en las membranas celulares.

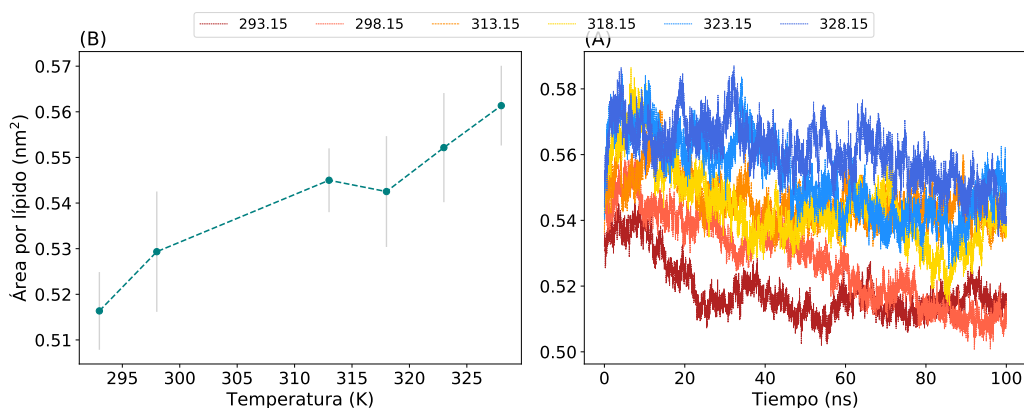


FIGURA 5.16: Comportamiento del área por lípido para PSM. (A) Valor promedio del área por lípido y su respectiva desviación estándar a diferentes temperaturas. (B) Comportamiento del área por lípido durante toda la producción de la DM.

Al igual que con los anteriores sistemas, hicimos una inspección visual de las bicapas de PSM a diferentes temperaturas; con esto pudimos observar la transición desde un estado ordenado o tipo gel (**Figura 5.17 A-B**) a un estado más líquido desordenado (**Figura 5.17 C-G**) sin pasar por un estado ondulado tipo gel, todo esto

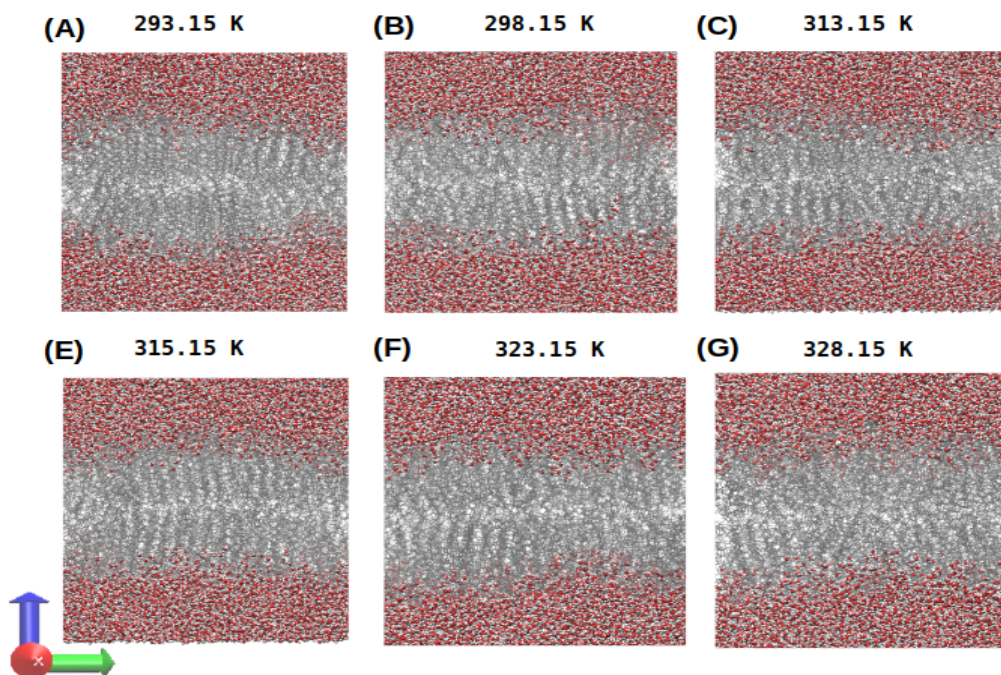


FIGURA 5.17: Visualización comportamiento de fase para sistemas de bicapas de PSM, cada una de las imágenes son pantallazos de los últimos 30 ns de la simulación en el plano YZ. En color gris se representan los lípidos y las moléculas de agua tienen una representación de tipo van der Waals, con el hidrógeno de color blanco y el oxígeno de color rojo.

en respuesta al incremento en la temperatura. De hecho, la transición de fase para el PSM es bastante diferente a lo observado para los fosfolípidos. Dado que, a temperaturas inferiores a las de la transición de fase ($T_m = 314$ K) no estuvo dominado por el comportamiento de fase tipo gel ondulada como en el caso del DPPC.

Además de la inspección visual, el comportamiento de fase se ve reflejada en cada una de las propiedades analizadas. En concordancia con los otros fosfolípidos analizados, la PSM experimenta un incremento en el área por lípido **Figura 5.16**. De hecho, en concordancia con otras simulaciones y con medidas experimentales, el área por lípido para la fase líquido cristalina se ha reportado con valores que van desde 0.47 a los 0.52 nm² [98, 85]. A pesar, de que termodinámicamente el sistema está respondiendo como es de esperarse al incremento de la temperatura; las curvas del área por lípido en el tiempo parecen indicar fases no estables alcanzadas por las trayectorias corridas para estos ensambles.

A pesar del rol fundamental de este lípido, a la fecha ha recibido poca atención experimental en parámetros como el espesor y el parámetro de orden. No obstante, al incrementar la temperatura se consigue una disminución sustancial del valor del espesor (ver **Figura 5.18**), lo cual es un indicador de la transición de fase de estos sistemas; como lo determinado para los anteriores sistemas. De hecho, el parámetro de orden, como es de esperarse y, en acuerdo a lo observado en los demás sistemas, disminuye con el incremento en la temperatura (ver **Figura 5.19**). Este resultado

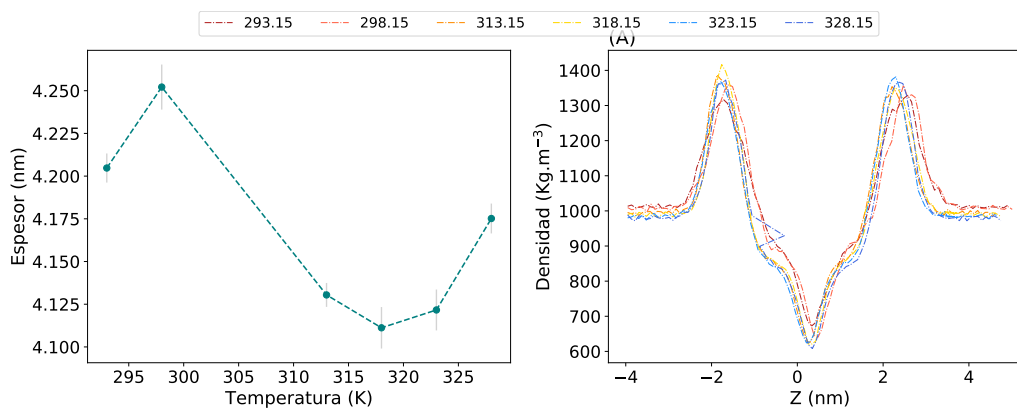


FIGURA 5.18: (A) Valor promedio del espesor de las bicapas y su respectiva desviación estándar a diferentes temperaturas. (B) Perfil de densidad para los distintos sistemas.

en términos de la termodinámica es bastante interesante, dado que los ensambles responden a la temperatura incrementando su libertad conformacional en las cadenas hidrocarbonadas.

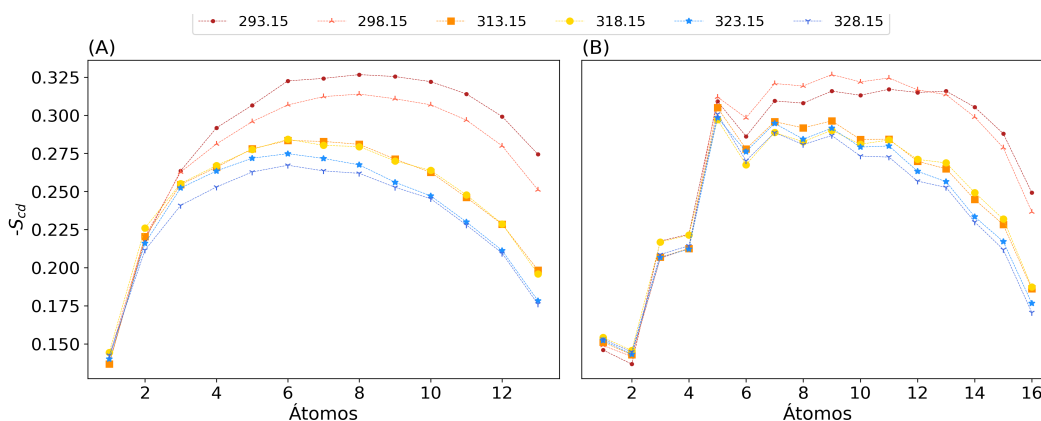


FIGURA 5.19: Variación en el parámetro de orden para el PSM a distintas temperaturas. (A) Cadena hidrocarbonada sn-1. (B) Cadena hidrocarbonada sn-2.

5.4. Conclusiones

El mecanismo asociado a las transiciones fases que experimentan los lípidos implica cambios en la estructura de la bicapa que se pueden cuantificar con el área por lípido, el espesor de la bicapa, el grado de orden de las cadenas hidrocarbonadas, la autodifusión de los lípidos en la bicapa y, las propiedades elásticas de estos sistemas. En este capítulo inspeccionamos las propiedades asociadas a las diferentes fases de los lípidos más representativos en las membranas de mamíferos. Inicialmente, con la inspección visual de los sistemas de bicapas simulados a diferentes temperaturas, logramos reproducir visualmente el comportamiento de fase para cada uno de los

sistemas simulados. Las de bicapas de fosfolípidos como el DPPC, DPPE y DPPS experimentaron un transición desde la fase gel, pasando por una fase tipo gel ondulada hasta alcanzar la fase líquido desordenada. Tanto para el DPPC como para el DPPS se había reportado esta transición ondulada previa a la transición de fase al L_{α} . Sin embargo, este comportamiento no se ha observado experimentalmente para DPPE, lo cual establece un reto bastante valioso en la parte experimental y, sugiere una mayor resolución de las técnicas experimentales para analizar el comportamiento de fase de estos sistemas. Para los sistemas de PSM no se observó este comportamiento ondulado previo a la transición de fase.

Como se había establecido en las secciones anteriores, el área por lípido es una medida que da cuenta de los grados de libertad que experimentan las cadenas hidrocarbonadas de cada uno de los lípidos. En términos generales, todos los sistemas de bicapas experimentaron un incremento sustancial en esta media al incrementar la temperatura del sistema. De hecho, se obtuvo un comportamiento inverso en el espesor de la bicapa, lo cual es de esperarse para estos sistemas con la variación en la temperatura, dado que las cadenas hidrocarbonadas presentan un arreglo conformacional en función de la temperatura, lo cual permite que estas cadenas se distribuyan con mayor facilidad en el plano XY, consiguiendo así una reducción del plano Z de la bicapa. El parámetro de orden también concuerda con las propiedades ya mencionadas, dado que para cada uno de los sistemas se obtiene una variación drástica de este parámetro con el incremento de la temperatura, esto dado que al incrementar la energía del sistema, las cadenas hidrocarbonadas tienen un mayor grado de libertad, es decir, un menor parámetro de orden.

En este capítulo, no solo logramos estimar el comportamiento de fase de bicapas monocomponentes a partir de una serie de propiedades, sino también logramos validar la robustez del campo de fuerza para estimar las propiedades de estos ensamblajes a temperaturas diferentes a las empleadas en la validación del modelo CHARMM-36 [72, 128]. Este resultado es bastante interesante, dado que en primer lugar, confirma la veracidad del modelo y; en segundo lugar, nos permitirá crear un ensamblaje más complejo usando cada uno de los lípidos modelados en este capítulo.

Capítulo 6

Comportamiento de fase y elástico de bicapas lipídicas heterogéneas

6.1. Introducción

Las bicapas lipídicas son estructuras fundamentales en los organismos vivos. Estas estructuras forman una barrera continua alrededor de las células, la cual actúa como estructura capaz de modular la permeabilidad de diferentes moléculas y, esta estructura desempeña un papel clave en la dinámica, organización y la función de las proteínas presentes en el medio lipídico [146]. De hecho, la composición altamente diversificada de las bicapas lipídicas a través de las células es crucial para muchos procesos biológicos. Una comprensión detallada de las propiedades de las bicapas lipídicas es fundamental para la biología y puede ayudar al avance de áreas de investigación relacionadas, como la biofísica y el diseño de fármacos [70]. Las simulaciones son especialmente útiles para estudiar aquellas propiedades que fluctúan sustancialmente en función de la profundidad dentro de la bicapa, ya que la investigación experimental es muy ardua, principalmente debido al pequeño espesor, la alta fluidez y la heterogeneidad de las bicapas típicas [153].

Los estudios de DM de mezclas de lípidos empleando un modelo de todos los átomos son inusuales [95, 36]. Sin embargo, diferentes estudios se han llevado a cabo empleando mezclas binarias de colesterol y como máximo dos fosfolípidos [9, 145, 177]. El colesterol es un componente esencial de las membranas plasmáticas eucariotas y tienen un papel especial en las propiedades físicas de la membrana. Los efectos físicos del colesterol dependen de la fase de la membrana [36]. De hecho, se desconoce el modo de acción preciso de la interacción entre el colesterol y otros lípidos. Por ejemplo, la determinación de la estructura experimental de las mezclas de colesterol y PC es complicada, lo que hace que el colesterol sea un caso interesante para las simulaciones [153]. En este capítulo determinamos las propiedades estructurales de la bicapa asociadas a la variación en la composición de colesterol a diferentes temperaturas. Para ello, consideramos la composición lipídica de membranas de eritrocitos [155].

6.2. Metodología

6.2.1. Sistemas de bicapas lipídicas

Con el ánimo de comprender el efecto de la concentración de colesterol y la temperatura sobre el comportamiento de fase de sistemas heterogéneos se construyeron modelos de bicapas con una composición variada de DPPC, DPPE, DPPS, DMPI, PSM y CHOL (**Cuadro 6.1**), con un tamaño de 300 moléculas de lípidos y 12000 moléculas de agua. Para las moléculas de agua se utilizó el modelo CHARMMM TIP3P [15]. Para las moléculas de lípidos se empleó el modelo CHARMM-36 [72]. Todos los sistemas fueron construidos usando la opción Membrane Builder de la plataforma CHARMM-GUI <http://www.charmm-gui.org/> [91, 72].

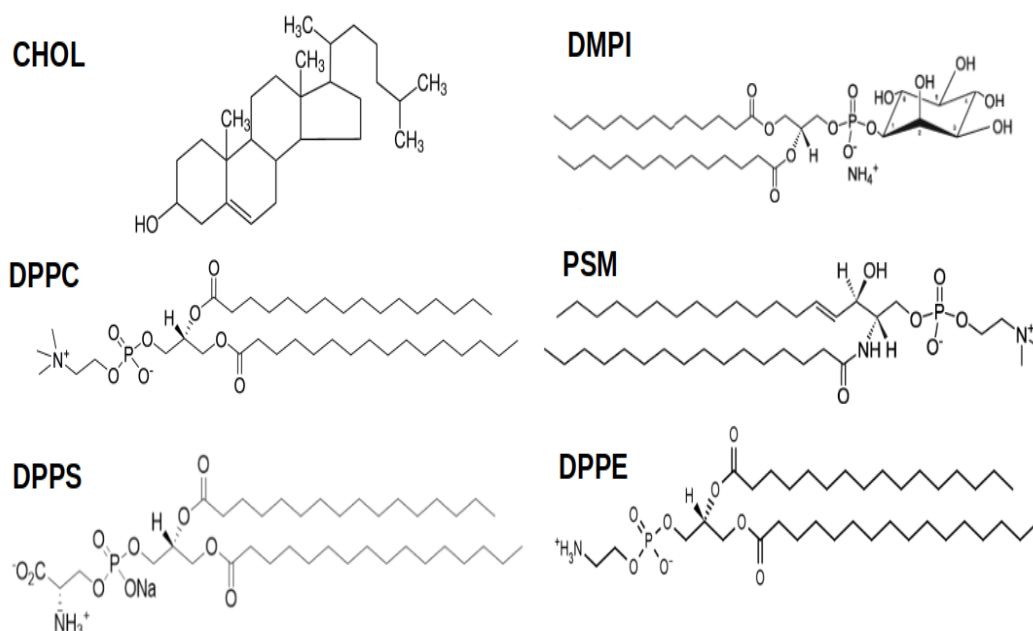


FIGURA 6.1: Estructuras químicas de los lípidos usados para los sistemas heterogéneos.

6.2.2. Detalles computacionales

Todas las simulaciones de DM se llevaron a cabo empleando el software computacional GROMACS 5.0 [55, 162], para ello se emplearon los scripts generados por la plataforma CHARMM-GUI. Para cada uno de los sistemas construidos se hicieron las simulaciones a 310.15, 330.15 y 350.15 K. Los sistemas fueron minimizados en energía utilizando 5000 pasos del algoritmo de máxima pendiente (del inglés steepest descent algorithm), seguido de seis pasos de equilibración. En los dos primeros pasos de la equilibración se consideró un colectivo canónico (NVT) y, para los pasos restantes se consideró un colectivo isotérmico-isobárico (NPT). Para la equilibración, considerando ambos colectivos, se empleó el termostato Berendsen. Finalmente, en la producción se consideró un ensamble NPT, para el acoplamiento de ésta se empleó

CUADRO 6.1: Composición de los sistemas de bicapas de composición heterogénea construidos. La composición porcentual de las moléculas se muestra en paréntesis.

Molécula	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	Sistema 4	Sistema 5
DPPC	120 (40)	108 (36)	96 (32)	84 (28)	72 (24)
DPPE	68 (23)	60 (20)	54 (18)	48 (16)	42 (14)
DMPI	12 (4)	12 (4)	10 (3)	8 (3)	6 (2)
DPPS	30 (10)	28 (10)	24 (8)	20 (6)	16 (5)
PSM	70 (23)	62 (20)	56 (19)	50 (17)	44 (15)
CHOL	0	30 (10)	60 (20)	90 (30)	120 (40)

el termostato Nose-Hoover [39] y, para el acoplamiento de la presión se empleó el barostato Parrinello-Rahman [119] con un escalamiento semi-isotrópico a una presión de 1 bar. Las simulaciones se llevaron a cabo bajo condiciones de frontera periódicas (PBC), y se usó la malla de partículas Ewald (PME) para los cálculos de las interacciones electrostáticas [29]. Además, se empleó el algoritmo de cambio de fuerza para las interacciones de tipo Lennard-Jones con un radio de corte de 1.0–1.2 nm. Tanto para la equilibración como para producción se usó el método de integración salto de rana (del inglés leap-frog) para resolver la ecuación del movimiento de Newton. Adicionalmente, se usó el algoritmo LINCS para restringir las longitudes de los enlaces de hidrógeno [56]. Para la producción se empleó un tiempo de paso de 2 fs y se guardaron las coordenadas, velocidades y fuerzas cada 50000 pasos, para un tiempo total de 300 ns.

6.2.3. Análisis de datos

Para los sistemas simulados se hizo una comparación entre las propiedades estructurales: área por lípido, espesor de la bicapa y las propiedades elásticas. Para los análisis, se estableció el plano de las bicapas lipídicas a lo largo de los ejes XY, con el eje Z atravesando la bicapa de forma perpendicular, como lo indica la convención. Los perfiles de densidad se calcularon utilizando la herramienta *gmx density* en GROMACS, con la caja de simulación dividida en 500 bloques. El espesor y el área por lípido de la bicapa se calcularon con la herramienta *APL@VORO*; la cual emplea un método de triangulación para determinar estas propiedades. Para ello se usan las coordenadas de lípidos para generar un polígono a partir del cual se calcula el área superficial del lípido. Los átomos claves para este análisis fueron el P y O3 para generar los vértices de Voronoi. Para el análisis de los módulos de compresibilidad se implementó el modelo de las variaciones en el área superficial de la celda de simulación. Para visualizar e inspeccionar el sistema se empleó la herramienta VMD [58].

Todos los gráficos fueron contruídos empleando las herramientas GNUplot [174], XMGRACE [174] y Python 3.6 [164].

6.3. Resultados y discusión

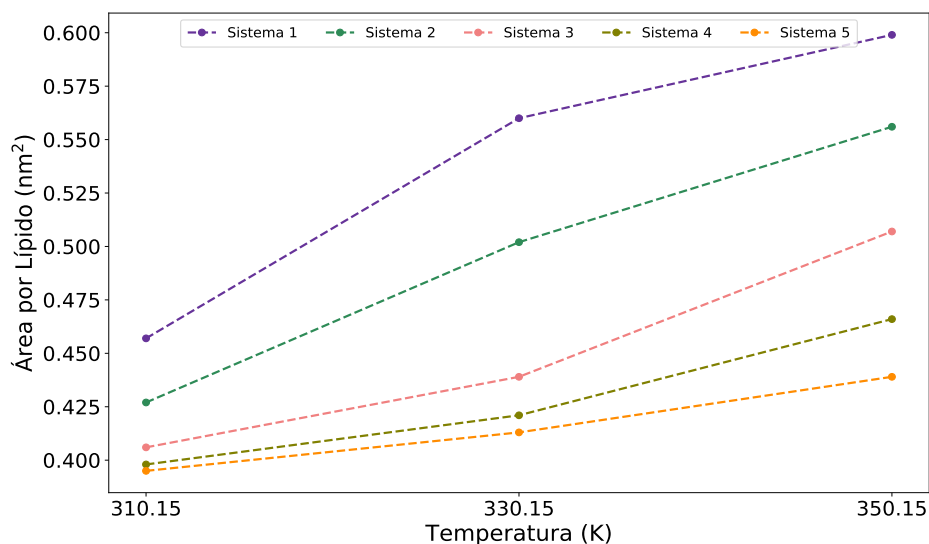


FIGURA 6.2: Valor promedio del área por lípido para los distintos sistemas simulados.

Recientemente se han desarrollado una gran cantidad de campos de fuerza que incluyen interacciones entre todos los átomos, sin duda alguna estos han demostrado ser precisos en la descripción de las interacciones de moléculas de fosfolípidos (como lo hemos demostrado en los capítulos anteriores), esfingolípidos y colesterol [72, 9, 145]. En el presente capítulo analizamos el efecto en la variación del colesterol y la temperatura asociado a distintas propiedades de los sistemas de bicapa. Inicialmente, examinamos la estabilidad de los sistemas después de la DM explorando visualmente la variación en el área promedio del plano XY de la caja de simulación. A partir del análisis de convergencia de este parámetro, decidimos seleccionar los 150 ns finales de las trayectorias de cada uno de los sistemas modelados para analizar las propiedades estructurales y mecánicas.

El comportamiento del colesterol es bastante interesante, dado que induce una fase ordenada rompiendo la estructura tipo gel [153]. Este modo de acción se puede observar a partir de inspecciones visuales que se hicieron sobre de los últimos 30 ns de cada una de las simulaciones. Para el sistema con 0% de contenido de colesterol se puede apreciar una transición de fase del gel ordenado al líquido-desordenado (**Figura 6.6**). De hecho, cuando se incrementa el contenido de colesterol en un 10% se puede apreciar con bastante claridad como el colesterol induce un efecto marcado

en el ordenamiento de las cadenas carbonadas a 310.15 K (ver **Figura 6.7**). Adicionalmente, al incrementar más del 10% del colesterol a cualquier temperatura, esta molécula induce un efecto bastante marcado en el ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas, induciendo así una fase L_c o pseudo-cristal (ver **Figura 6.8-6.10**). De hecho, la respuesta que experimentan cada uno de estos sistemas es dependiente de la concentración del colesterol. Por lo tanto, para apreciar este comportamiento se analizará las propiedades estructurales y elásticas de estos ensamblajes.

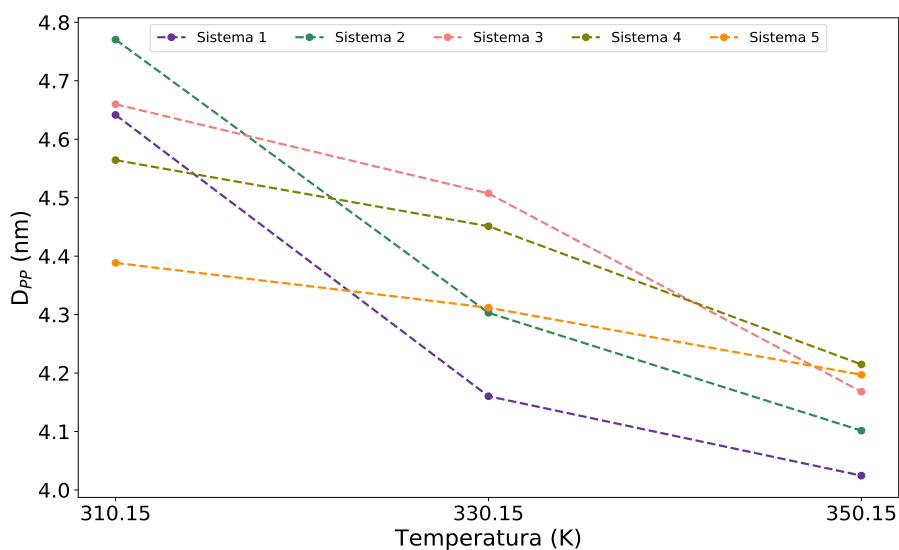


FIGURA 6.3: Valor promedio del espesor para los distintos sistemas simulados.

Como se había establecido anteriormente, el área por lípido es una variable sumamente importante para determinar el ordenamiento de los lípidos que componen la bicapas. Además, permite validar la calidad de la simulación. No obstante, los capítulos anteriores se centraron en la compresión de sistemas monocomponentes, los cuales al ser homogéneos en las estructuras lipídicas, el parámetro del área por lípido se puede medir acertadamente midiendo la variación en la caja de simulación en el plano XY dividido por la mitad de moléculas de lípidos del sistema. Sin embargo, para sistemas heterogéneos este modelo no es pertinente, dada las variaciones en las estructuras químicas de los lípidos presentes (ver **Figura 6.1**). Por tanto, decidimos implementar una metodología novedosa para adquirir este parámetro. APL@VORO, permite calcular el área promedio de cada lípido a partir de la trayectoria y unos átomos clave de las moléculas de lípidos.

El área por lípido promedio para cada uno de los sistemas simulados se expone en la **Figura 6.2**. Esencialmente, independiente del contenido de colesterol, cada uno de los sistemas experimentó un incremento en el área por lípido en función de la temperatura, lo cual concuerda con las simulaciones mostradas en los capítulos anteriores. No obstante, los sistemas con 0 y 10% de CHOL presentan un cambio sustancial en este parámetro en respuesta a la temperatura, es decir, visualmente y en acuerdo

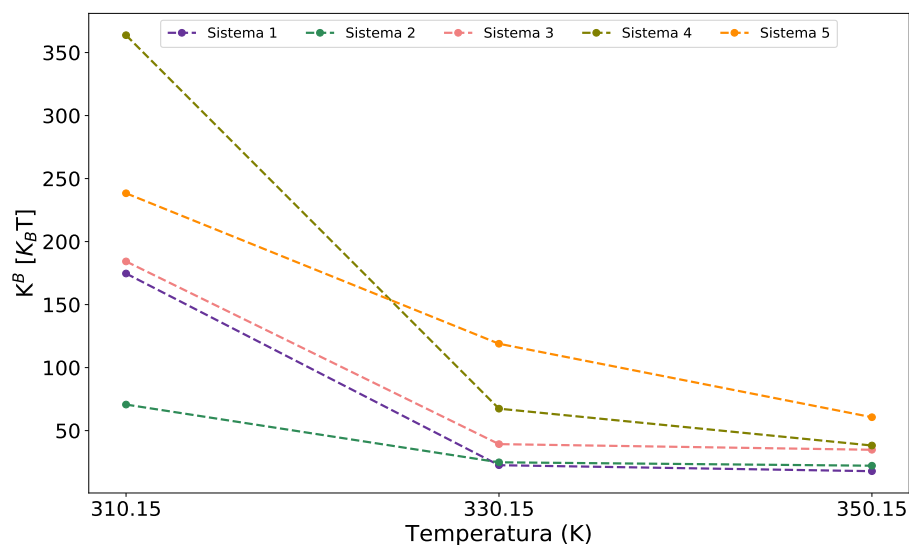


FIGURA 6.4: Módulo de rigidez para los distintos sistemas simulados.

con este parámetro se observa un mayor desorden en las cadenas hidrocarbonadas. No obstante, con concentraciones superiores al 20% del de CHOL no se obtiene un cambio tan marcado en este parámetro. Esto dado que para el sistema con 0% de CHOL con el incremento de la temperatura se obtiene un incremento del 30% en el área por lípido; mientras que para el sistema 5 se obtiene un incremento de solo el 11%.

Al explorar la variación del espesor para cada uno de los sistemas simulados **Figura 6.3** se puede observar un comportamiento bastante particular. Este parámetro disminuye para cada uno de los sistemas al incrementar la temperatura, lo cual es consistente con el comportamiento termotrópico de los sistemas de lípidos. No obstante, cuando se tiene un aumento del colesterol sobre el 20% el espesor no cambia de forma sustancial. Esto concuerda con lo analizado anteriormente para el área por lípido y la inspección visual. De hecho, para el sistema control o 0% de CHOL se encontró una reducción del 14% de este parámetro; mientras que para el sistema con 40% de CHOL se redujo tan solo el 4% con las variaciones en la temperatura.

Por lo general, las propiedades mecánicas más relevantes para el entendimiento de las bicapas lipídicas son el módulo de compresibilidad (K_A) y el módulo de rigidez (K^B). La estrategia computacional que se emplea para calcular el módulo de compresibilidad se trató en los capítulos anteriores. Ésta consiste en determinar las variaciones en las fluctuaciones de la caja de simulación respecto al valor promedio. Sin embargo, debido a que este análisis está directamente relacionado con las fluctuaciones de la caja de simulación, el módulo exhibe una fuerte dependencia del comportamiento de la fase termodinámica de la bicapa (está directamente relacionada con la tasa de relajación del área XY, el tamaño del sistema y la longitud

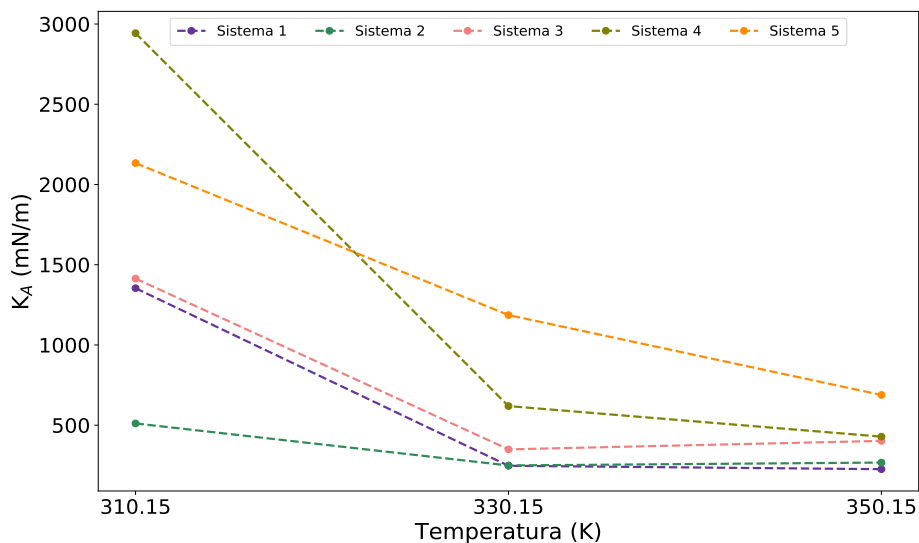


FIGURA 6.5: Módulo de compresibilidad para los distintos sistemas simulados.

correspondiente de la trayectoria de simulación). Actualmente, nos encontramos ensayando un modelo novedoso propuesto por Doktorova et al. [32], el cual permite hacer las predicciones de este módulo a partir de la variación en el espesor de la bicapa. Este nuevo modelo tiene grandes ventajas respecto al modelo de fluctuación en el área. Sin embargo, tiene un mayor costo computacional.

Como se estableció en los capítulos anteriores el cálculo de este módulo a partir de este modelo concuerda con los valores experimentales. Por tanto, como primera aproximación a las propiedades elásticas de estos sistemas, calculamos el módulo de compresibilidad de estos sistemas heterogéneos usando modelo de fluctuaciones en el área de la caja de simulación. Los valores para el módulo de compresibilidad para los distintos sistemas se reúnen en la **Figura 6.5**. En acuerdo, con lo encontrado forma experimental y en simulaciones donde se incluye DPPC y CHOL, se observa que al incrementar la concentración de este último lípido induce un incremento en el módulo de compresibilidad [1, 169]. No obstante, este comportamiento es fuertemente dependiente del contenido de colesterol [1, 169, 32], es decir, cuando se incrementa la fracción molar del CHOL más del 0.2 obtiene un incremento de 3 veces la magnitud de este módulo. De hecho, es bastante claro que a concentraciones iguales y menores al 30% el CHOL no está induciendo un rompimiento de la transición de fase como el sistema con un 40% de CHOL, dado que al variar la temperatura de este sistema no se obtiene un cambio sustancial de esta medida en comparación a los demás sistemas. Este comportamiento, indica que al tener una concentración por encima del 30% el colesterol tiene un efecto de condensación sobre la bicapa e induce una fase ordenada tipo cristal-líquido. De hecho, los estudios realizados con mezclas binarias de colesterol y algún fosfolípido [1, 169, 32] sugieren como nosotros que al incrementar la fracción molar más de 0.2 se obtiene un incremento sustancial en los valores de este módulo. Una tendencia similar es encontrada para el módulo de

rigidez, soportando así el rompimiento de fase del colesterol a una concentración de 40 %.

6.3.1. Conclusiones

La capacidad del colesterol para ordenar sistemas de bicapas de fosfolípidos se conocen desde hace más de 80 años. No obstante este estudio preliminar es bien interesante, dado que permite observar como sistemas con una composición heterogénea en variación al contenido de colesterol incrementa el ordenamiento de los diferentes sistemas. Este nivel de ordenamiento se puede apreciar en las **Figuras 6.6-5**. De hecho, el colesterol induce un ordenamiento en las cadenas hidrocarbonadas. Este comportamiento se puede apreciar, dado que al considerar una temperatura y, al incrementar la concentración de colesterol se obtiene una disminución en el área por lípido y, por el contrario un incremento en el espesor de los sistemas simulados. Todo es un indicativo del ordenamiento que induce el colesterol en estos sistemas.

Sin embargo, la acción del colesterol en estos ensamblajes es dependiente de la concentración de este lípido. Con este estudio, pudimos observar que los parámetros estructurales como el área por lípido y espesor tienen un efecto marcado y una misma tendencia para sistema con 0 y 10 % de CHOL. Para los sistemas restantes, si bien se observa un incremento en el área por lípido dependiente de la temperatura y, una reducción en el espesor de la bicapa en respuesta al incremento en la temperatura, no es tan marcado es tan marcada la diferencia. En vista de esto, sugerimos que a una concentración por encima del 20 % de CHOL, este lípido condensa el ensamblaje y se hace menos dependientes los cambios de fase de una variable tan importante como la temperatura. De hecho, tendencias similares logramos observar al calcular los módulos de elasticidad de estos sistemas. Sin embargo, uno de los resultados más importantes es que al tener 40 % de CHOL el módulo de compresibilidad y rigidez no cambia de forma considerable con la temperatura, lo cual sugiere que a estas concentraciones el CHOL rompe con la fase tipo gel e induce la formación de una fase tipo cristal-líquido. No obstante, cabe señalar que este comportamiento de fase en respuesta al CHOL y la temperatura se debe confirmar a partir de otras propiedades, como el desplazamiento cuadrático medio y, los parámetros de orden de los lípidos constituyentes de estos ensamblajes.

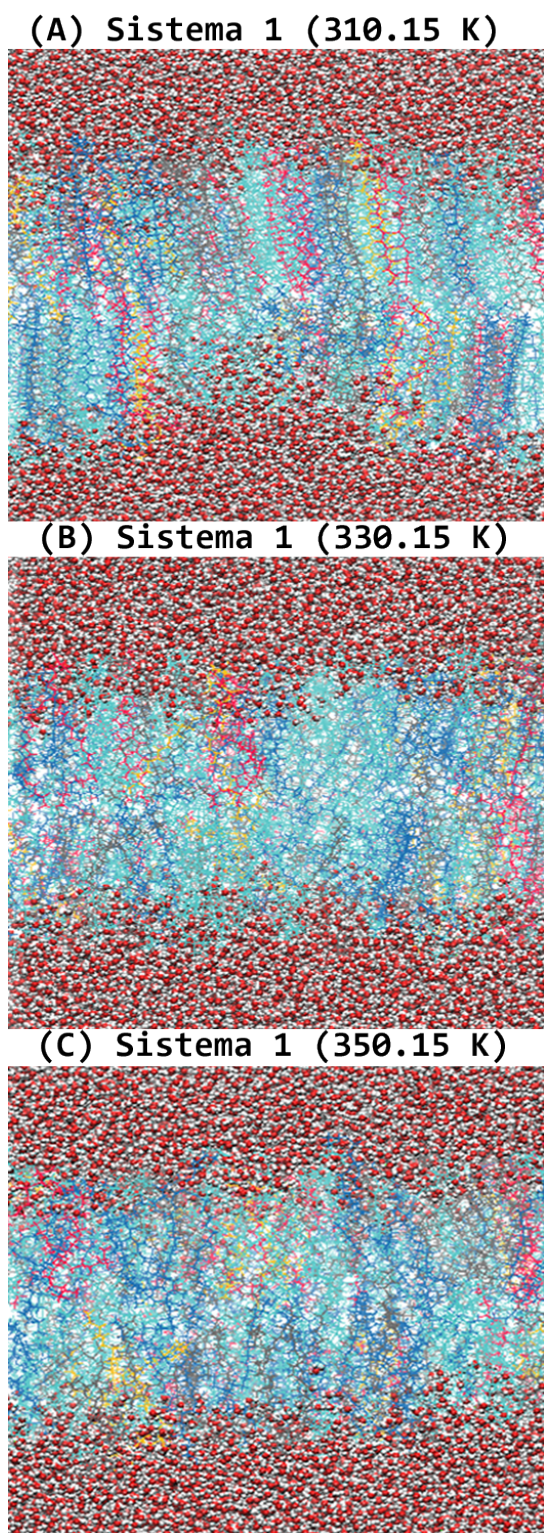


FIGURA 6.6: Visualización del sistema con 0% de colesterol a 310, 330 y 350 K, cada una de las imágenes son pantallazos de los últimos 30 ns de la simulación. El DPPC se representa en color cian, el DPPS en púrpura, el DPPE en azul, el DMPI en naranja y la PSM en gris.

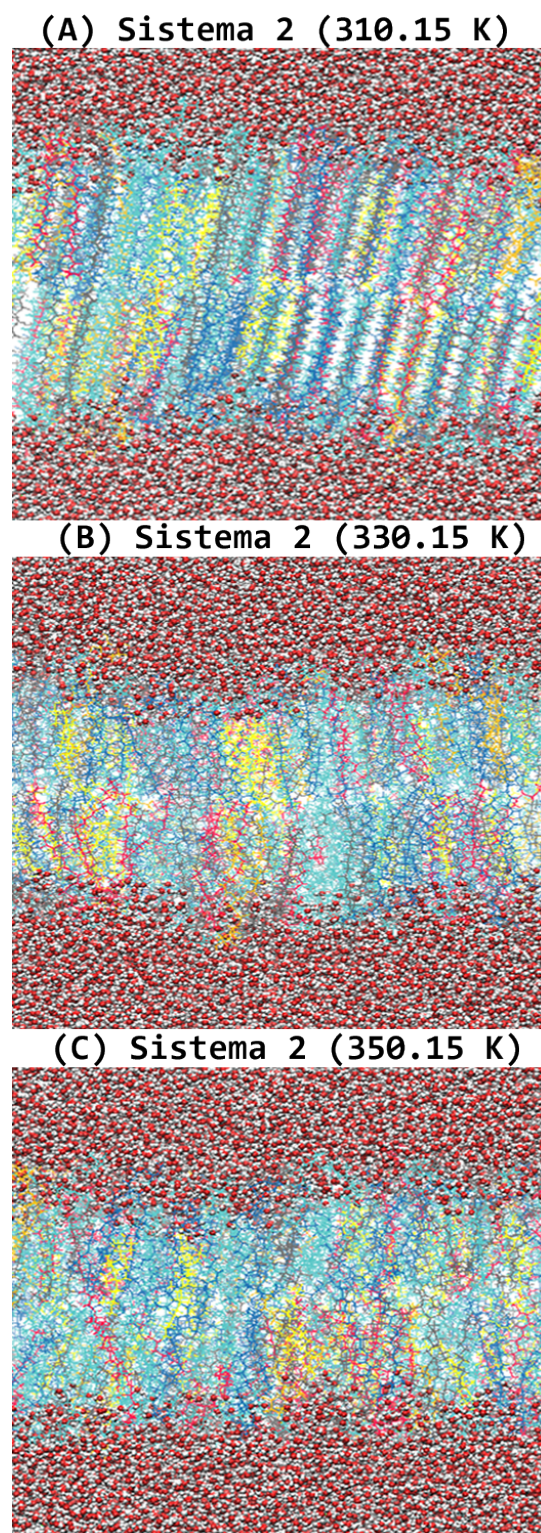


FIGURA 6.7: Visualización del sistema con 10% de colesterol a 310.15, 330.15 y 350.15 K, cada una de las imágenes son pantallazos de los últimos 30 ns de la simulación. El DPPC se representa en color cian, el DPPS en púrpura, el DPPE en azul, el DMPI en naranja, la PSM en gris y, el colesterol en amarillo.

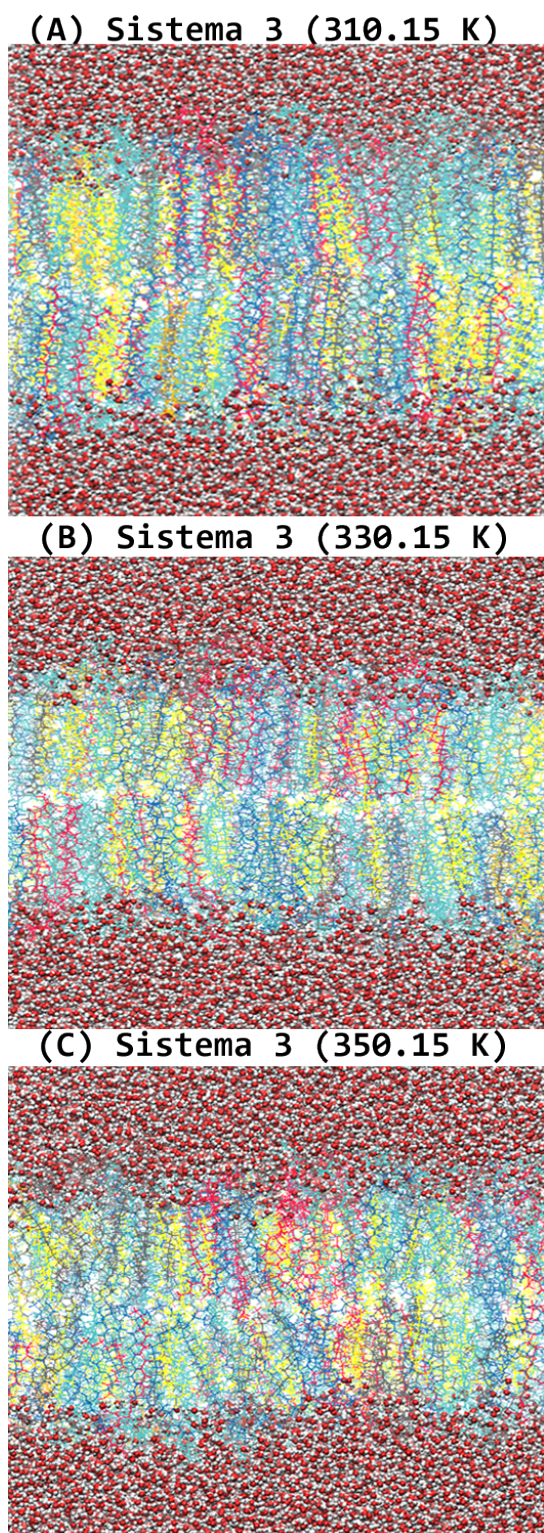


FIGURA 6.8: Visualización del sistema con 20% de colesterol a 310.15, 330.15 y 350.15 K, cada una de las imágenes son pantallazos de los últimos 30 ns de la simulación. Ver **Figura. 2** para la correspondencia de los colores para cada molécula considerada.

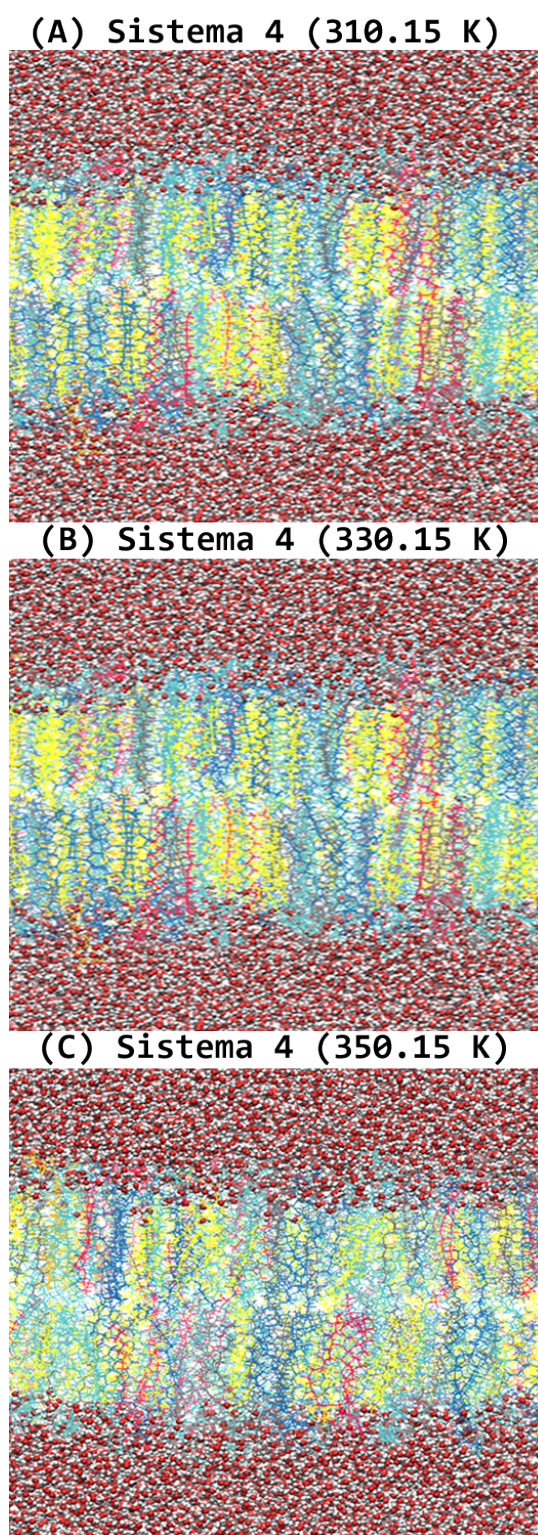


FIGURA 6.9: Visualización del sistema con 30% de colesterol a 310.15, 330.15 y 350.15 K, cada una de las imágenes son pantallazos de los últimos 30 ns de la simulación. Ver **Figura. 2** para la correspondencia de los colores para cada molécula considerada.

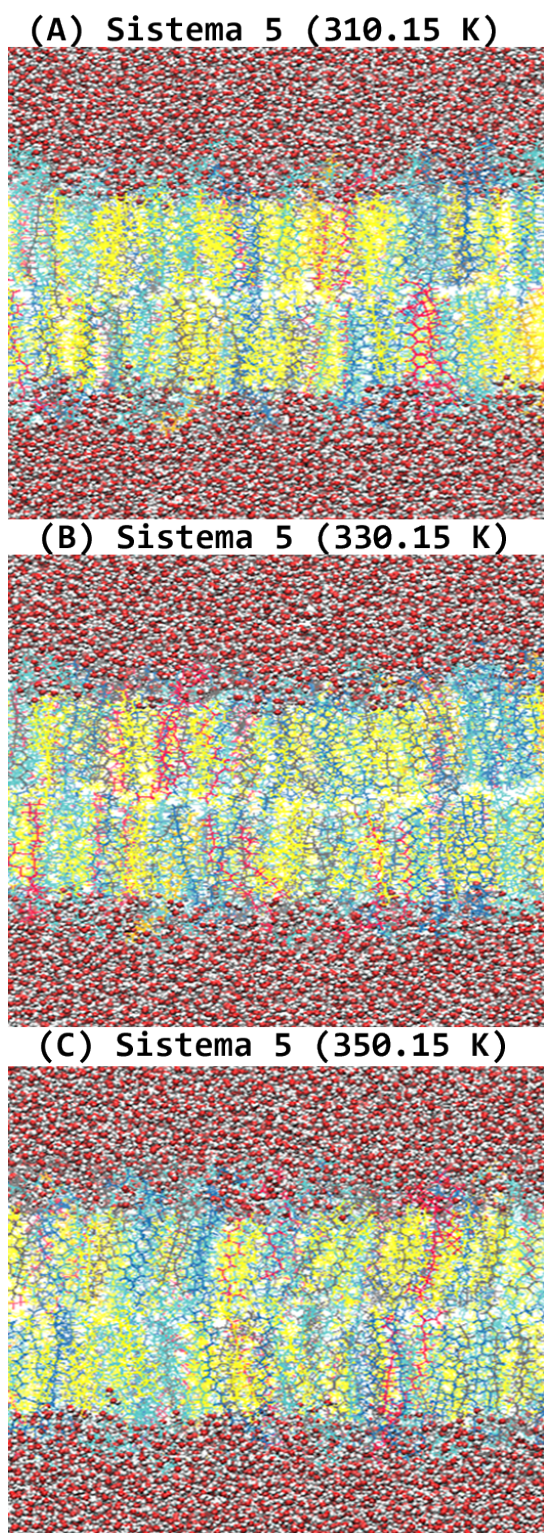


FIGURA 6.10: Visualización del sistema con 40% de colesterol a 310.15, 330.15 y 350.15 K, cada una de las imágenes son pantallazos de los últimos 30 ns de la simulación. Ver **Figura. 2** para la correspondencia de los colores para cada molécula considerada.

Capítulo 7

Conclusiones y Trabajo Futuro

Las membranas biológicas son sistemas complejos de comprender en términos de la composición molecular y estructural. Estos sistemas tienen distintas funciones en una amplia gama de escalas temporales y son caracterizadas por una condición de no equilibrio. Debido a todas estas características, las simulaciones por DM son una buena técnica para estudiar el comportamiento de estos sistemas biológicos. No obstante, son pocos los estudios enfocados en la comprensión de estos sistemas con un modelo de resolución atomista. De hecho, el primer campo de fuerza en considerar todas las interacciones atómicas fue desarrollado en el 2010 y, se ajusta en gran medida a los valores experimentales [72].

El presente estudio busca explorar el entendimiento de bicapas lipídicas que den cuenta de la composición heterogénea de estos sistemas biológicos, empleando para ello un modelo físico que incluya todas las interacciones atómicas. Por tanto, inicialmente logramos determinar que la cantidad de moléculas de agua y lípidos necesarias para representar de forma acertada las propiedades físicas y elásticas de estos ensamblajes biológicos es 12000 y 300, respectivamente; a partir de un modelo DPPC, el cual se seleccionó estratégicamente por la amplia cantidad de información experimental que se tiene. Así mismo, al comparar dos campos de fuerzas atomistas logramos destacar las ventajas de emplear el campo de fuerza CHARMM-36 respecto a Slipids para sistemas de bicapas hidratadas. Adicionalmente, logramos explorar el comportamiento de fase y las distintas propiedades asociadas a estas estructuras biológicas; encontrando como el incremento en la temperatura genera un mayor desorden en las cadenas hidrocarbonadas de cada uno de los sistemas estudiados. Finalmente, logramos ensamblar y determinar las propiedades físico-químicas para sistemas de composición heterogéneas. Con estas simulaciones se pudo observar el efecto marcado del colesterol en el comportamiento de fase y la inducción de orden a los sistemas de bicapas altamente dependiente de la concentración de CHOL.

Las investigaciones futuras podrían encaminarse en, por lo menos, tres vías: (1) Explorar modelos más sofisticados para medir las propiedades estructurales y elásticas de estos sistemas de bicapas ya simulados. (2) Explorar sistemas con una variación más heterogénea, en donde se incluyan insaturaciones en las cadenas carbonadas y con dinámicas más prolongadas. (3) Finalmente, comprender como varían las propiedades elásticas de estos ensamblajes heterogéneos sometidos a diferentes esfuerzos tangenciales.

Apéndice A

Capítulo 3

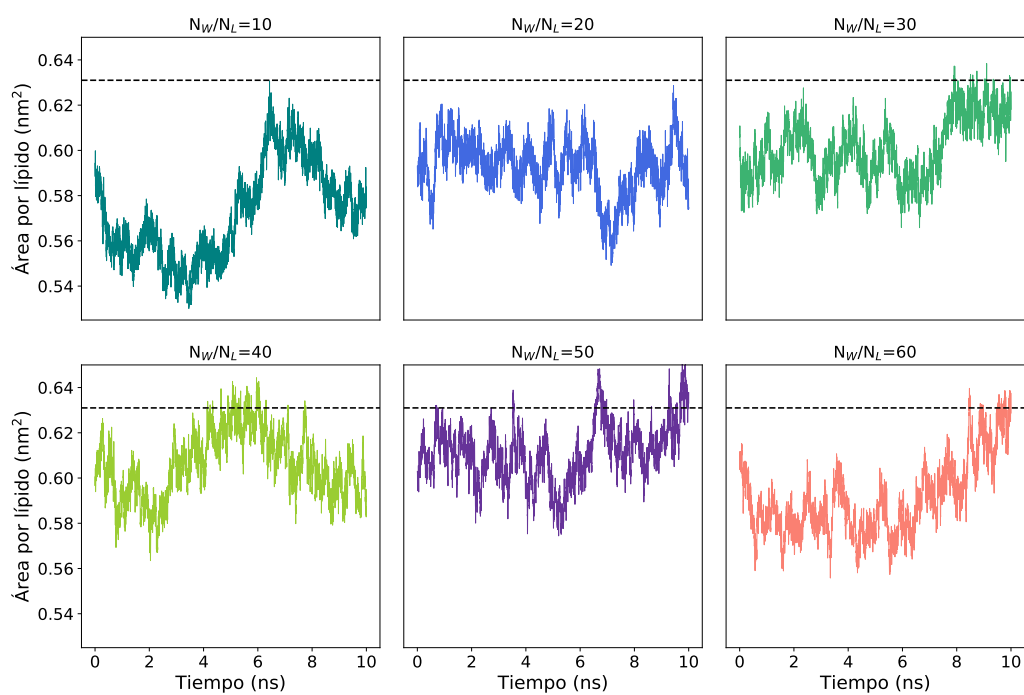


FIGURA A.1: Variación del área por lípido en el tiempo para los sistemas con $N_L=90$ y las diferentes variaciones en el contenido de agua. La línea punteada representa el valor experimental [77, 76].

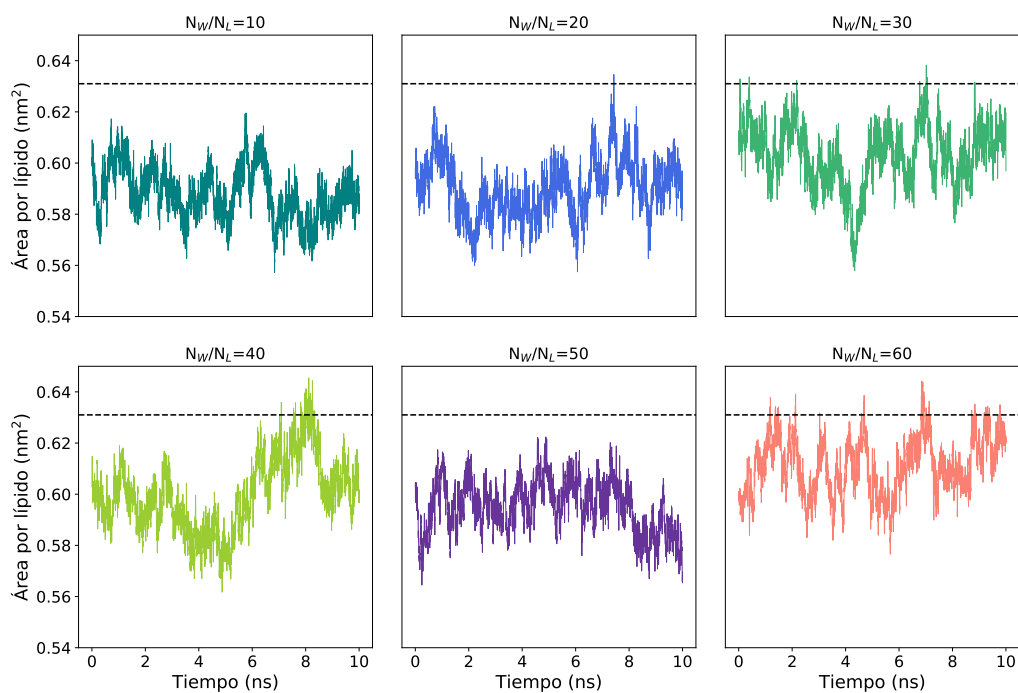


FIGURA A.2: Variación del área por lípido en el tiempo para los sistemas con $N_L=100$ y las diferentes variaciones en el contenido de agua. La línea punteada representa el valor experimental [77, 76].

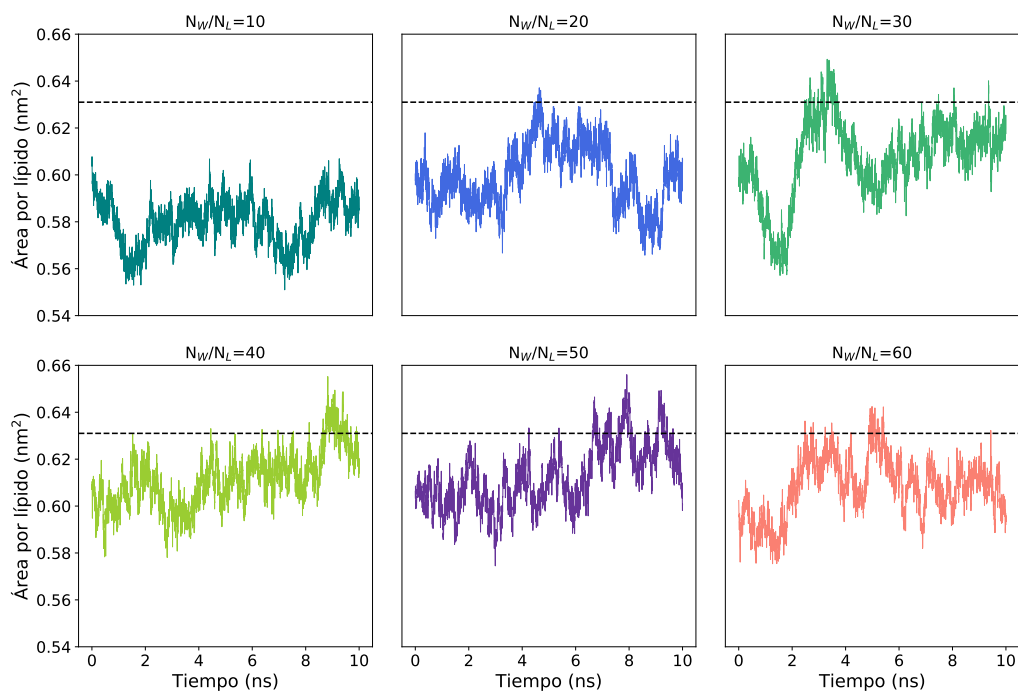


FIGURA A.3: Variación del área por lípido en el tiempo para los sistemas con $N_L=120$ y las diferentes variaciones en el contenido de agua.

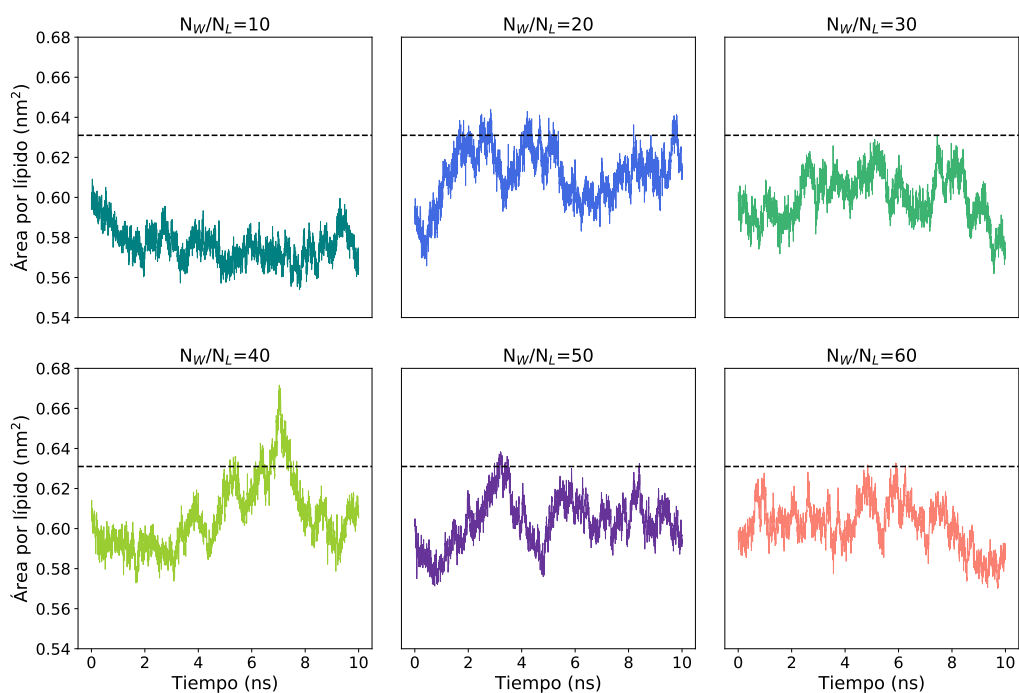


FIGURA A.4: Variación del área por lípido en el tiempo para los sistemas con $N_L=140$ y las diferentes variaciones en el contenido de agua. La línea punteada representa el valor experimental [77, 76].

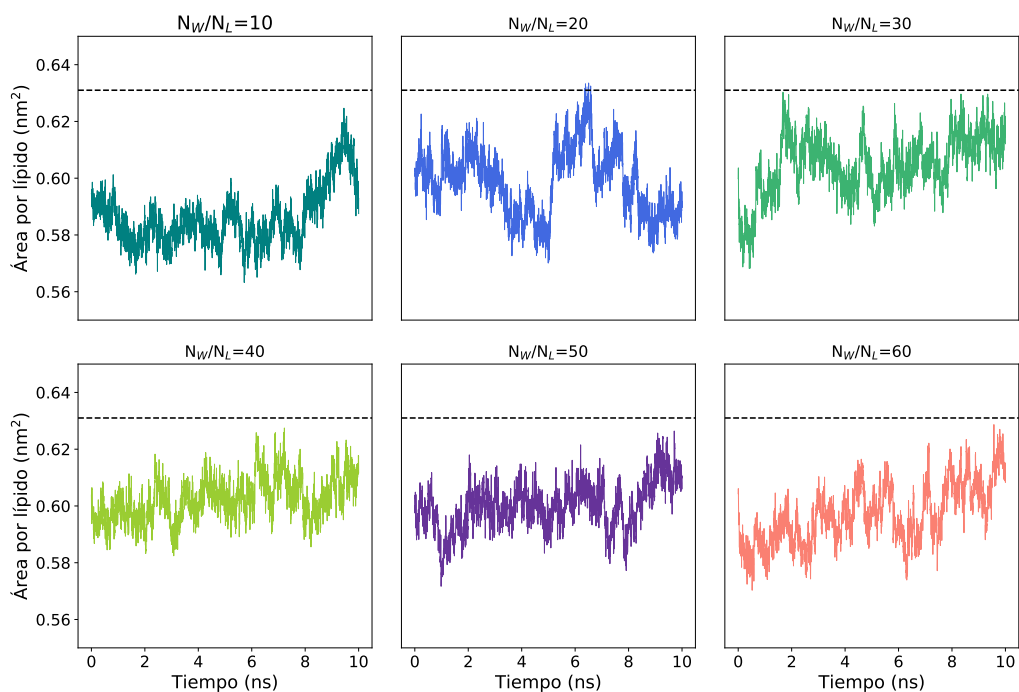


FIGURA A.5: Variación del área por lípido en el tiempo para los sistemas con $N_L=160$ y las diferentes variaciones en el contenido de agua. La línea punteada representa el valor experimental [77, 76].

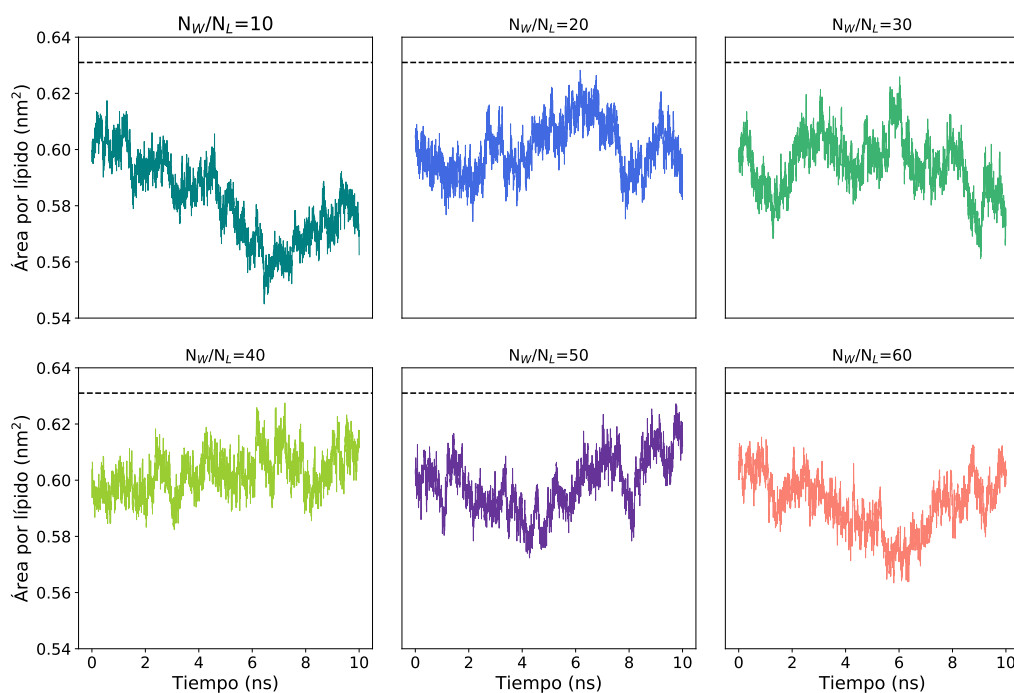


FIGURA A.6: Variación del área por lípido en el tiempo para los sistemas con $N_L=180$ y las diferentes variaciones en el contenido de agua. La línea punteada representa el valor experimental [77, 76].

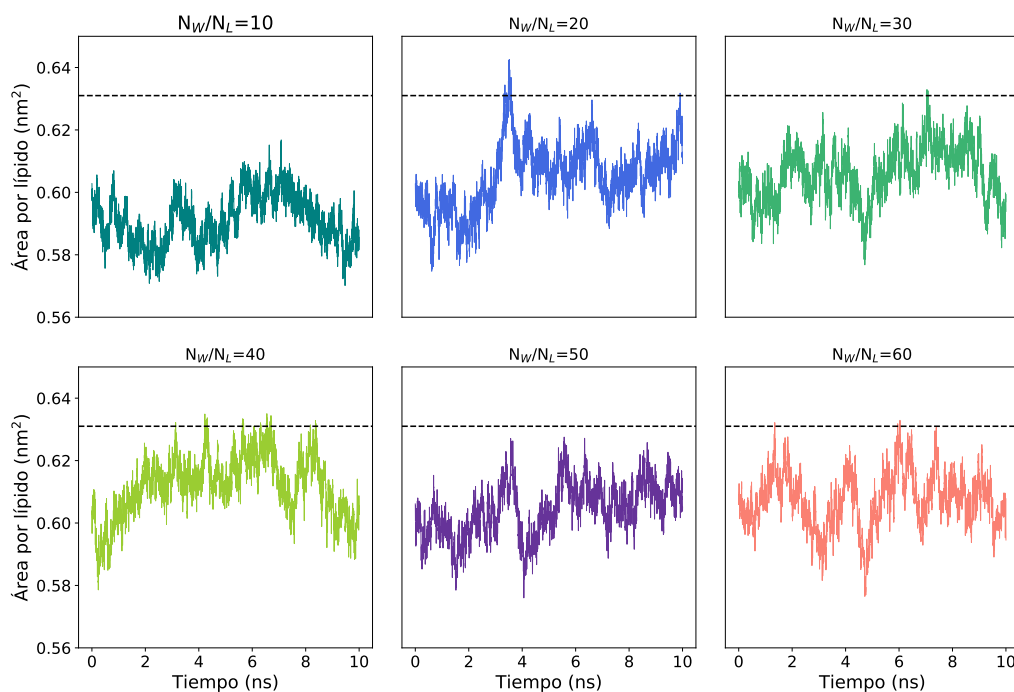


FIGURA A.7: Variación del área por lípido en el tiempo para los sistemas con $N_L=200$ y las diferentes variaciones en el contenido de agua. La línea punteada representa el valor experimental [77, 76].

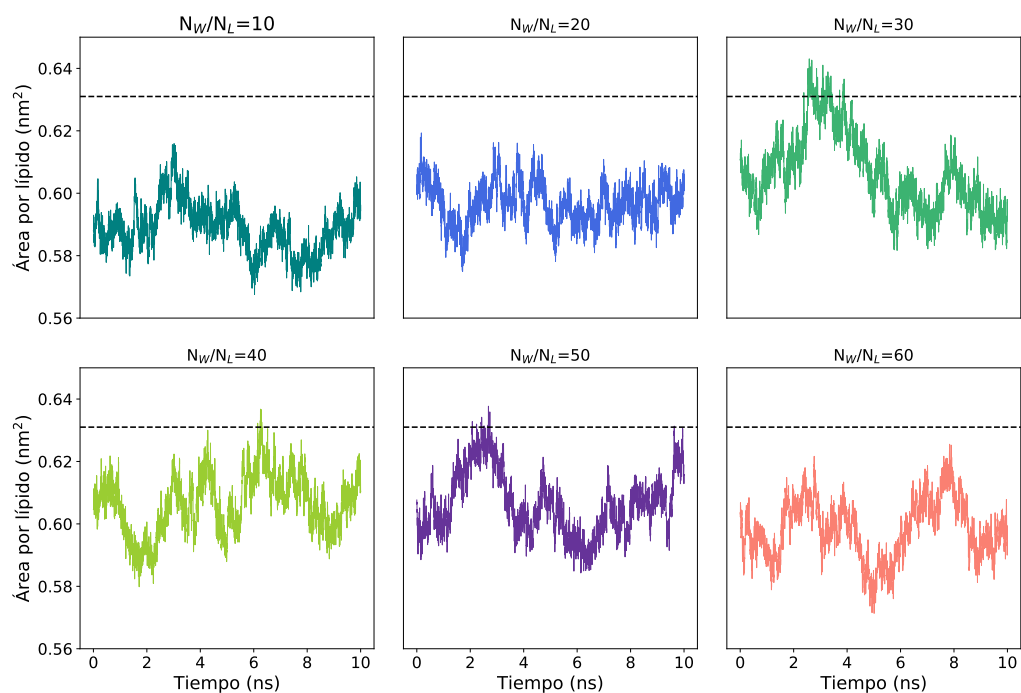


FIGURA A.8: Variación del área por lípido en el tiempo para los sistemas con $N_L=220$ y las diferentes variaciones en el contenido de agua. La línea punteada representa el valor experimental [77, 76].

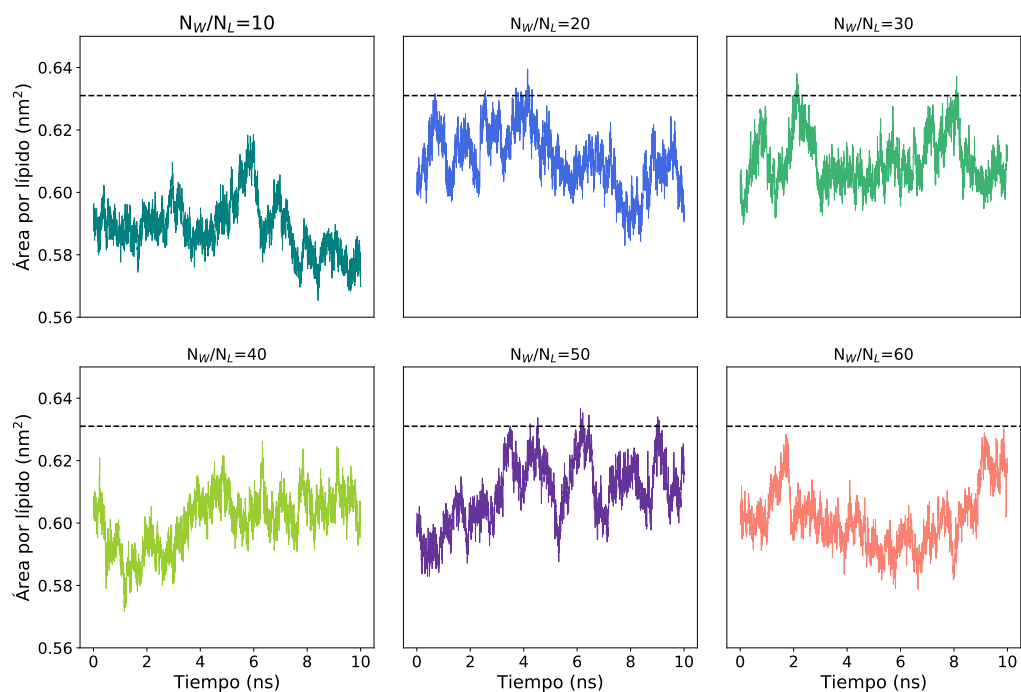


FIGURA A.9: Variación del área por lípido en el tiempo para los sistemas con $N_L=240$ y las diferentes variaciones en el contenido de agua. La línea punteada representa el valor experimental [77, 76].

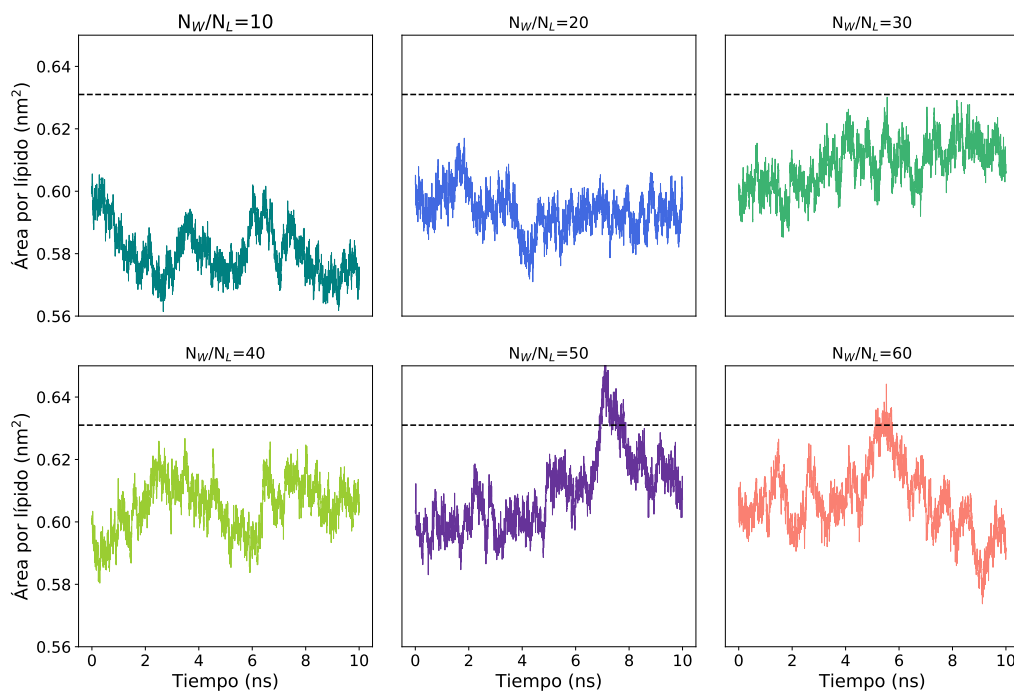


FIGURA A.10: Variación del área por lípido en el tiempo para los sistemas con $N_L=260$ y las diferentes variaciones en el contenido de agua. La línea punteada representa el valor experimental [77, 76].

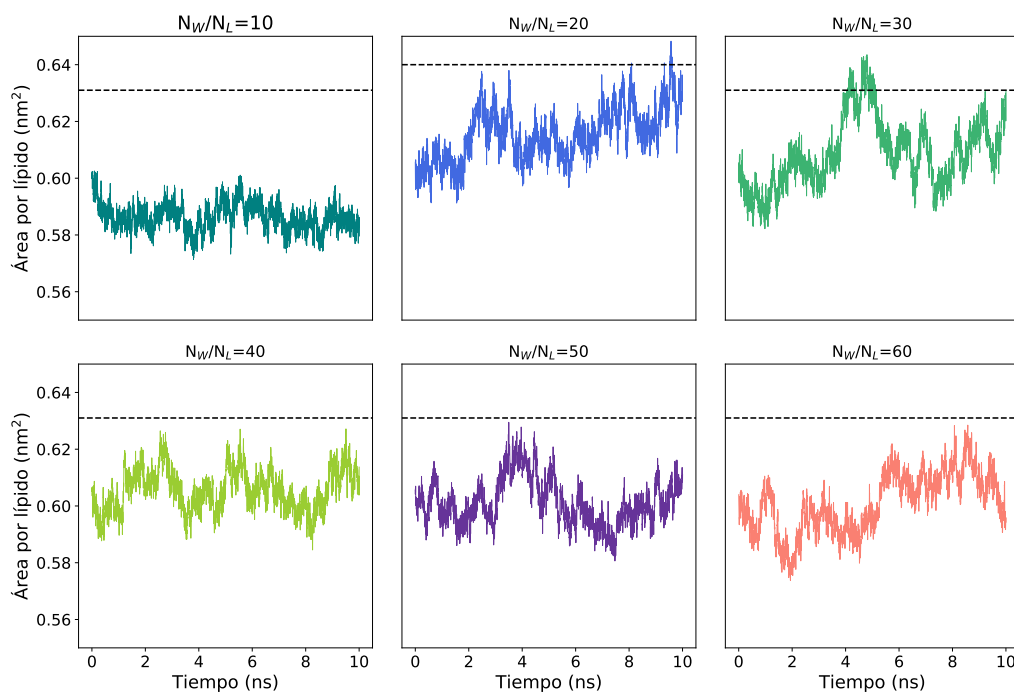


FIGURA A.11: Variación del área por lípido en el tiempo para los sistemas con $N_L=280$ y las diferentes variaciones en el contenido de agua. La línea punteada representa el valor experimental [77, 76].

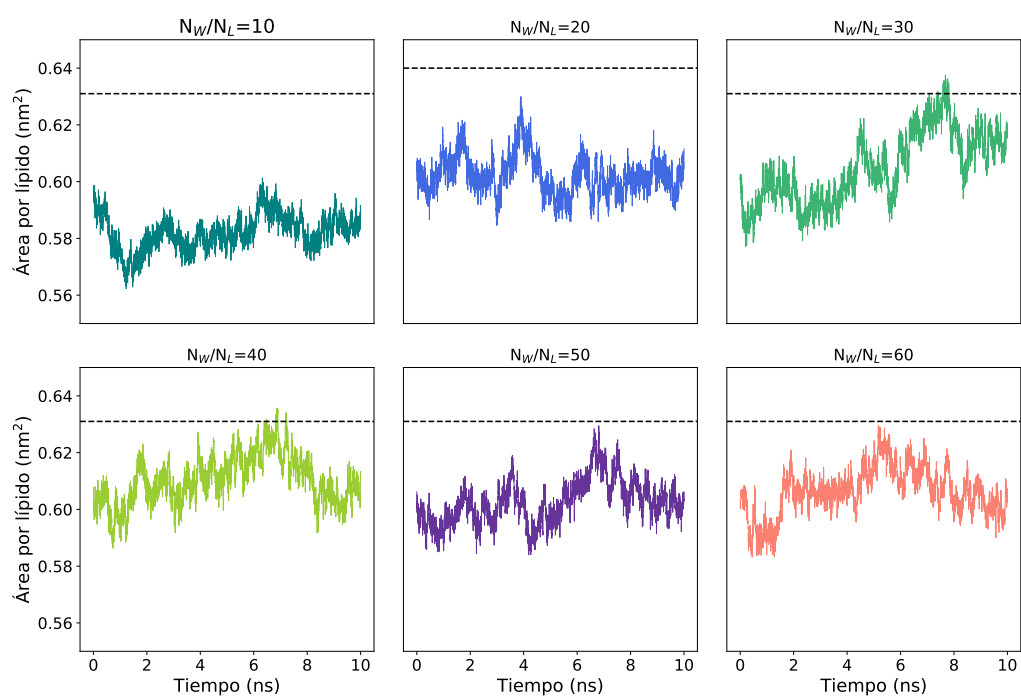


FIGURA A. 12: Variación del área por lípido en el tiempo para los sistemas con $N_L=300$ y las diferentes variaciones en el contenido de agua. La línea punteada representa el valor experimental [77, 76].

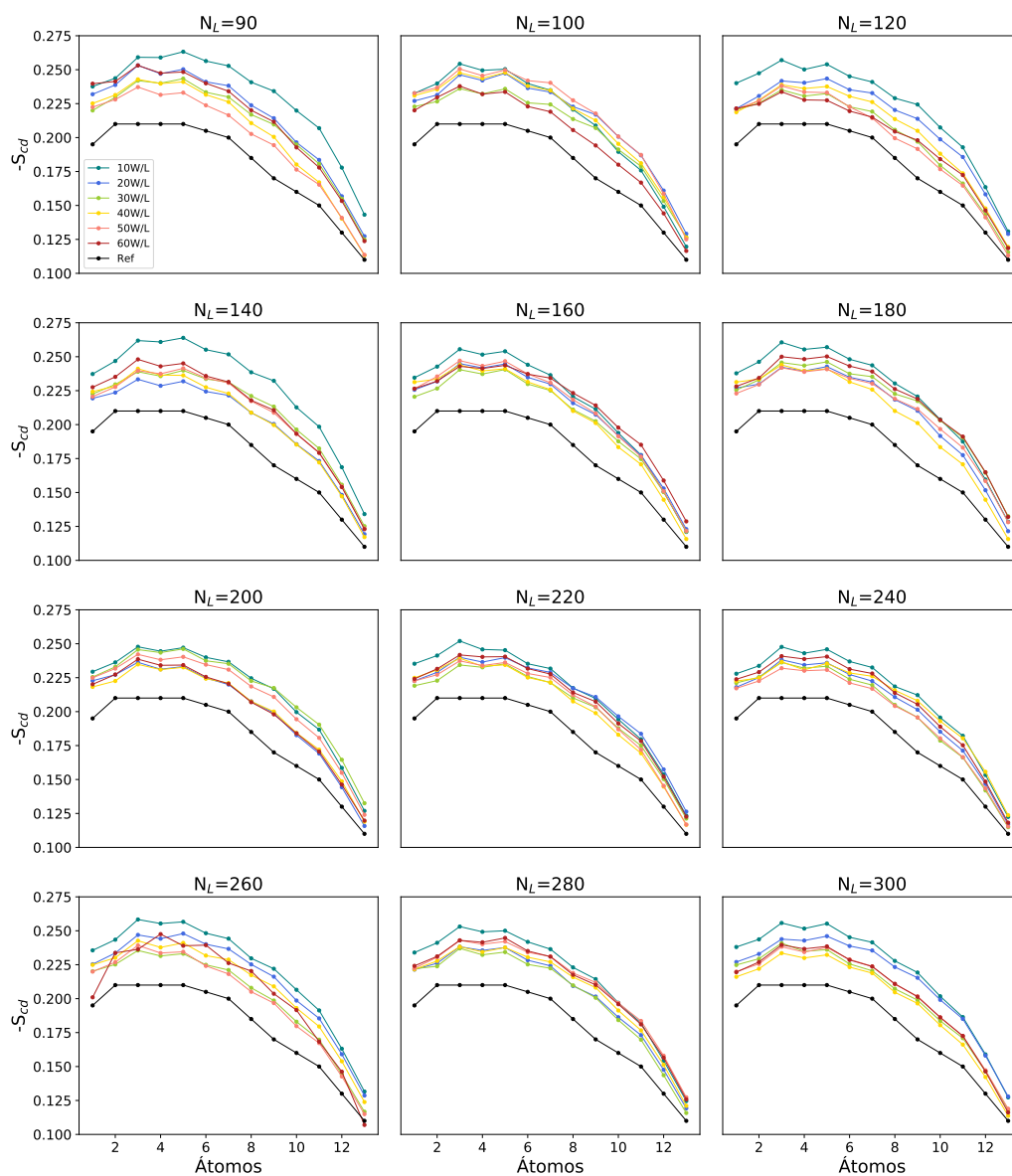


FIGURA A.13: Variación en el parámetro de orden para las diferentes proporciones de moléculas de agua y DPPC. La curva negra representa el valor experimental [123]

Bibliografía

- [1] Zeinab Al-Rekabi y Sonia Contera. «Multifrequency AFM reveals lipid membrane mechanical properties and the effect of cholesterol in modulating viscoelasticity». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.11 (2018), págs. 2658-2663.
- [2] Raghava Alapati. «Atomistic simulations of lipid bilayers in the presence of dimethylsulfoxide». En: (2009).
- [3] Berni Julian Alder y Thomas Everett Wainwright. «Phase transition for a hard sphere system». En: *The Journal of chemical physics* 27.5 (1957), págs. 1208-1209.
- [4] William J Allen, Justin A Lemkul y David R Bevan. «GridMAT-MD: a grid-based membrane analysis tool for use with molecular dynamics». En: *Journal of computational chemistry* 30.12 (2009), págs. 1952-1958.
- [5] Céline Anézo y col. «Methodological issues in lipid bilayer simulations». En: *The Journal of Physical Chemistry B* 107.35 (2003), págs. 9424-9433.
- [6] Mokhtar Awang, Ehsan Mohammadpour e Ibrahim Dauda Muhammad. *Finite Element Modeling of Nanotube Structures: Linear and Non-linear Models*. Springer, 2015.
- [7] Kyle A Baseden y Jesse W Tye. «Introduction to Density Functional Theory: Calculations by Hand on the Helium Atom». En: *Journal of Chemical Education* 91.12 (2014), págs. 2116-2123.
- [8] Margarida Bastos. *Biocalorimetry: Foundations and Contemporary Approaches*. CRC Press, 2016.
- [9] Indrani Bera y Jeffery B Klauda. «Molecular simulations of mixed lipid bilayers with sphingomyelin, glycerophospholipids, and cholesterol». En: *The Journal of Physical Chemistry B* 121.20 (2017), págs. 5197-5208.
- [10] Herman JC Berendsen. *Simulating the physical world: hierarchical modeling from quantum mechanics to fluid dynamics*. Cambridge University Press, 2007.
- [11] Herman JC Berendsen y col. «Interaction models for water in relation to protein hydration». En: *Intermolecular forces*. Springer, 1981, págs. 331-342.
- [12] HJC Berendsen, JR Grigera y TP Straatsma. «The missing term in effective pair potentials». En: *Journal of Physical Chemistry* 91.24 (1987), págs. 6269-6271.
- [13] Oliver Berger, Olle Edholm y Fritz Jähnig. «Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature». En: *Biophysical journal* 72.5 (1997), págs. 2002-2013.

- [14] Rodney L Biltonen. «A statistical-thermodynamic view of cooperative structural changes in phospholipid bilayer membranes: their potential role in biological function». En: *The Journal of Chemical Thermodynamics* 22.1 (1990), págs. 1-19.
- [15] Par Bjelkmar y col. «Implementation of the CHARMM force field in GRO-MACS: analysis of protein stability effects from correction maps, virtual interaction sites, and water models». En: *Journal of chemical theory and computation* 6.2 (2010), págs. 459-466.
- [16] Andreas Blicher y col. «The temperature dependence of lipid membrane permeability, its quantized nature, and the influence of anesthetics». En: *Biophysical journal* 96.11 (2009), págs. 4581-4591.
- [17] Myer Bloom, Evan Evans y Ole G Mouritsen. «Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective». En: *Quarterly reviews of biophysics* 24.3 (1991), págs. 293-397.
- [18] Bernard R Brooks y col. «CHARMM: the biomolecular simulation program». En: *Journal of computational chemistry* 30.10 (2009), págs. 1545-1614.
- [19] Deborah A Brown y Erwin London. «Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts». En: *Journal of Biological Chemistry* 275.23 (2000), págs. 17221-17224.
- [20] Jeffrey L Browning y Joachim Seelig. «Bilayers of phosphatidylserine: a deuterium and phosphorus nuclear magnetic resonance study». En: *Biochemistry* 19.6 (1980), págs. 1262-1270.
- [21] David A Case y col. «AMBER 10, Users' Manual». En: *University of California, San Francisco* 30 (2008).
- [22] Gregor Cevc y Holger Richardsen. «Lipid vesicles and membrane fusion». En: *Advanced Drug Delivery Reviews* 38.3 (1999), págs. 207-232.
- [23] Gregor Cevc, Anthony Watts y Derek Marsh. «Titration of the phase transition of phosphatidylserine bilayer membranes. Effects of pH, surface electrostatics, ion binding, and head-group hydration». En: *Biochemistry* 20.17 (1981), págs. 4955-4965.
- [24] Henry H Chang y Phoebe K Dea. «Insights into the dynamics of DMSO in phosphatidylcholine bilayers». En: *Biophysical chemistry* 94.1-2 (2001), págs. 33-40.
- [25] Dennis Chapman, Julio Urbina y Kevin M Keough. «Biomembrane phase transitions studies of lipid-water systems using differential scanning calorimetry». En: *Journal of Biological Chemistry* 249.8 (1974), págs. 2512-2521.
- [26] Oostenbrink Chris y col. «A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6». En: *Journal of Computational Chemistry* 25.13 (), págs. 1656-1676. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.20090>.
- [27] Nanjun Chu y col. «Anomalous swelling of lipid bilayer stacks is caused by softening of the bending modulus». En: *Physical review E* 71.4 (2005), pág. 041904.

- [28] Wendy D. Cornell y col. «A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules». En: *Journal of the American Chemical Society* 117.19 (1995), págs. 5179-5197. DOI: 10.1021/ja00124a002. eprint: <https://doi.org/10.1021/ja00124a002>. URL: <https://doi.org/10.1021/ja00124a002>.
- [29] Tom Darden, Darrin York y Lee Pedersen. «Particle mesh Ewald: An N log (N) method for Ewald sums in large systems». En: *The Journal of chemical physics* 98.12 (1993), págs. 10089-10092.
- [30] RA Demel, F Paltauf y H Hauser. «Monolayer characteristics and thermal behavior of natural and synthetic phosphatidylserines». En: *Biochemistry* 26.26 (1987), págs. 8659-8665.
- [31] Callum J Dickson y col. «Lipid14: the amber lipid force field». En: *Journal of chemical theory and computation* 10.2 (2014), págs. 865-879.
- [32] Milka Doktorova y col. «A new computational method for membrane compressibility: Bilayer mechanical thickness revisited». En: *Biophysical journal* 116.3 (2019), págs. 487-502.
- [33] Jan Domański y col. «Lipidbook: a public repository for force-field parameters used in membrane simulations». En: *The Journal of membrane biology* 236.3 (2010), págs. 255-258.
- [34] Michael Edidin. «Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers». En: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4.5 (2003), págs. 414.
- [35] S Engelborghs y col. «Rationale and clinical data supporting nutritional intervention in Alzheimer's disease». En: *Acta Clinica Belgica* 69.1 (2014), págs. 17-24.
- [36] Giray Enkavi y col. «Multiscale simulations of biological membranes: the challenge to understand biological phenomena in a living substance». En: *Chemical reviews* 119.9 (2019), págs. 5607-5774.
- [37] Inna Ermilova y Alexander P Lyubartsev. «Extension of the slipids force field to polyunsaturated lipids». En: *The Journal of Physical Chemistry B* 120.50 (2016), págs. 12826-12842.
- [38] Jonathan W Essex, Michael M Hann y W Graham Richards. «Molecular dynamics simulation of a hydrated phospholipid bilayer». En: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 344.1309 (1994), págs. 239-260.
- [39] Denis J Evans y Brad Lee Holian. «The nose-hoover thermostat». En: *The Journal of chemical physics* 83.8 (1985), págs. 4069-4074.
- [40] Eoin Fahy y col. «A comprehensive classification system for lipids». En: *European journal of lipid science and technology* 107.5 (2005), págs. 337-364.
- [41] J-B Fournier, A Ajdari y L Peliti. «Effective-area elasticity and tension of micromanipulated membranes». En: *Physical review letters* 86.21 (2001), págs. 4970.
- [42] Daan Frenkel y Berend Smit. *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications*. Vol. 1. Elsevier, 2001.

- [43] MJ Frisch y col. «Gaussian 16, revision A. 03». En: *Gaussian Inc., Wallingford CT* (2016).
- [44] Kenji Fukunaga, Zakir Hossain y Koretaro Takahashi. «Marine phosphatidylcholine suppresses 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats by inducing apoptosis». En: *Nutrition research* 28.9 (2008), págs. 635-640.
- [45] Mohammad Mehdi Ghahremanpour y col. «MemBuilder: a web-based graphical interface to build heterogeneously mixed membrane bilayers for the GROMACS biomolecular simulation program». En: *Bioinformatics* 30.3 (2013), págs. 439-441.
- [46] M.A. González. «Force fields and molecular dynamics simulations». En: *JDN 18-Neutrons et Simulations* 12 (2011), págs. 169 -200.
- [47] Evert Gorter y FJEM Grendel. «On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood». En: *Journal of experimental medicine* 41.4 (1925), págs. 439-443.
- [48] Helmut Grubmüller y col. «Generalized Verlet algorithm for efficient molecular dynamics simulations with long-range interactions». En: *Molecular Simulation* 6.1-3 (1991), págs. 121-142.
- [49] Wilfred F van Gunsteren, Paul K Weiner y Anthony J Wilkinson. *Computer simulation of biomolecular systems: theoretical and experimental applications*. Vol. 3. Springer Science & Business Media, 2013.
- [50] A. T. Hagler, E. Huler y S. Lifson. «Energy functions for peptides and proteins. I. Derivation of a consistent force field including the hydrogen bond from amide crystals». En: *Journal of the American Chemical Society* 96.17 (1974). PMID: 4851860, págs. 5319-5327. DOI: 10.1021/ja00824a004. eprint: <https://doi.org/10.1021/ja00824a004>. URL: <https://doi.org/10.1021/ja00824a004>.
- [51] Marcus D Hanwell y col. «Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform». En: *Journal of cheminformatics* 4.1 (2012), pág. 17.
- [52] Helmut Hauser y G Graham Shipley. «Interactions of monovalent cations with phosphatidylserine bilayer membranes». En: *Biochemistry* 22.9 (1983), págs. 2171-2178.
- [53] Jeffrey R Hazel. «Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation?» En: *Annual review of physiology* 57.1 (1995), págs. 19-42.
- [54] Thomas Heimburg y Andrew D Jackson. «On soliton propagation in biomembranes and nerves». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.28 (2005), págs. 9790-9795.
- [55] Berk Hess y col. «GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation». En: *Journal of chemical theory and computation* 4.3 (2008), págs. 435-447.
- [56] Berk Hess y col. «LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations». En: *Journal of computational chemistry* 18.12 (1997), págs. 1463-1472.

- [57] Mika Hilvo y col. «Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression». En: *Cancer research* 71.9 (2011), págs. 3236-3245.
- [58] William Humphrey, Andrew Dalke, Klaus Schulten y col. «VMD: visual molecular dynamics». En: *Journal of molecular graphics* 14.1 (1996), págs. 33-38.
- [59] MT Hyvonen. «Molecular dynamics simulations on phospholipid membranes.» En: (2003).
- [60] Helgi I Ingólfsson y col. «Computational ‘microscopy’ of cellular membranes». En: *J Cell Sci* (2016), jcs-176040.
- [61] Masataka ISHINAGA, Yasuko OKITA y Akiko ITO. «Calorimetric Study on a Dipalmitoylphosphatidylcholine-Propylgallate Mixture». En: *The Journal of Biochemistry* 100.6 (1986), págs. 1663-1668.
- [62] Peter Jantscheff y col. «Lysophosphatidylcholine pretreatment reduces VLA-4 and P-Selectin-mediated B16. F10 melanoma cell adhesion in vitro and inhibits metastasis-like lung invasion in vivo». En: *Molecular cancer therapeutics* 10.1 (2011), págs. 186-197.
- [63] Matti Javanainen y Hector Martinez-Seara. «Efficient preparation and analysis of membrane and membrane protein systems». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1858.10 (2016), págs. 2468-2482.
- [64] Joakim PM Jambeck y Alexander P Lyubartsev. «Another piece of the membrane puzzle: extending slipids further». En: *Journal of chemical theory and computation* 9.1 (2012), págs. 774-784.
- [65] D Jefferies y S Khalid. «Molecular Simulations of Complex Membrane Models». En: *Modeling of Microscale Transport in Biological Processes*. Elsevier, 2017, págs. 1-18.
- [66] Sunhwan Jo y col. «CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM». En: *Journal of computational chemistry* 29.11 (2008), págs. 1859-1865.
- [67] William L Jorgensen y Jeffrey D Madura. «Temperature and size dependence for Monte Carlo simulations of TIP4P water». En: *Molecular Physics* 56.6 (1985), págs. 1381-1392.
- [68] William L Jorgensen y col. «Comparison of simple potential functions for simulating liquid water». En: *The Journal of chemical physics* 79.2 (1983), págs. 926-935.
- [69] Marc W van der Kamp y Adrian J Mulholland. «Computational enzymology: insight into biological catalysts from modelling». En: *Natural product reports* 25.6 (2008), págs. 1001-1014.
- [70] Martin Karplus y J. Andrew McCammon. «Molecular dynamics simulations of biomolecules». En: *Nature Structural Biology volume* 9 (2002), págs. 649-652.
- [71] Alexander J Kastaniotis y col. «Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862.1 (2017), págs. 39-48.

- [72] Jeffery B Klauda y col. «Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types». En: *The journal of physical chemistry B* 114.23 (2010), págs. 7830-7843.
- [73] D Kony y col. «An improved OPLS-AA force field for carbohydrates». En: *Journal of computational chemistry* 23.15 (2002), págs. 1416-1429.
- [74] Bartosz Kowalik y col. «Combination of MD simulations with two-state kinetic rate modeling elucidates the chain melting transition of phospholipid bilayers for different hydration levels». En: *The Journal of Physical Chemistry B* 119.44 (2015), págs. 14157-14167.
- [75] R Koynova y B Tenchov. «Transitions between lamellar and non-lamellar phases in membrane lipids and their physiological roles». En: *OA Biochemistry* 1.1 (2013), págs. 1-9.
- [76] Norbert Kučerka, Mu-Ping Nieh y John Katsaras. «Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1808.11 (2011), págs. 2761-2771.
- [77] Norbert Kučerka y col. «Lipid bilayer structure determined by the simultaneous analysis of neutron and X-ray scattering data». En: *Biophysical journal* 95.5 (2008), págs. 2356-2367.
- [78] F Lamari y col. «Disorders of phospholipids, sphingolipids and fatty acids biosynthesis: toward a new category of inherited metabolic diseases». En: *Journal of inherited metabolic disease* 36.3 (2013), págs. 411-425.
- [79] Chau-Hwang Lee, Wan-Chen Lin y Jyhpyng Wang. «All-optical measurements of the bending rigidity of lipid-vesicle membranes across structural phase transitions». En: *Physical Review E* 64.2 (2001), pág. 020901.
- [80] Sukit Leekumjorn y Amadeu K Sum. «Molecular simulation study of structural and dynamic properties of mixed DPPC/DPPE bilayers». En: *Biophysical journal* 90.11 (2006), págs. 3951-3965.
- [81] Sukit Leekumjorn y Amadeu K Sum. «Molecular studies of the gel to liquid-crystalline phase transition for fully hydrated DPPC and DPPE bilayers». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1768.2 (2007), págs. 354-365.
- [82] John Lenard y SJ Singer. «Protein conformation in cell membrane preparations as studied by optical rotatory dispersion and circular dichroism». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 56.6 (1966), pág. 1828.
- [83] Michael Levitt y col. «Potential energy function and parameters for simulations of the molecular dynamics of proteins and nucleic acids in solution». En: *Computer Physics Communications* 91.1 (1995), págs. 215 -231. ISSN: 0010-4655. DOI: [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00049-L](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00049-L). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001046559500049L>.

- [84] RN Lewis y Ronald N McElhaney. «Calorimetric and spectroscopic studies of the polymorphic phase behavior of a homologous series of n-saturated 1, 2-diacyl phosphatidylethanolamines». En: *Biophysical journal* 64.4 (1993), págs. 1081-1096.
- [85] Xin-Min Li y col. «Sphingomyelin interfacial behavior: the impact of changing acyl chain composition». En: *Biophysical Journal* 78.4 (2000), págs. 1921-1931.
- [86] Yufeng Liu y John F Nagle. «Diffuse scattering provides material parameters and electron density profiles of biomembranes». En: *Physical Review E* 69.4 (2004), pág. 040901.
- [87] JJ López Cascales y col. «Molecular dynamics simulation of a charged biological membrane». En: *The Journal of chemical physics* 104.7 (1996), págs. 2713-2720.
- [88] Alexander P Lyubartsev y Alexander L Rabinovich. «Force field development for lipid membrane simulations». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1858.10 (2016), págs. 2483-2497.
- [89] Alexander P Lyubartsev y Alexander L Rabinovich. «Force field development for lipid membrane simulations». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1858.10 (2016), págs. 2483-2497.
- [90] RC MacDonald, SA Simon y E Baer. «Ionic influences on the phase transition of dipalmitoylphosphatidylserine». En: *Biochemistry* 15.4 (1976), págs. 885-891.
- [91] Alexander D MacKerell Jr y col. «All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins». En: *The journal of physical chemistry B* 102.18 (1998), págs. 3586-3616.
- [92] Michael W Mahoney y William L Jorgensen. «A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions». En: *The Journal of Chemical Physics* 112.20 (2000), págs. 8910-8922.
- [93] Clement L Markert. «Neoplasia: a disease of cell differentiation». En: *Cancer research* 28.9 (1968), págs. 1908-1914.
- [94] Siewert J Marrink, Jelger Risselada y Alan E Mark. «Simulation of gel phase formation and melting in lipid bilayers using a coarse grained model». En: *Chemistry and physics of lipids* 135.2 (2005), págs. 223-244.
- [95] Siewert J Marrink y col. «Computational modeling of realistic cell membranes». En: *Chemical reviews* 119.9 (2019), págs. 6184-6226.
- [96] Siewert J Marrink y col. «The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations». En: *The journal of physical chemistry B* 111.27 (2007), págs. 7812-7824.
- [97] Leandro Martínez y col. «PACKMOL: a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations». En: *Journal of computational chemistry* 30.13 (2009), págs. 2157-2164.
- [98] PR Maulik y GG Shipley. «N-palmitoyl sphingomyelin bilayers: structure and interactions with cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine». En: *Biochemistry* 35.24 (1996), págs. 8025-8034.

- [99] Satyajit Mayor y Madan Rao. «Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface». En: *Traffic* 5.4 (2004), págs. 231-240.
- [100] J Andrew McCammon, Bruce R Gelin y Martin Karplus. «Dynamics of folded proteins». En: *Nature* 267.5612 (1977), págs. 585-590.
- [101] Gerrit van Meer. «Cellular lipidomics». En: *The EMBO journal* 24.18 (2005), págs. 3159-3165.
- [102] Gerrit van Meer y Anton IPM de Kroon. «Lipid map of the mammalian cell». En: *J Cell Sci* 124.1 (2011), págs. 5-8.
- [103] Philippe Meleard y col. «Bending elasticities of model membranes: influences of temperature and sterol content». En: *Biophysical journal* 72.6 (1997), págs. 2616-2629.
- [104] Richard Mendelsohn y col. «Quantitative determination of conformational disorder in the acyl chains of phospholipid bilayers by infrared spectroscopy». En: *Biochemistry* 28.22 (1989), págs. 8934-8939.
- [105] Luca Monticelli y D Peter Tieleman. «Force fields for classical molecular dynamics». En: *Biomolecular simulations*. Springer, 2013, págs. 197-213.
- [106] Ole G Mouritsen y col. «In search of a new biomembrane model». En: (1998).
- [107] Satish Mulukutla y G Graham Shipley. «Structure and thermotropic properties of phosphatidylethanolamine and its N-methyl derivatives». En: *Biochemistry* 23.11 (1984), págs. 2514-2519.
- [108] Tetsuro Nagai, Ryuichi Ueoka y Yuko Okamoto. «Phase behavior of a lipid bilayer system studied by a replica-exchange molecular dynamics simulation». En: *Journal of the Physical Society of Japan* 81.2 (2012), pág. 024002.
- [109] JF Nagle. «Area/lipid of bilayers from NMR». En: *Biophysical journal* 64.5 (1993), págs. 1476-1481.
- [110] JF Nagle y HL Scott Jr. «Lateral compressibility of lipid mono-and bilayers. Theory of membrane permeability». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 513.2 (1978), págs. 236-243.
- [111] John F Nagle y col. «Structure of gel phase DPPC determined by X-ray diffraction». En: *Chemistry and physics of lipids* 218 (2019), págs. 168-177.
- [112] Pramod C Nair y John O Miners. «Molecular dynamics simulations: from structure function relationships to drug discovery». En: *In silico pharmacology* 2.1 (2014), pág. 4.
- [113] Hiroyuki Nakashima e Hiroshi Nakatsuji. «Solving the Schrödinger equation for helium atom and its isoelectronic ions with the free iterative complement interaction (ICI) method». En: *The Journal of Chemical Physics* 127.22 (2007), pág. 224104. DOI: 10.1063/1.2801981. eprint: <https://doi.org/10.1063/1.2801981>. URL: <https://doi.org/10.1063/1.2801981>.
- [114] Noel M O'Boyle y col. «Open Babel: An open chemical toolbox». En: *Journal of cheminformatics* 3.1 (2011), pág. 33.

- [115] OH Samuli Ollila y Georg Pabst. «Atomistic resolution structure and dynamics of lipid bilayers in simulations and experiments». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1858.10 (2016), págs. 2512-2528.
- [116] Greger Orädd, Philip W Westerman y Göran Lindblom. «Lateral diffusion coefficients of separate lipid species in a ternary raft-forming bilayer: a Pfg-NMR multinuclear study». En: *Biophysical journal* 89.1 (2005), págs. 315-320.
- [117] James S Owen y col. «Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease.» En: *Journal of lipid research* 23.1 (1982), págs. 124-132.
- [118] Giuseppe Paradies y col. «Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion». En: *Free Radical Biology and Medicine* 27.1-2 (1999), págs. 42-50.
- [119] Michele Parrinello y Aneesur Rahman. «Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method». En: *Journal of Applied physics* 52.12 (1981), págs. 7182-7190.
- [120] Dietmar Paschek. «Temperature dependence of the hydrophobic hydration and interaction of simple solutes: An examination of five popular water models». En: *The Journal of chemical physics* 120.14 (2004), págs. 6674-6690.
- [121] Richard W Pastor. «Molecular dynamics and Monte Carlo simulations of lipid bilayers». En: *Current Opinion in Structural Biology* 4.4 (1994), págs. 486-492.
- [122] RW Pastor y AD MacKerell Jr. «Development of the CHARMM force field for lipids». En: *The journal of physical chemistry letters* 2.13 (2011), págs. 1526-1532.
- [123] Horia I Petrache, Steven W Dodd y Michael F Brown. «Area per lipid and acyl length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by ²H NMR spectroscopy». En: *Biophysical journal* 79.6 (2000), págs. 3172-3192.
- [124] Horia I Petrache, Stephanie Tristram-Nagle y John F Nagle. «Fluid phase structure of EPC and DMPC bilayers». En: *Chemistry and physics of lipids* 95.1 (1998), págs. 83-94.
- [125] Jay W Pettegrew y col. «Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease». En: *Neurochemical research* 26.7 (2001), págs. 771-782.
- [126] James C Phillips y col. «Scalable molecular dynamics with NAMD». En: *Journal of computational chemistry* 26.16 (2005), págs. 1781-1802.
- [127] J.C. Phys. «LAMMPS Users Manual». En: *Sandia National Laboratories* (2003).
- [128] Thomas J Piggot, Angel Pineiro y Syma Khalid. «Molecular dynamics simulations of phosphatidylcholine membranes: a comparative force field study». En: *Journal of chemical theory and computation* 8.11 (2012), págs. 4593-4609.
- [129] Mathieu Pinot y col. «Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins». En: *Science* 345.6197 (2014), págs. 693-697.

- [130] David Poger, Bertrand Caron y Alan E Mark. «Validating lipid force fields against experimental data: Progress, challenges and perspectives». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1858.7 (2016), págs. 1556-1565.
- [131] Shan-Shan Qin, Zhi-Wu Yu y Yang-Xin Yu. «Structural characterization on the gel to liquid-crystal phase transition of fully hydrated DSPC and DSPE bilayers». En: *The Journal of Physical Chemistry B* 113.23 (2009), págs. 8114-8123.
- [132] «Quantum mechanics of many-electron systems». En: *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 123.792 (1929), págs. 714-733. ISSN: 0950-1207. DOI: 10.1098/rspa.1929.0094. URL: <http://rspa.royalsocietypublishing.org/content/123/792/714>.
- [133] Aneesur Rahman. «Correlations in the motion of atoms in liquid argon». En: *Physical review* 136.2A (1964), A405.
- [134] KI Ramachandran, Gopakumar Deepa y Krishnan Namboori. *Computational chemistry and molecular modeling: principles and applications*. Springer Science & Business Media, 2008.
- [135] Bodil Ramstedt y J Peter Slotte. «Membrane properties of sphingomyelins». En: *FEBS letters* 531.1 (2002), págs. 33-37.
- [136] Dennis C Rapaport y Dennis C Rapaport Rapaport. *The art of molecular dynamics simulation*. Cambridge university press, 2004.
- [137] W Rawicz y col. «Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers». En: *Biophysical journal* 79.1 (2000), págs. 328-339.
- [138] F Reiss-Husson. «Structure des phases liquide-cristallines de différents phospholipides, monoglycérides, sphingolipides, anhydres ou en présence d'eau». En: *Journal of Molecular Biology* 25.3 (1967), págs. 363-382.
- [139] J David Robertson. «The ultrastructure of cell membranes and their derivatives.» En: *Biochemical Society Symposium*. Vol. 16. 1959, págs. 3-43.
- [140] Martin Rossmeisl y col. «Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids». En: *PloS one* 7.6 (2012), e38834.
- [141] Fatima Sajadi y Christopher N Rowley. «Simulations of lipid bilayers using the CHARMM36 force field with the TIP3P-FB and TIP4P-FB water models». En: *PeerJ* 6 (2018), e5472.
- [142] Erwin Schrödinger. «An undulatory theory of the mechanics of atoms and molecules». En: *Physical review* 28.6 (1926), pág. 1049.
- [143] HL Scott. «Lipid-cholesterol interactions. Monte Carlo simulations and theory». En: *Biophysical journal* 59.2 (1991), págs. 445-455.
- [144] Alvaro Sebastian y col. *Bioinformática con Ñ*. Ene. de 2014.
- [145] Ganesh Shahane y col. «Physical properties of model biological lipid bilayers: insights from all-atom molecular dynamics simulations». En: *Journal of molecular modeling* 25.3 (2019), pág. 76.

- [146] S Jonathan Singer y Garth L Nicolson. «The fluid mosaic model of the structure of cell membranes». En: *Science* 175.4023 (1972), págs. 720-731.
- [147] Alexander M Smondyrev y Max L Berkowitz. «Molecular dynamics simulation of DPPC bilayer in DMSO». En: *Biophysical journal* 76.5 (1999), págs. 2472-2478.
- [148] Arthur A Spector y Mark A Yorek. «Membrane lipid composition and cellular function.» En: *Journal of lipid research* 26.9 (1985), págs. 1015-1035.
- [149] Frank H Stillinger y Aneesur Rahman. «Improved simulation of liquid water by molecular dynamics». En: *The Journal of Chemical Physics* 60.4 (1974), págs. 1545-1557.
- [150] Manish Sud y col. «Lmsd: Lipid maps structure database». En: *Nucleic acids research* 35.suppl_1 (2006), págs. D527-D532.
- [151] Liping Sun y Rainer A Böckmann. «Membrane phase transition during heating and cooling: Molecular insight into reversible melting». En: *European Biophysics Journal* 47.2 (2018), págs. 151-164.
- [152] B Tenchov. «On the reversibility of the phase transitions in lipid-water systems». En: *Chemistry and physics of lipids* 57.2-3 (1991), págs. 165-177.
- [153] D Peter Tieleman, Berk Hess y Mark SP Sansom. «Analysis and evaluation of channel models: simulations of alamethicin». En: *Biophysical journal* 83.5 (2002), págs. 2393-2407.
- [154] D Peter Tieleman, Siewert-Jan Marrink y Herman JC Berendsen. «A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 1331.3 (1997), págs. 235-270.
- [155] Fuyuki Tokumasu y col. «Altered membrane structure and surface potential in homozygous hemoglobin C erythrocytes». En: *PloS one* 4.6 (2009).
- [156] S Tristram-Nagle y col. «Measurement of chain tilt angle in fully hydrated bilayers of gel phase lecithins». En: *Biophysical journal* 64.4 (1993), págs. 1097-1109.
- [157] Stephanie Tristram-Nagle y col. «DMSO produces a new subgel phase in DPPC: DSC and X-ray diffraction study». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1369.1 (1998), págs. 19-33.
- [158] Stephanie Tristram-Nagle y col. «Kinetics of subgel formation in DPPC: X-ray diffraction proves nucleation-growth hypothesis». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1191.1 (1994), págs. 14-20.
- [159] Eva Tvrzicka y col. «FATTY ACIDS AS BIOCOMPOUNDS: THEIR ROLE IN HUMAN METABOLISM, HEALTH AND DISEASE-A REVIEW. PART 1: CLASSIFICATION, DIETARY SOURCES AND BIOLOGICAL FUNCTIONS.» En: *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc* 155.2 (2011).

- [160] Eva Tvrzicka y col. «FATTY ACIDS AS BIOCOMPOUNDS: THEIR ROLE IN HUMAN METABOLISM, HEALTH AND DISEASE-A REVIEW. PART 1: CLASSIFICATION, DIETARY SOURCES AND BIOLOGICAL FUNCTIONS.» En: *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc* 155.2 (2011).
- [161] Karthik Uppulury, Patrick S Coppock y James T Kindt. «Molecular simulation of the DPPE lipid bilayer gel phase: coupling between molecular packing order and tail tilt angle». En: *The Journal of Physical Chemistry B* 119.28 (2015), págs. 8725-8733.
- [162] David Van Der Spoel y col. «GROMACS: fast, flexible, and free». En: *Journal of computational chemistry* 26.16 (2005), págs. 1701-1718.
- [163] Gerrit Van Meer, Dennis R Voelker y Gerald W Feigenson. «Membrane lipids: where they are and how they behave». En: *Nature reviews Molecular cell biology* 9.2 (2008), pág. 112.
- [164] Guido Van Rossum y Fred L Drake Jr. *Python tutorial*. Centrum voor Wetkunde en Informatica Amsterdam, The Netherlands, 1995.
- [165] Sweta Vangaveti, Srivathsan V Ranganathan y Alan A Chen. «Advances in RNA molecular dynamics: a simulator's guide to RNA force fields». En: *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 8.2 (2017), e1396.
- [166] Alberto Vela. «Logros y perspectivas de la Química Teórica». En: *Educación química* 27.4 (2016), págs. 278-285.
- [167] Dimitrios Vlachakis y col. «Current state-of-the-art molecular dynamics methods and applications». En: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Vol. 94. Elsevier, 2014, págs. 269-313.
- [168] F Volke y col. «Dynamic properties of water at phosphatidylcholine lipid-bilayer surfaces as seen by deuterium and pulsed field gradient proton NMR». En: *Chemistry and physics of lipids* 70.2 (1994), págs. 121-131.
- [169] Yin Wang y col. «DPPC-cholesterol phase diagram using coarse-grained Molecular Dynamics simulations». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1858.11 (2016), págs. 2846-2857.
- [170] P. K. Warne y col. «Computation of structures of homologous proteins. .alpha.-Lactalbumin from lysozyme». En: *Biochemistry* 13.4 (1974). PMID: 4855768, págs. 768-782. DOI: 10.1021/bi00701a020. eprint: <https://doi.org/10.1021/bi00701a020>. URL: <https://doi.org/10.1021/bi00701a020>.
- [171] A Warshel y M Karplus. «Calculation of ground and excited state potential surfaces of conjugated molecules. I. Formulation and parametrization». En: *Journal of the American Chemical Society* 94.16 (1972), págs. 5612-5625.
- [172] Tsjerk A Wassenaar y col. «Computational lipidomics with insane: a versatile tool for generating custom membranes for molecular simulations». En: *Journal of chemical theory and computation* 11.5 (2015), págs. 2144-2155.

- [173] Michael C Wiener y Stephen H White. «Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. II. Distribution and packing of terminal methyl groups». En: *Biophysical journal* 61.2 (1992), págs. 428-433.
- [174] Thomas Williams y Colin Kelley. *GNUplot: an interactive plotting program*. 1998.
- [175] Thomas A Wilson, Craig M Meservey y Robert J Nicolosi. «Soy lecithin reduces plasma lipoprotein cholesterol and early atherogenesis in hypercholesterolemic monkeys and hamsters: beyond linoleate». En: *Atherosclerosis* 140.1 (1998), págs. 147-153.
- [176] Haruhiko Yao y col. «Time-resolved x-ray diffraction and calorimetric studies at low scan rates: II. On the fine structure of the phase transitions in hydrated dipalmitoylphosphatidylethanolamine». En: *Biophysical journal* 61.3 (1992), pág. 683.
- [177] Jan Zielkiewicz. «Structural properties of water: Comparison of the SPC, SPCE, TIP4P, and TIP5P models of water». En: *The Journal of chemical physics* 123.10 (2005), pág. 104501.