

UNIVERSIDAD EAFIT

TESIS DE PREGRADO

**Efecto de la distribución asimétrica del
colesterol en las propiedades estructurales
y elásticas de bicapas de DPPC : una
aproximación mediante dinámica
molecular**

Ator:
Laura María PULIDO
CIFUENTES

Asesor:
Dr. Luis Alejandro GÓMEZ
RAMÍREZ

*Trabajo de grado presentado como requisito
para el título de Bióloga*

2 de diciembre de 2020

UNIVERSIDAD EAFIT

Resumen

Efecto de la distribución asimétrica del colesterol en las propiedades estructurales y elásticas de bicapas de DPPC : una aproximación mediante dinámica molecular

por Laura María PULIDO CIFUENTES

En las bicapas biológicas los fosfolípidos están distribuidos asimétricamente entre ambas monocapas. Sin embargo, poco se conoce sobre el efecto de la asimetría en las propiedades estructurales y elásticas en las monocapas de bicapas con composición lipídica de relevancia biológica, debido a la dificultad de crear experimentalmente bicapas con asimetría transmembranal. Específicamente, aunque el efecto de la concentración del colesterol ha sido ampliamente estudiado experimentalmente y en simulaciones de dinámica molecular en bicapas simétricas de DPPC y colesterol, no se conoce el efecto de la concentración del colesterol cuando dicha molécula se encuentra en una de las monocapas de la bicapa. Por lo tanto, en este trabajo se utilizó la dinámica molecular para estudiar el efecto de la distribución asimétrica del colesterol en la organización estructural y las propiedades elásticas de bicapas asimétricas de DPPC y colesterol a 310.15 y 323 K mediante la comparación con sus contrapartes simétricas. De esta manera, los resultados permiten concluir que las propiedades estructurales y elásticas de las bicapas simétricas a ambas temperaturas, reproducen el comportamiento de bicapas de la misma composición reportado en estudios experimentales y mediante dinámica molecular, lo que permitió validar el campo de fuerza usado en este estudio. Adicionalmente, en el caso de las bicapas asimétricas, se observó un efecto indirecto del colesterol en las monocapas que no contiene colesterol y que a diferencia de las bicapas simétricas, ambas monocapas tienen una organización estructural y propiedades elásticas diferentes.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento hacia las personas que contribuyeron a mi desarrollo profesional durante los últimos cinco años. Especialmente, quiero agradecerle a el profesor Luis Alejandro por su valiosa guía durante el desarrollo de mi proyecto de grado y a la profesora Maria Eugenia Puerta por todo lo que me enseñó mientras participé en el semillero de investigación Biomat. También, quiero agradecer a la dirección de descubrimiento e investigación de la universidad EAFIT por apoyar formativa y economicamente mi formación como científica y a Juan David Pineda y Juan Diego Ocampo por su disponibilidad y amabilidad para enseñarme a usar los recursos computacionales sin los cuales no habría podido ejecutar mi proyecto de grado.

Finalmente, agradezco a mi familia por su apoyo incondicional.

Índice general

Resumen	III
Agradecimientos	V
1. Introducción	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Justificación	1
1.3. Objetivo general	2
1.4. Objetivos específicos	2
2. Marco teórico	3
2.1. Bicapas lipídicas e importancia fisiológica de la asimetría	3
2.2. Dinámica molecular	4
Preparación del sistema	7
Minimización	8
Asignación de velocidades	8
Equilibración	8
Producción	8
3. Metodología	11
3.1. Detalles computacionales	12
3.2. Área y volumen por lípido	13
3.3. Espesor	13
3.4. Parámetro de orden	14
3.5. Ángulos de inclinación	14
3.6. Densidad electrónica	15
3.7. Variación de las áreas por lípido y el número de lípidos en el eje z . . .	15
3.8. Propiedades elásticas	16
3.9. Promedio de bloques	16
4. Resultados	19
4.1. Efecto del colesterol en bicapas simétricas de DPPC y colesterol a 323 K	19
4.2. Efecto del colesterol en bicapas simétricas de DPPC y colesterol a 310.15 K	27
4.3. Efecto del colesterol en bicapas asimétricas de DPPC y colesterol a 323 K	33
4.4. Efecto del colesterol en bicapas asimétricas de DPPC y colesterol a 310.15 K	41
5. Conclusiones y trabajo futuro	49
Bibliografía	51

Índice de figuras

2.1. Esquema del avance en las posiciones, velocidades y aceleraciones del algoritmo Verlet y otros métodos derivados. Tomado de [22]	8
3.1. Estructura del fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)	11
3.2. Estructura del (3 β)-colest-5-en-3-ol (colesterol)	11
3.3. Vector P-N del DPPC	14
3.4. Vector C3-C17 del colesterol	15
3.5.	17
3.6.	17
4.1. Comparación del área por lípido y áreas por DPPC y colesterol a diferentes fracciones molares de colesterol usando el modelo de Edholm & Nagle (2005) y el método Voronoi.	20
4.2. Volumen por lípido a diferentes fracciones molares de colesterol.	20
4.3. Espesor de la bicapa a diferentes fracciones molares de colesterol.	21
4.4. Parámetro de orden para los carbonos de la cadena alifática del DPPC en la posición estereoespecífica $Sn1$ a diferentes fracciones molares de colesterol.	22
4.5. Parámetro de orden para los carbonos de la cadena alifática del DPPC en la posición estereoespecífica $Sn2$ a diferentes fracciones molares de colesterol.	22
4.6. Probabilidad $P(\theta)$ del ángulo entre el vector P-N de las moléculas de DPPC y el eje normal a la bicapa a diferentes fracciones molares de colesterol. El inserto corresponde a una molécula de DPPC donde el átomo naranja corresponde al fósforo y el átomo amarillo es el nitrógeno.	23
4.7. Probabilidad $P(\theta)$ del ángulo entre el vector C3-C17 de las moléculas de colesterol y el eje normal a la bicapa a diferentes fracciones molares de colesterol. El inserto corresponde a una molécula de colesterol donde los átomos azul oscuro son los átomos C3 y C17.	24
4.8. Densidad electrónica de las bicapas simétricas a diferentes fracciones molares de colesterol: A) bicapa y fase acuosa, B) grupo fosfato del DPPC, C) grupo colina del DPPC, D) anillos del colesterol, E) cola del colesterol, F) grupo hidroxilo del colesterol. Los insertos corresponden a los átomos cuya densidad electrónica se muestra en cada cuadro.	25
4.9. Áreas transversales del DPPC y colesterol, área libre y número de lípidos en función de la distancia al centro de la bicapa para diferentes fracciones molares de colesterol.	26
4.10. Módulo de compresibilidad del área a diferentes fracciones molares de colesterol.	27
4.11. Módulo de rigidez a diferentes fracciones molares de colesterol.	27

4.12. Comparación del área por lípido y áreas por DPPC y colesterol a diferentes fracciones molares de colesterol usando el modelo de Edholm & Nagle (2005) y el método Voronoi.	28
4.13. Espesor de la bicapa a diferentes fracciones molares de colesterol. Las barras de error indican la desviación estandar obtenida a partir del promedio de bloques.	28
4.14. Parámetro de orden para los carbonos de la cadena alifática del DPPC en la posición estereoespecífica <i>Sn1</i> a diferentes fracciones molares de colesterol.	29
4.15. Parámetro de orden para los carbonos de la cadena alifática del DPPC en la posición estereoespecífica <i>Sn2</i> a diferentes fracciones molares de colesterol.	29
4.16. Probabilidad $P(\theta)$ del ángulo entre el vector P-N de las moléculas de DPPC y el eje normal a la bicapa a diferentes fracciones molares de colesterol. El inserto corresponde a una molécula de DPPC donde el átomo naranja corresponde al fósforo y el átomo amarillo es el nitrógeno.	30
4.17. Probabilidad $P(\theta)$ del ángulo entre el vector C3-C17 de las moléculas de colesterol y el eje normal a la bicapa a diferentes fracciones molares de colesterol. El inserto corresponde a una molécula de colesterol donde los átomos azul oscuro son los átomos C3 y C17.	31
4.18. Densidad electrónica de las bicapas simétricas a diferentes fracciones molares de colesterol: A) bicapa y fase acuosa, B) grupo fosfato del DPPC, C) grupo colina del DPPC, D) anillos del colesterol, E) cola del colesterol, F) grupo hidroxilo del colesterol. Los insertos corresponden a los átomos cuya densidad electrónica se muestra en cada cuadro.	31
4.19. Áreas transversales del DPPC y colesterol, área libre y número de lípidos en función de las distancia al centro de la bicapa para diferentes fracciones molares de colesterol.	32
4.20. Módulo de compresibilidad del área a diferentes fracciones molares de colesterol.	33
4.21. Módulo de rigidez a diferentes fracciones molares de colesterol.	33
4.22. Área por lípido y áreas por DPPC y colesterol de las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol. Inf y Sup corresponden a las monocapas inferiores y superiores, respectivamente.	34
4.23. Espesor de la bicapa para las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol. Las barras de error representan la desviación estandar calculada mediante el promedio de bloques.	34
4.24. Parámetros de orden para las cadenas alifáticas del DPPC en las posiciones <i>Sn1</i> y <i>Sn2</i> de las bicapas simétricas y asimétricas. Cada línea corresponde al parámetro de orden para una monocapa de una bicapa simétrica o asimétrica a la fracción molar de colesterol que aparece en el medio de cada gráfica.	35
4.25. Parámetros de orden promedio para las bicapas simétricas y asimétricas: A) monocapas superiores de las bicapas simétricas, B) monocapa superior de las bicapas asimétricas, C) monocapa inferior de las bicapas asimétricas	36

4.26. Ángulo de inclinación del vector P-N del DPPC: El panel superior corresponde a las moléculas de DPPC en la monocapa superior y el panel inferior corresponde a las moléculas de DPPC en la monocapa inferior. El inserto en cada uno de los paneles corresponde a una molécula de DPPC donde el átomo naranja es el fósforo y el átomo amarillo es el nitrógeno. 37

4.27. Ángulo de inclinación del colesterol: El panel superior muestra la función de densidad de probabilidad y el panel inferior muestra los ángulos promedio con sus respectivas desviaciones estandar. 38

4.28. Densidad electrónica de las bicapas asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol: A) bicapa y fase acuosa, B) grupo fosfato del DPPC, C) grupo colina del DPPC, D) anillos del colesterol, E) cola del colesterol, F) grupo hidroxilo del colesterol. Los insertos corresponden a los átomos cuya densidad electrónica se muestra en cada cuadro. 39

4.29. Áreas transversales del DPPC y colesterol, área libre y número de lípidos en función de las distancia al centro de la bicapa para diferentes fracciones molares de colesterol en las bicapas asimétricas 40

4.30. Módulo de compresibilidad del área para las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol. 40

4.31. Módulo de rigidez para las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol. 41

4.32. Área por lípido y áreas por DPPC y colesterol de las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol. Inf y Sup corresponden a las monocapas inferiores y superiores, respectivamente. 41

4.33. Espesor de la bicapa de las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol. 42

4.34. Parámetros de orden promedio para las bicapas simétricas y asimétricas: A) monocapas superiores de las bicapas simétricas, B) monocapa superior de las bicapas asimétricas, C) monocapa inferior de las bicapas asimétricas. 43

4.35. Parámetros de orden para las bicapas simétricas y asimétricas: El panel de la A corresponde a las bicapas simétricas, el panel B es la monocapa superior de las bicapas asimétricas y el panel C es la monocapa inferior de las bicapas asimétricas. 44

4.36. Ángulo de inclinación del vector P-N del DPPC con respecto al eje normal a la bicapa: El panel superior corresponde a las moléculas de DPPC en la monocapa superior y el panel inferior corresponde a las moléculas de DPPC en la monocapa inferior. El inserto en cada uno de los paneles corresponde a una molécula de DPPC donde el átomo naranja es el fósforo y el átomo amarillo es el nitrógeno. 45

4.37. Ángulo de inclinación del colesterol con respecto al eje normal a la bicapa: El panel superior muestra la función de densidad de probabilidad y el panel inferior muestra los ángulos promedio con sus respectivas desviaciones estandar. 46

4.38. Densidad electrónica a diferentes fracciones molares de colesterol: A) bicapa y fase acuosa, B) grupo fosfato del DPPC, C) grupo colina del DPPC, D) anillos del colesterol, E) cola del colesterol, F) grupo hidroxilo del colesterol. Los insertos corresponden a los átomos cuya densidad electrónica se muestra en cada cuadro. 47

4.39. Áreas transversales del DPPC y colesterol, área libre y número de lípidos en función de la distancia al centro de la bicapa para diferentes fracciones molares de colesterol en las bicapas asimétricas a 310.15 K .	47
4.40. Módulo de compresibilidad del área para las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol.	48
4.41. Módulo de rigidez para las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol.	48

Índice de cuadros

- 3.1. Composición y temperatura de las bicapas simuladas. N_{DPPC} se refiere al número de moléculas de DPPC, $N_{colesterol}$ es el número de moléculas de colesterol y superior e inferior corresponde a las monocapas de la bicapa. 12
- 4.1. Valores experimentales y valores obtenidos en las simulaciones presentadas en este trabajo para bicapas puras de DPPC a 323 K. Los valores experimentales fueron tomados de [30]. 19

Lista de abreviaturas

DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfocolina
PC	Fosfatidilcolina
PS	Fosfatidilserina
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
SM	Esfingomiéline

Capítulo 1

Introducción

1.1. Planteamiento del problema

Hace aproximadamente cincuenta años se descubrió la naturaleza asimétrica de las membranas biológicas, ya que los lípidos zwitterionicos como la fosfatidilcolina (PC) se encuentran predominantemente en la monocapa orientada hacia el lado extracelular, mientras que la monocapa orientada hacia el citosol cuenta con mayor presencia de aminofosfolípidos como la fosfatidilserina (PE) [1]. Adicionalmente, se ha demostrado que la asimetría es vital para varios procesos bioquímicos, como la apoptosis, fagocitosis y trombosis [2]-[4]. Sin embargo, la creación de membranas artificiales con composiciones asimétricas y la posibilidad de estudiar sus propiedades biofísicas en condiciones controladas, no sucedió sino hasta 2003, cuando fue propuesto el método de transferencia de fase, el cual permite crear vesículas asimétricas sin que sus propiedades mecánicas sean alteradas por el procedimiento de preparación [5], [6]. No obstante, aunque a la fecha se han propuesto mejoras para dicho método y han surgido otros protocolos alternativos, la cantidad de datos experimentales para bicapas asimétricas es poca comparada con la disponibilidad de información para bicapas simétricas [5]. Además, aunque se han publicado algunos estudios de dinámica molecular de bicapas asimétricas multicomponentes, donde se incluyen simulaciones a una concentración de colesterol, no se sabe cuál es el efecto del colesterol en bicapas asimétricas de DPPC a diferentes concentraciones de colesterol [7]-[9]. Por lo tanto, este trabajo pretende contribuir al conocimiento sobre el efecto de la asimetría y el colesterol en las propiedades estructurales y mecánicas de bicapas de DPPC y colesterol

1.2. Justificación

Uno de los objetivos claves de la investigación en ciencias biológicas, es entender las consecuencias funcionales de la estructura, dinámica e interacciones de las macromoléculas biológicas. Por lo tanto, mientras los experimentalistas enfrentan el desafío de caracterizar las propiedades termodinámicas y cinéticas de las macromoléculas en ambientes complejos, las simulaciones computacionales ayudan a entender los datos experimentales, así como a diseñar y predecir los resultados de futuros experimentos [10]. Por lo tanto, teniendo en cuenta el incremento en la capacidad de cómputo durante los últimos años, la dinámica molecular es una excelente alternativa para estudiar las propiedades estructurales y dinámicas de moléculas biológicas y las estructuras que estas forman, como por ejemplo, las bicapas lipídicas, ya este

método permite obtener una descripción complementaria a los resultados experimentales sobre las interacciones moleculares, debido a que proporciona la posibilidad de estudiar las características estructurales y dinámicas a escalas temporales y espaciales difíciles de acceder experimentalmente.

En sintonía con el objetivo de generar modelos de bicapas lipídicas cada vez más cercanos a las bicapas biológicas, es relevante estudiar las propiedades biofísicas de bicapas asimétricas, es decir, con una distribución desigual de diferentes tipos de lípidos entre ambas monocapas, ya que este tipo de organización estructural está involucrado en varios procesos celulares importantes. Además, teniendo en cuenta que la fosfatidilcolina corresponde a más del 50% de los fosfolípidos de las membranas eucariotas y que el colesterol además de ser el esteroide más común en la membrana celular afecta las propiedades mecánicas y termodinámicas de las bicapas lipídicas, es importante estudiar el efecto de la distribución asimétrica del colesterol en el comportamiento biofísico de las bicapas de DPPC, ya que hay evidencia de que el colesterol se distribuye predominantemente en la monocapa orientada hacia el citosol de la membrana plasmática sináptica y que la fosfatidilcolina (PC) se encuentra principalmente en la monocapa orientada hacia el lado extracelular de la membrana celular [1], [11]. Además, una de las ventajas de estudiar el efecto de la asimetría en bicapas binarias de DPPC/colesterol, es que las bicapas simétricas de DPPC/colesterol han sido ampliamente estudiadas a nivel experimental y en simulaciones de dinámica molecular, por lo que hay disponibilidad de información para evaluar la capacidad del campo de fuerza para reproducir las características estructurales y mecánicas de las bicapas observadas a nivel experimental.

1.3. Objetivo general

Determinar el efecto de la distribución asimétrica del colesterol sobre las propiedades estructurales y elásticas de bicapas DPPC mediante dinámica molecular

1.4. Objetivos específicos

1. Comparar las propiedades elásticas y estructurales de bicapas simétricas de DPPC y colesterol a 323 K con resultados experimentales y simulaciones previas
2. Comparar las propiedades elásticas y estructurales de bicapas asimétricas y simétricas de DPPC y colesterol a 323 K
3. Comparar las propiedades elásticas y estructurales de bicapas asimétricas y simétricas de DPPC y colesterol a 310.15 K

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. Bicapas lipídicas e importancia fisiológica de la asimetría

Las bicapas lipídicas están conformadas por lípidos anfipáticos, es decir, que están conformados por una región polar y una región hidrofóbica [12]. De esta manera, la tendencia de la región polar a interactuar con el ambiente acuoso y la propensión de las regiones hidrofóbicas a interactuar entre ellas y evadir la interacción energéticamente poco favorable con el agua, es el principio físico de la formación espontánea de las membranas [12]. Por lo tanto, estas características químicas de los lípidos permiten a las células separar sus componentes internos del ambiente y en las células eucariotas este principio es replicado en el interior de la célula para producir organelas [12].

La organización asimétrica de los fosfolípidos en la membrana celular de los eritrocitos, ha sido ampliamente estudiada desde la 1972, por lo tanto, se sabe que la fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilinositol (PI) residen principalmente en la monocapa orientada hacia el citosol, mientras que la fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (SM) predominan en la monocapa orientada hacia el lado extracelular [1]. Adicionalmente, se sabe que la asimetría no está restringida solamente a los grupos polares de los fosfolípidos, sino también las regiones hidrofóbicas, ya que la PS y la PE tienen en promedio más insaturaciones en sus cadenas hidrocarbonadas que la PC y la SM [13].

Por varios años, el origen de la asimetría fue asociado a las diferencias entre los ambientes intracelular y extracelular. De esta manera, teniendo en cuenta que la difusión transversal de los fosfolípidos es un proceso lento, la asimetría era considerada una consecuencia de la biogénesis asimétrica de los componentes lipídicos de la membrana, así como la presencia de gradientes de pH y/o potencial a través de la membrana [14]. Sin embargo, en 1984 se demostró que la predominancia de aminofosfolípidos en la monocapa orientada hacia el citosol, está mediada por la actividad flipasa de la P4-ATPasa, que transporta este tipo de lípidos desde la monocapa orientada hacia el lado extracelular a la monocapa citosólica mediante la hidrólisis de ATP [15]. Posteriormente, se descubrió que las PC de la monocapa citosólica de los eritrocitos, es transportada hacia la monocapa exoplásmica debido a la actividad flopasa de un transportador ABC [16]. Aunque las flipasas y las flopasas están involucradas en la generación de la asimetría transmembranal de los fosfolípidos, también se sabe de la existencia de otros tipos de proteínas, conocidas como escramblasas, que promueven el transporte bidireccional y no específico de fosfolípidos disipando la asimetría, mediante un mecanismo que depende de los niveles intracelulares de calcio [15].

Teniendo en cuenta que las células usan ATP para generar y matener la asimetría transmembranal de los fosfolípidos, tiene sentido pensar que la asimetría tiene un rol biológico. Dentro de los roles propuestos en la literatura, se encuentran la exocitosis, endocitosis y reconocimiento celular. La exocitosis es un proceso celular en el que la membrana de una vesícula secretora o de una organela se fusiona con la membrana celular, involucrando la interacción entre los lípidos de ambas membranas [16]. En el caso de la fosfatidilcolina, este tipo de interacciones no son energéticamente favorables, debido a la gruesa capa de agua que rodea el grupo polar de la fosfatidilcolina, imponiendo una separación entre las membranas de aproximadamente 30 Å, mientras que la interacción entre bicapas de PS y PE es más favorable, ya que la separación impuesta por el agua es de alrededor 15 Å [16]. Por lo tanto, teniendo en cuenta que PS y PE predominan en la monocapa citosólica de la membrana celular, esta se podría fusionar fácilmente con vesículas intracelular que contengan aminofosfolípidos en su superficie [16]. Por otra parte, la distribución asimétrica de los fosfolípidos puede generar curvaturas en la membrana debido a las diferencias en área de ambas monocapas, favoreciendo la formación de vesículas a partir de una membrana mediante el proceso de endocitosis. Además, se ha demostrado la participación de las proteínas aminofosfolípido translocasas en este proceso, ya que experimentos realizados en membranas de levadura, han mostrado que la endocitosis es inhibida si se inhibe la actividad de estas proteínas [16].

Adicionalmente, los lípidos pueden influenciar la interacción entre membranas interactuando con proteínas involucradas en el reconocimiento célula-célula, por ejemplo, la exposición de PS en la monocapa exoplásmica de las plaquetas, estimula la actividad de la protrombinasa, la cual convierte la protrombina en trombina durante la coagulación sanguínea [15]. No obstante, en otros tipos de células la externalización de PS en la superficie celular, le permite a los macrófagos reconocer las células apoptóticas [17].

2.2. Dinámica molecular

La dinámica molecular es un método computacional para investigar las propiedades estructurales, dinámicas y termodinámicas de un sistema, mediante la generación de una trayectoria que describe la evolución del sistema en el tiempo, resolviendo numéricamente las ecuaciones del movimiento para los átomos que conforman el sistema estudiado [18].

La ecuación del movimiento para un sistema de N partículas que interactúan con un potencial $U(\mathbf{r}_i)$, $i = 1, \dots, N$, se puede formular como una ecuación diferencial de segundo orden como se muestra en la ecuación 2.1 :

$$\mathbf{F}_i = m_i * \ddot{\mathbf{r}}_i \quad (2.1)$$

Para calcular las fuerzas que actúan sobre cada átomo en el tiempo t , la dinámica molecular utiliza un campo de fuerzas, que es una función de energía potencial parametrizada con datos experimentales y datos de simulaciones de mecánica cuántica. El campo de fuerza charmm36, al igual que la mayoría de campos de fuerza utilizados en dinámica molecular de membranas y macromoléculas, tiene la siguiente forma general, donde $V(\mathbf{r})$ denota la energía potencial en función de las posiciones \mathbf{r} de los átomos:

$$\begin{aligned}
V(\mathbf{r}) = & \sum_{\text{enlaces}} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{ngulos}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \\
& \sum_{\text{dihedrales}} \left[\sum_j K_{\varphi,j}(1 + \cos(n_j\varphi - \delta_j)) \right] + \\
& \sum_{\text{vdw } i,j} \varepsilon_{i,j} \left[\left(\frac{R_{\text{min},ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{\text{min},ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \\
& \sum_{\text{Coulumb } i,j} \frac{q_i q_j}{\varepsilon_D r_{ij}}
\end{aligned}$$

Los primeros tres términos representan las interacciones de átomos covalentemente unidos y son comúnmente denominados como términos intramoleculares, mientras que los últimos dos términos son denominados términos intermoleculares y describen las interacciones van der waals y electrostáticas entre los átomos, respectivamente [19].

El término de enlace, hace referencia a la deformación de un enlace representado con un potencial armónico, donde K_b es la constante de fuerza, b_0 es la longitud referencia y b es la longitud del enlace [20]. El potencial armónico es una buena representación de la energía del sistema cuando la desviación de la longitud del enlace respecto al valor de referencia es pequeña (0.1 Å o menos), de otro modo, el potencial de Morse (ecuación 2.2) es más adecuado para representar la deformación del enlace.

$$V(d) = D_e * 1 - \exp[-a(d - d_0)]^2 \quad (2.2)$$

En el potencial Morse, D_e es el valor mínimo de la función de potencial, a está relacionada con la constante de fuerza K_b y b_0 es la longitud referencia [21].

El segundo término, hace referencia al cambio en la energía potencial ante la deformación del ángulo entre dos enlaces, que es gobernado por la hibridación de los orbitales alrededor de los átomos y se representa como un potencial armónico con dos parámetros, donde K_θ es la constante de fuerza y θ_0 es el valor de referencia [21].

El tercer término, que también es conocido como el término torsional, representa la energía potencial del sistema en función de la rotación alrededor de cada ángulo dihedral. Este término incluye los átomos que están separados por tres enlaces y por lo tanto están en una relación topológica 1-4 [20]. Debido a su periodicidad intrínseca, las torsiones se representan como una expansión de series de cosenos, donde $K_{\varphi,j}$ es la constante de fuerza, n es la multiplicidad (el número de puntos mínimos en la función cuando se rota 360 grados), δ es la fase (el mínimo energético) y j puede tomar valores de 1 a 6 [20].

Por otra parte, las interacciones intermoleculares son calculadas en pares de átomos separados por tres o más enlaces y entre átomos de diferentes moléculas [20]. De esta forma, el componente Van der Waals, también conocido como el potencial Lennard-Jones 12-6, contiene una contribución atractiva y otra repulsiva. El origen físico de la primera, yace en las fuerzas de dispersión generadas entre dipolos instantáneos, que se originan a partir de las fluctuaciones en la distribución de la carga eléctrica en la moléculas, mientras que el principio de exclusión de Pauli explica el término de repulsión, ya que debajo de una distancia umbral los átomos se repelen. De esta manera, $R_{\text{min},ij}$ es la distancia entre los átomos i,j donde el potencial es cero y $\varepsilon_{i,j}$ es el potencial mínimo [20].

Respecto al último término que forma parte de las interacciones intermoleculares, el potencial Coulumb describe las interacciones iónicas entre átomos completa o parcialmente cargados, donde q_i y q_j son las cargas parciales atómicas y ϵ_D es la constante dieléctrica del medio [21].

Una vez se tiene una función de potencial parametrizada para describir la interacción entre cada par de átomos en el sistema, se calcula la fuerza total para cada átomo del sistema en el tiempo t como el vector suma de sus interacciones con otros átomos [21]. Después, a partir de la fuerza se puede calcular la aceleración de los átomos, que combinado con las posiciones y velocidades en el tiempo t , permite calcular las posiciones y velocidades en el tiempo $t + \delta t$ [21].

Todos los algoritmos usados para integrar las ecuaciones del movimiento, asumen que las posiciones y propiedades dinámicas (velocidades, aceleraciones, ect) pueden ser aproximadas como series de Taylor de la siguiente forma:

$$\mathbf{r}(t+\delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t\mathbf{v}(t) + \frac{1}{2}\delta t^2\mathbf{a}(t) + \frac{1}{6}\delta t^3\mathbf{b}(t) + \frac{1}{24}\delta t^4\mathbf{c}(t) + \dots$$

$$\mathbf{v}(t + \delta t) = \mathbf{v}(t) + \delta t\mathbf{a}(t) + \frac{1}{2}\delta t^2\mathbf{b}(t) + \frac{1}{6}\delta t^3\mathbf{c}(t) + \dots$$

$$\mathbf{a}(t+\delta t) = \mathbf{a}(t) + \delta t\mathbf{b}(t) + \frac{1}{2}\delta t^2\mathbf{c}(t) + \dots$$

$$\mathbf{b}(t+\delta t) = \mathbf{b}(t) + \delta t\mathbf{c}(t) + \dots$$

Donde \mathbf{v} es la velocidad (primera derivada de las posiciones con respecto al tiempo), \mathbf{a} es la aceleración(segunda derivada), \mathbf{b} es la tercera derivada y así sucesivamente [21].

El algoritmo verlet, es uno de los métodos más usados para integrar las ecuaciones del movimiento en simulaciones de dinámica molecular [21]. Este algoritmo, usa las posiciones y aceleraciones en el tiempo t y las posiciones del paso previo $\mathbf{r}(t - \delta t)$ para calcular las posiciones en el tiempo $t + \delta t$, $\mathbf{r}(t + \delta t)$ (ver figura 2.1) . Por lo tanto, podemos representar las relaciones entre esas cantidades y las velocidades en el tiempo t con las ecuaciones 2.3 y 2.4

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t\mathbf{v}(t) + \frac{1}{2}\delta t^2\mathbf{a}(t) + \dots \quad (2.3)$$

$$\mathbf{r}(t - \delta t) = \mathbf{r}(t) - \delta t\mathbf{v}(t) + \frac{1}{2}\delta t^2\mathbf{a}(t) + \dots \quad (2.4)$$

De esta manera, sumando las ecuaciones 2.3 y 2.4, obtenemos la fórmula de Verlet (ecuación 2.5) para calcular las posiciones en el tiempo $t + \delta t$

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \delta t) + \delta t^2\mathbf{a}(t) \quad (2.5)$$

Adicionalmente, se han desarrollado otros algoritmos derivados de la ecuación verlet, uno de ellos es salto de rana (del inglés leap frog), el cuál calcula las velocidades de forma explícita usando las ecuaciones 2.6 y 2.7:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t\mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) \quad (2.6)$$

$$\mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) = \mathbf{v}(t - \frac{1}{2}\delta t) + t\mathbf{a}(t) \quad (2.7)$$

Para implementar el algoritmo salto de rana (ver figura 2.1), las velocidades $\mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\delta t)$ son calculadas a partir de las velocidades en el tiempo $t - \frac{1}{2}\delta t$ y las aceleraciones en el tiempo t [21]. Posteriormente, las posiciones $\mathbf{r}(t + \delta t)$ son calculadas a partir de las velocidades $\mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\delta t)$ y las posiciones en el tiempo $r(t)$ usando la ecuación 2.8:

$$\mathbf{t} = \frac{1}{2}[\mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) + \mathbf{v}(t - \frac{1}{2}\delta t)] \quad (2.8)$$

Otro integrador derivado del algoritmo verlet, es el método velocidad verlet, el cual calcula las posiciones, velocidades y aceleraciones al mismo tiempo usando las ecuaciones 2.9 y 2.10:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r} + \delta t\mathbf{r} + \frac{1}{2}\delta t\mathbf{a}(t) \quad (2.9)$$

$$\mathbf{v}(t + \delta t) = \mathbf{t} + \frac{1}{2}\delta t[\mathbf{a}(t + \delta t)] \quad (2.10)$$

El algoritmo velocidad verlet es implementado en tres pasos, ya que para calcular las velocidades se requieren las aceleraciones en los tiempos t y $t + \delta t$ (ver figura 2.1) [22]. Por lo tanto, en el primer paso las posiciones en el tiempo $t + \delta t$ son calculadas de acuerdo a la ecuación 12 y luego las velocidades en el tiempo $t + \frac{1}{2}\delta t$ son calculadas usando la ecuación 2.11

$$\mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) = \mathbf{t} + \frac{1}{2}\delta t\mathbf{a}(t) \quad (2.11)$$

Posteriormente, las fuerzas son computadas a partir de las posiciones actuales, obteniendo $\mathbf{a}(t + \delta t)$ y en el paso final se calculan las velocidades en el tiempo $t + \delta t$ usando la ecuación 2.12

$$\mathbf{v}(t + \delta t) = \mathbf{v}(t + \frac{1}{2}\delta t) + \frac{1}{2}\delta t\mathbf{a}(t + \delta t) \quad (2.12)$$

El cómputo de las fuerzas entre los átomos del sistema y la generación de una trayectoria con las posiciones de los átomos en tiempos discretos durante el tiempo de simulación, es la parte central en la implementación de simulaciones por dinámica molecular, pero no es lo único que se necesita ejecutarla. A continuación se presentan los pasos que se deben seguir para ejecutar exitosamente una simulación mediante dinámica molecular [18].

Preparación del sistema

En el caso de las bicapas lipídicas, se debe determinar el número de lípidos y el número de moléculas de agua por lípido del sistema de acuerdo a la pregunta de investigación planteada. Posteriormente, el sistema debe ser ensamblado en una configuración inicial que se asemeje a la estructura en equilibrio del sistema en el estado termodinámico de interés [18]. Para lograr este objetivo, existen una serie de paquetes computacionales para obtener la topología inicial de una bicapa, uno de ellos es CHARMM-GUI, el cuál proporciona los archivos de entrada para los software más utilizados en dinámica molecular, como GROMACS, NAMD, AMBER, OpenMM y CHARMM MD [23].

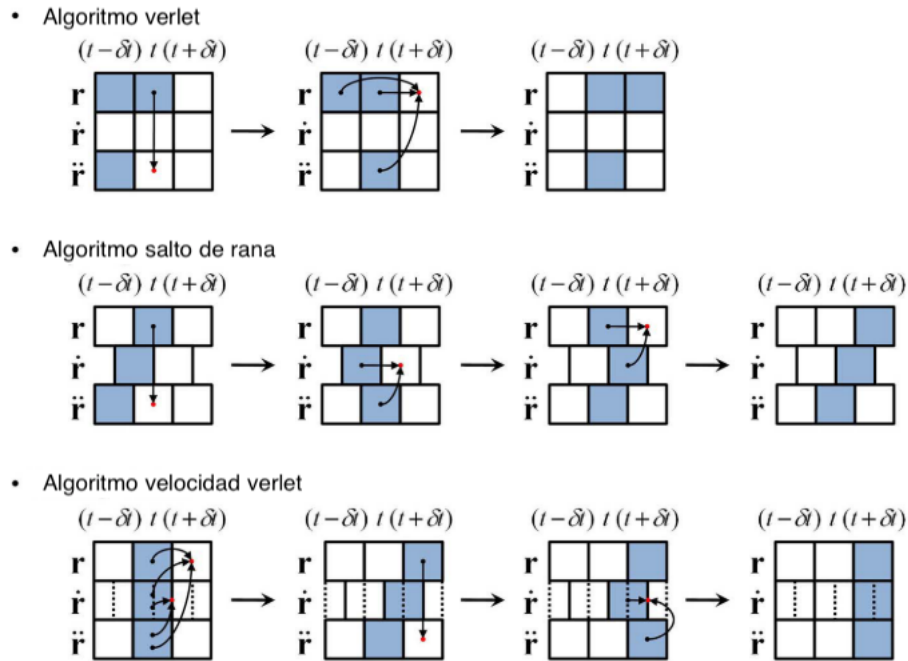


FIGURA 2.1: Esquema del avance en las posiciones, velocidades y aceleraciones del algoritmo Verlet y otros métodos derivados. Tomado de [22]

Minimización

Después de obtener la estructura inicial, se debe encontrar un mínimo global en la superficie de energía potencial, con el fin de garantizar una configuración estable y evitar que se produzcan fuerzas muy grandes sobre los átomos que conlleven a que los átomos se muevan distancias irrazonables en un solo paso de tiempo [18].

Asignación de velocidades

Teniendo en cuenta que la minimización solo proporciona las posiciones correspondientes a la estructura en un mínimo global, es necesario asignar las velocidades iniciales correspondientes para poder resolver las ecuaciones del movimiento [18]. Esto se logra asignando velocidades iniciales a los átomos de forma que correspondan a la distribución Maxwell-Boltzman en la temperatura deseada [18].

Equilibración

Teniendo en cuenta que el objetivo de la dinámica molecular es simular el sistema en un ensamble termodinámico particular, la equilibración se realiza para llevar el sistema a las condiciones de temperatura, presión y energía en las que se quiere realizar la simulación, además de garantizar que el sistema esté lo suficientemente relajado de forma que las propiedades que se midan correspondan a las configuraciones más probables en el ensamble de interés sin que exista ningún sesgo ocasionado por las condiciones iniciales [18].

Producción

Una vez la equilibración se ha completado, la producción consiste en la recolección y análisis de datos. En este paso se computan las variables observables y se

calcula la incertidumbre asociada a las variables evaluadas. De esta manera, una de las consideraciones clave es obtener estimaciones de las propiedades que converjan durante la simulación, es decir, que para analizar correctamente el comportamiento del sistema estudiado, las propiedades o variables evaluadas deben fluctuar alrededor de un valor medio [18]

Capítulo 3

Metdología

Para lograr los objetivos planteados en este trabajo, se simularon mediante dinámica molecular bicapas simétricas y asimétricas de DPPC (ver figura 3.1) y colesterol (ver figura 3.2) a diferentes concentraciones de colesterol y a dos temperaturas como se muestra en el cuadro 3.1. Tendiendo en cuenta lo anterior, es importante aclarar que los conceptos de simetría y asimetría utilizados en este trabajo, se refieren al número de moléculas de DPPC y colesterol que conforman cada monocapa de la bicapa. Por lo tanto, si las monocapas tienen igual número de moléculas de DPPC y colesterol, la bicapa es simétrica, de lo contrario es asimétrica.

Adicionalmente, la elección de las temperaturas de simulación, se debe a que las propiedades estructurales de bicapas simétricas de DPPC y colesterol a 323 K, han sido ampliamente descritas mediante estudios experimentales y simulaciones mediante dinámica molecular, por lo tanto, se realizaron simulaciones simétricas a dicha temperatura para validar los campos de fuerza y los parámetros de simulación. Por otra parte, se realizaron simulaciones de bicapas de simétricas y asimétricas a 310.15 K ya que corresponde a la temperatura fisiológica.

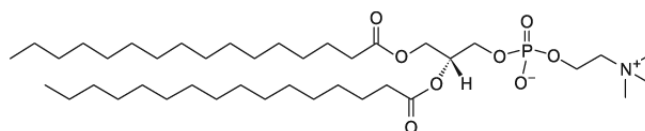


FIGURA 3.1: Estructura del fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)

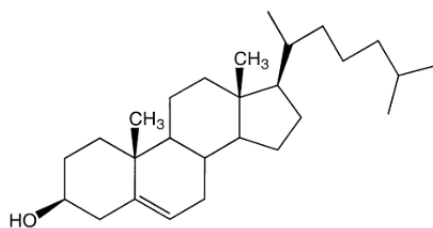


FIGURA 3.2: Estructura del (3 β)-colest-5-en-3-ol (colesterol)

CUADRO 3.1: Composición y temperatura de las bicapas simuladas. N_{DPPC} se refiere al número de moléculas de DPPC, $N_{colesterol}$ es el número de moléculas de colesterol y superior e inferior corresponde a las monocapas de la bicapa.

% colesterol	Tipo de bicapa	Temperatura (K)	N_{DPPC} superior	N_{DPPC} inferior	$N_{colesterol}$ superior	$N_{colesterol}$ inferior
0	simétrica	310.15	150	150	0	0
0	simétrica	323	150	150	0	0
6	simétrica	310.15	141	141	9	9
6	asimétrica	310.15	150	132	0	18
10	simétrica	310.15	135	135	15	15
10	asimétrica	310.15	150	120	0	30
10	simétrica	323	135	135	15	15
10	asimétrica	323	150	120	0	30
20	simétrica	310.15	120	120	30	30
20	asimétrica	310.15	150	90	0	60
20	simétrica	323	120	120	30	30
20	asimétrica	323	150	90	0	60
30	simétrica	310.15	105	105	45	45
30	asimétrica	310.15	150	60	0	90
30	simétrica	323	105	105	45	45
30	asimétrica	323	150	60	0	90
40	simétrica	310.15	90	90	60	60
40	asimétrica	310.15	150	30	0	120
40	simétrica	323	90	90	60	60
40	asimétrica	323	150	30	0	120
50	simétrica	310.15	75	75	75	75
50	simétrica	323	75	75	75	75

3.1. Detalles computacionales

En todas las simulaciones se utilizó el campo de fuerza CHARMM-36 para representar las interacciones entre los lípidos y el campo de fuerza TIP3P para representar las moléculas de agua, los cuales han sido ampliamente usados en simulaciones por dinámica molecular de bicapas lipídicas y reproducen razonablemente bien el comportamiento biofísico reportado experimentalmente [24].

La configuración inicial de todas las bicapas simuladas fue obtenida a partir de la plataforma CHARMM-GUI, donde el número de lípidos de cada bicapa fue seleccionado de forma que todas las bicapas tengan en total 300 lípidos y 40 moléculas de agua por lípido, ya que simulaciones realizadas anteriormente por integrantes del grupo CIBIOP, han indicado que dichos parámetros son los que mejor reproducen las propiedades estructurales y mecánicas de bicapas lipídicas [23]. Posteriormente, se utilizó la plataforma CHARMM-GUI para obtener los archivos de entrada del software GROMACS, el cual se utilizó para ejecutar las simulaciones [25]. De esta manera, el protocolo y los parámetros empleados en las simulaciones fueron los siguientes: La configuración inicial fue minimizada utilizando 5000 pasos del algoritmo de máxima pendiente (del inglés steepest descent), seguido por seis ciclos de equilibración, simulando un ensamble NVT durante los primeros dos ciclos y un ensamble NPT para los ciclos restantes. Finalmente, durante la producción se simuló un ensamble NPT utilizando el termostato Nose-Hoover y el barostato Parrinello-Rahman con un escalamiento semi-isotrópico a una presión de 1 bar. Además, las simulaciones se llevaron a cabo bajo condiciones de frontera periódicas, se usó la malla de partículas Ewald para los cálculos de las interacciones electrostáticas y 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 en la equilibración como en la producción se usó el integrador salto de rana (del inglés leap-frog), se utilizó δt de 2 fs y en total se simularon 100 ns de equilibración y 300 ns de producción.

A continuación se describe las metodologías utilizadas para calcular las variables asociadas a la organización estructural y propiedades elásticas de las bicapas.

3.2. Área y volumen por lípido

La mayoría de las simulaciones de bicapas lipídicas mediante dinámica molecular utilizan ensamblajes NPT, lo que permite la fluctuación de las dimensiones de la caja durante la simulación [26]. Por esta razón, el área por lípido instantánea $A_I(t)$ de bicapas puras, puede calcularse como el área de la caja de simulación (correspondiente al plano xy) dividida por el número de lípidos por monocapa. Sin embargo, este método no es adecuado para calcular el área por lípido de bicapas compuestas por más de un tipo de lípido [26]. Específicamente, para calcular el área por lípido de bicapas compuestas por DPPC y colesterol existen dos métodos ampliamente usados, los cuales fueron implementados en este trabajo. El primero, propone que el área parcial del colesterol $a_{colesterol(x)}$ y el área parcial del DPPC $a_{DPPC(x)}$ para la fracción molar x de colesterol, puede calcularse a partir del área de la caja de simulación $A(x)$ y el número de DPPC por monocapa N_{DPPC} usando la ecuación 3.1:

$$\frac{A(x)}{N_{DPPC}} = a_{DPPC(x)} + \frac{x}{1-x} * a_{chol(x)} \quad (3.1)$$

De esta manera, Edholm y Nagle (2005) sugieren graficar $A(x)/N_{DPPC}$ vs $x/(1-x)$ y obtener $a_{colesterol(x)}$ como la pendiente de la tangente en x y $a_{DPPC(x)}$ como el intercepto de la tangente en $x=0$ [27].

Adicionalmente, Edholm y Nagle (2005) propusieron un método similar para calcular el volumen del DPPC V_{DPPC} y el volumen del colesterol $V_{colesterol}$ a partir del volumen por lípido $V(x)$ como se muestra en la ecuación 3.2, donde V_{caja} es el volumen de la caja, V_{agua} el volumen de una molécula de agua, N_{agua} es el número total de moléculas de agua, N_{DPPC} es el número de moléculas de DPPC por monocapa y $N_{colesterol}$ es el número de moléculas de colesterol por monocapa [27], [28].

$$V(x) = \frac{V_{caja} - N_{agua} * V_{agua}(T)}{2 * (N_{DPPC} + N_{chol})} \quad (3.2)$$

Aunque el modelo propuesto por Edholm Nagle (2005) para calcular las áreas parciales específicas del DPPC y colesterol ha resultado bastante útil para calcular dichas propiedades en sistemas simétricos, su utilidad no se puede extender hasta los sistemas asimétricos, ya que uno de los supuestos del modelo es que cada monocapa tiene igual número de moléculas para cada tipo de lípido. Por este motivo, las áreas por lípido también fueron calculadas usando el método voronoi, donde el área por DPPC $a_{DPPC(x)}$ es calculada usando las coordenadas xy de los átomos de fósforo y el área por colesterol $a_{colesterol(x)}$ tiene en cuenta las coordenadas del átomo O3, que es el oxígeno correspondiente al grupo hidroxilo del colesterol. De esta manera, el algoritmo voroni genera un polígono alrededor de los átomos seleccionados, y el área por lípido es el área del polígono [28].

3.3. Espesor

El espesor de la membrana es uno de los parámetros más importantes para determinar la organización estructural de la misma. No obstante, existen varias definiciones de este parámetro dependiendo de la técnica experimental usada para medirlo

y del fenómeno físico de interés. Por ejemplo, el grosor estimado por dispersión de rayos x, hace referencia a la distancia entre los átomos de fósforo de ambas monocapas (D_{HH}), la cual puede ser calculada mediante el perfil de densidad electrónica, mientras que la dispersión de neutrones al generar un alto contraste entre los lípidos protonados y el agua deuterada, permite calcular el grosor total de la bicapa (D_B) definido por Luzzati como la distancia entre los puntos del eje z de la membrana donde la densidad del agua decae a la mitad de su valor en la fase acuosa [26]. En este trabajo, el concepto de espesor hace referencia a el D_B , el cuál fue caculado como se muestra en la ecuación 3.3, donde V_{caja} es el volumen de la caja de simulación, $V_{agua}(T)$ es el volumen de una molécula de agua a la temperatura T, N_{agua} es el número total de moléculas de agua y A_{caja} es el área de la caja de simulación.

$$D_B = \frac{V_{caja} - N_{agua} * V_{agua}(T)}{A_{caja}} \quad (3.3)$$

3.4. Parámetro de orden

El parámetro de orden S_{CD} representa la orientación de los enlaces C-H con respecto al eje normal a la bicapa, y se puede calcular usando la ecuación 3.4, donde θ representa el ángulo entre el enlace CH y el eje normal a la bicapa y es calculado para cada carbono de cada cadena hidrófoba del DPPC. En este trabajo, este parámetro fue calculad usando el software [29].

$$S_{cd} = \frac{1}{2} \langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle \quad (3.4)$$

3.5. Ángulos de inclinación

Además del parámetro de orden descrito anteriormente, el análisis del los ángulos de inclinación del vector formado por los átomos de fósforo y nitrógeno del grupo polar del DPPC respecto al eje normal a la bicapa, resulta especialmente util para analizar la orientación del grupo polar del DPPC, el cuál participa en interacciones electrostáticas con el agua así como con otros lípidos [26]. En la figura 3.3 se muestra una molécula de DPPC donde el átomo color naranja es el fósforo y el átomo amarillo es el nitrógeno.

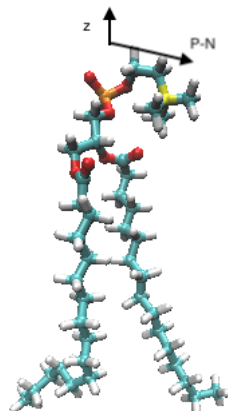


FIGURA 3.3: Vector P-N del DPPC

De igual forma, se puede utilizar el vector correspondiente a los átomos C3 y C17 del colesterol (ver figura 3.4) para evaluar la alineación del colesterol con respecto al eje normal a la bicapa. Además, algunos estudios han demostrado que esta propiedad está estrechamente relacionada con el efecto de condensación del colesterol en las bicapas lipídicas.

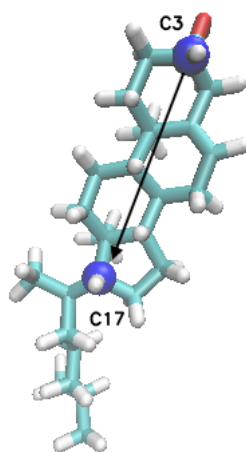


FIGURA 3.4: Vector C3-C17 del colesterol

Estas propiedades fueron calculadas molécula de DPPC o colesterol en cada paso de la trayectoria mediante un script en python utilizando la librería MDAnalysis. En cada paso de la trayectoria se calculó el ángulo promedio y después se utilizó la metodología de promedio por bloques para calcular la desviación estandar.

3.6. Densidad electrónica

Esta propiedad fue calculada usando la herramienta gmx density del software GROMACS, la cual calcula la distribución promedio de electrones a través del eje normal a la bicapa. Para lograr este objetivo, en cada paso de la trayectoria, el eje z se divide en 500 partes y se calcula el número de electrones para cada división.

3.7. Variación de las áreas por lípido y el número de lípidos en el eje z

Con el objetivo de entender el efecto del colesterol a escala atómica, se implementó el método sugerido por Altawarah (2010) para calcular las áreas por DPPC y colesterol, así como el área libre y el número de lípidos en diferentes regiones del eje z. Este método consta en dividir el eje z en intervalos de 0.1 nm y en cada subdivisión se calcula el área correspondiente a cada átomo de la subdivisión usando el radio van der Waals, el cual corresponde al parámetro sigma del potencial Lennard Jones del campo de fuerzas charmm36 (para el DPPC y colesterol) o TIP3 (para el agua). De esta manera, se puede calcular la contribución en el área por parte del DPPC, colesterol y agua a través del eje z, sumando las áreas de los átomos correspondientes a cada molécula en cada intervalo.

Adicionalmente, se utilizó este método para calcular el área libre en el eje z, la cual se calculó como la diferencia entre el área de la caja y el área ocupada por el DPPC, colesterol o agua en cada subintervalo del eje z.

3.8. Propiedades elásticas

El módulo de compresibilidad se obtuvo mediante las fluctuaciones en el área por lípido apl en nm^2 usando la ecuación 3.8, donde T es la temperatura en kelvin, k_B es la constante de Boltzman y $\sigma^2(a)$ es el desplazamiento cuadrático medio del área por lípido.

$$K_A = \frac{2\langle apl \rangle T k_B}{\sigma^2(apl)}$$

Por otra parte, el módulo de rigidez se calculó a partir de los valores obtenidos para el K_A y el espesor de la bicapa D_B usando la ecuación 3.8.

$$K_C = \frac{K_A}{24} * (D_B - 1)^2$$

3.9. Promedio de bloques

Con el objetivo de cuantificar la incertidumbre asociada al espesor de la bicapa, el parámetro de orden, los ángulos de inclinación y área por lípido calculada por el método Voronoi, se realizó un promedio de bloques mediante el software LOOS a partir de la información obtenida para dichas variables en cada simulación. La necesidad de implementar el promedio de bloques en el análisis estadístico de simulaciones de dinámica molecular, obedece a que dichas simulaciones se comportan como series de tiempo, lo que ocasiona una correlación entre las variables medidas en pasos de tiempo contiguos, y por lo tanto no se comportan como muestras independientes a las que se le pueda calcular un promedio y una desviación estandar.

Tal como se muestra en la figura 3.5, si se tienen $N = 12$ observaciones o mediciones de una variable aleatoria A a partir de la simulación, el método de promedio de bloques divide de forma iterativa las N observaciones en M grupos con n observaciones contiguas, por ejemplo, si se divide las 12 observaciones iniciales en 2 grupos, entonces el grupo 1 contine las primeras 6 observaciones y el grupo 2 contiene las últimas 6 observaciones. Después, se calcula la media aritmética x_i para cada grupo y luego se calcula el promedio x^{-M} de los promedios de los grupos y la desviación estandar $S(x^{-M})$ de los promedios de los grupos como se muestra en la figura 3.6. Finalmente, la incertidumbre estandar $S(x)$ de x^{-M} es la desviación estandar $S(x^{-M})$ dividida por la raíz cuadrada de M . De esta manera, para identificar el número de muestras independientes se gráfica n vs $S(x)$ y se identifica el número n a partir del cual la gráfica se estabiliza. De esta manera, si $N = 12$ y la gráfica se estabiliza en tres, significa que cada tres observaciones hay un dato independiente.

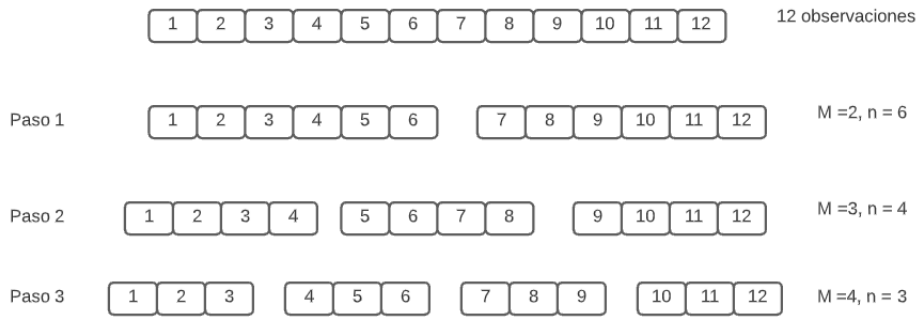


FIGURA 3.5

Paso 1 [1 2 3 4 5 6] [7 8 9 10 11 12] M=2, n=6

$$x_1 = (\sum_{i=1}^6 A_i)/6 \quad x_2 = (\sum_{i=7}^{12} A_i)/6$$

$$x^{-2} = \frac{x_1 + x_2}{2} \quad S(x^{-2}) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^2 (x_j - x^{-2})^2}{2 - 1}}$$

$$s(x) = \frac{S(x^{-2})}{\sqrt{2}}$$

FIGURA 3.6

Capítulo 4

Resultados

4.1. Efecto del colesterol en bicapas simétricas de DPPC y colesterol a 323 K

Las áreas por molécula de DPPC y colesterol, fueron calculadas por dos métodos diferentes como se mencionó en la metodología. Como se muestra en el cuadro 4.1, el área por DPPC para la bicapa pura de DPPC es 0.6058 nm^2 usando el método de Edholm & Nagle (2005) y $0.6059 \pm 0,0012 \text{ nm}^2$ usando el método Voronoi. Por lo tanto, ambos valores son cercanos al área por lípido obtenida experimentalmente para bicapas puras de DPPC a 323 K, que es 0.629 nm^2 [30].

CUADRO 4.1: Valores experimentales y valores obtenidos en las simulaciones presentadas en este trabajo para bicapas puras de DPPC a 323 K. Los valores experimentales fueron tomados de [30].

Propiedad	Valor experimental	Valor obtenido	Porcentaje de error
Área por lípido (nm^2)	0.629	0.620	1.4 %
Volumen por lípido (nm^3)	1.229	1.199	2.44 %
Espesor de la bicapa (nm)	3.78	3.96	4.76 %
Módulo de compresibilidad del área (mN/m)	231	167	27.7 %

Adicionalmente, en la figura 4.1 se observa que en el caso del modelo propuesto por Edholm & Nagle (2005), cuando la fracción molar de colesterol es 0 o 10 %, se obtienen valores negativos para las áreas por lípido del colesterol, lo cual coincide con los resultados reportados por Edholm & Nagle (2005) y experimentos por rayos x de bicapas de DMPC/colesterol y DOPC/colesterol [27], [31]. Estos valores negativos se deben a que en el modelo de Edholm & Nagle (2005), el área por molécula de colesterol $a_{\text{colesterol}(x)}$ a una concentración x de colesterol, representa el cambio en el área total de la bicapa si se adiciona una molécula de colesterol manteniendo en número de moléculas de DPPC constante, esto significa que el colesterol causa una reducción neta en el área total de la bicapa, lo que coincide con el efecto de condensación de colesterol, según el cual el aumento en la concentración de colesterol, reduce el área por lípido.

Por otra parte, las áreas por DPPC y colesterol obtenidas por el método Voronoi, también reproducen el efecto de condensación, ya que a medida que aumenta la concentración de colesterol, el área por DPPC y el área por lípido disminuyen, mientras que el área por colesterol aumenta.

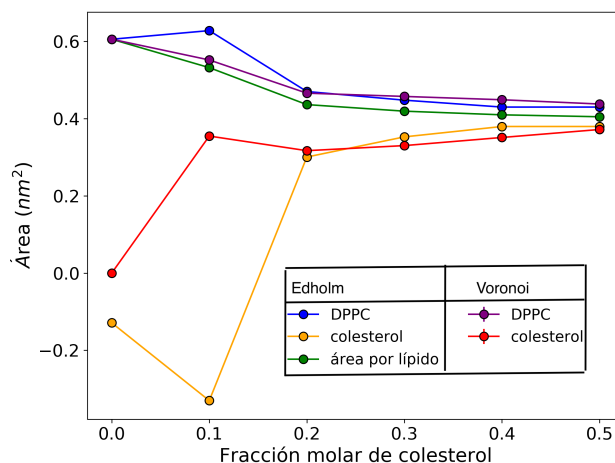


FIGURA 4.1: Comparación del área por lípido y áreas por DPPC y colesterol a diferentes fracciones molares de colesterol usando el modelo de Edholm & Nagle (2005) y el método Voronoi.

Teniendo en cuenta que el área por lípido disminuye al aumentar la concentración de colesterol, el efecto de condensación también predice que a medida que aumenta la concentración de colesterol el volumen por lípido disminuye de forma casi lineal como se muestra en la figura 4.2. Adicionalmente, asumiendo que los volúmenes parciales específicos V_{DPPC} y $V_{colesterol}$ son independientes de la concentración del colesterol, estos pueden estimarse a partir del volumen por lípido $V(x)$ como se mencionó en la metodología. De esta manera, el volumen por DPPC estimado es 1.1797 nm^3 y el volumen por colesterol es 0.6170 nm^3 , siendo ambos valores bastante cercanos a los reportados por Edholm & Nagle (2005), que son 1.220 nm^3 y 0.6170 nm^3 , respectivamente [27], [30].

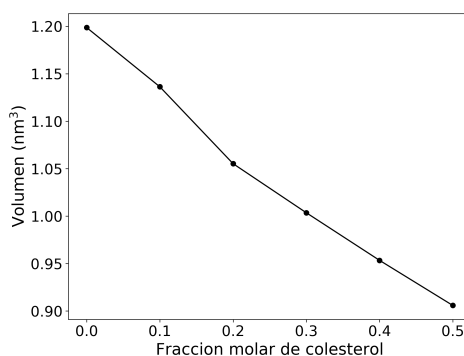


FIGURA 4.2: Volumen por lípido a diferentes fracciones molares de colesterol.

Adicionalmente, considerando que las bicapas lipídicas se comportan como un fluido incompresible, la disminución en el área por lípido tiene como consecuencia el aumento del espesor como se observa en la figura 4.3. Sin embargo, también se observa que el espesor aumenta hasta el 30% de colesterol y luego disminuye, comportamiento que también ha sido observado en simulaciones y estudios experimentales, y se explica por el movimiento de las moléculas de DPPC hacia el centro de la bicapa para favorecer la interacción del grupo hidroxilo del colesterol con el grupo polar de las moléculas de DPPC o con el agua [32], [33].

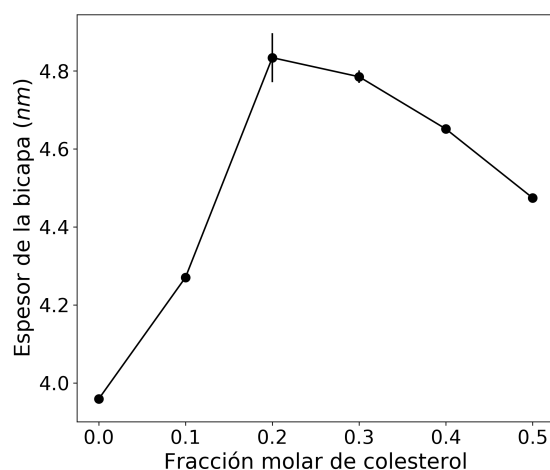


FIGURA 4.3: Espesor de la bicapa a diferentes fracciones molares de colesterol.

De igual manera, el colesterol afecta la orientación de los carbonos correspondientes a las cadenas alifáticas del DPPC con respecto al eje normal a la bicapa, tal como se muestra en las figuras 4.4 y 4.5, ya que cuando la concentración del colesterol aumenta, el aumento en el parámetro de orden se interpreta como el alineamiento de las cadenas hidrofóbicas del DPPC con el eje normal a la bicapa. Este comportamiento coincide con los resultados reportados en estudios experimentales y simulaciones de dinámica molecular para bicapas con una distribución simétrica de colesterol, ya que al disminuir el área por lípido, el colesterol causa que las cadenas alifáticas del DPPC se enderecen como parte del efecto de condensación [34], [35]. No obstante, se observa que a partir del 20% de fracción molar de colesterol, la mayoría de los carbonos alcanzan un alineamiento máximo, excepto los que se encuentran cerca del centro de la bicapa (carbonos número 12 a 16), los cuales presentan mayor libertad de movimiento. Según Lee & Maibaum (2018), esto se debe a la diferencia de longitudes entre las moléculas de DPPC y colesterol, ya que el colesterol tiene una longitud menor al DPPC y cuando el espesor de la bicapa incrementa, el grupo hidroxil del colesterol tiende a ubicarse cerca de la solución acuosa, generando un espacio libre en el centro de la bicapa, que en consecuencia aumenta la libertad de movimiento en las cadenas hidrofóbicas del DPPC [35].

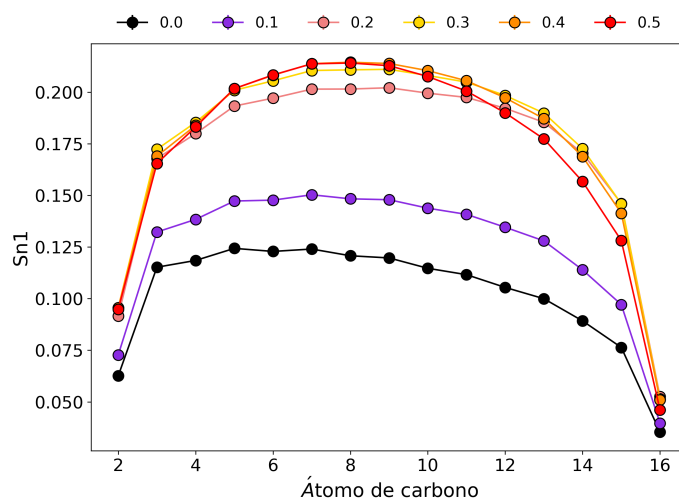


FIGURA 4.4: Parámetro de orden para los carbonos de la cadena alifática del DPPC en la posición estereoespecífica S_{n1} a diferentes fracciones molares de colesterol.

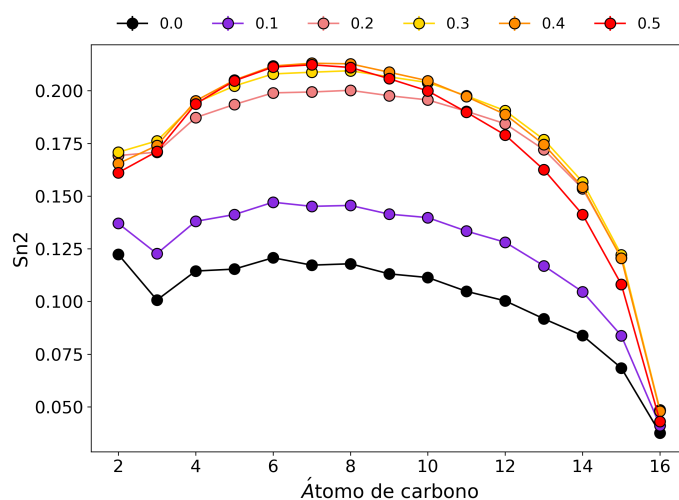


FIGURA 4.5: Parámetro de orden para los carbonos de la cadena alifática del DPPC en la posición estereoespecífica S_{n2} a diferentes fracciones molares de colesterol.

Teniendo en cuenta que el colesterol afecta la alineación de las cadenas hidrofóbicas del DPPC con respecto al eje normal a la bicapa, es importante examinar si también afecta la libertad de movimiento del grupo polar del DPPC, ya que esto podría afectar las interacciones electrostáticas entre las moléculas de DPPC y el agua. Sin embargo, al observar la distribución de los ángulos de inclinación del vector formado por los átomos fósforo y nitrógeno del DPPC con respecto al eje normal de la bicapa como se muestra en la figura 4.6, se observa que el ángulo promedio no cambia al incrementar la concentración de colesterol.

Por otra parte, la orientación del colesterol respecto al eje normal a la bicapa si cambia con el aumento en la concentración del colesterol, tal como se muestra en

la figura 4.7. De esta manera, se observa que al aumentar la concentración de colesterol en la bicapa, el ángulo de inclinación del colesterol disminuye y por lo tanto asume una conformación más alineada con respecto al eje normal a la bicapa. Este comportamiento ha sido observado en otras simulaciones y en experimentos de resonancia magnética en diferentes sistemas de fosfolípido/colesterol. Específicamente, Khelashvili et.al (2010) demostraron que el ángulo de inclinación del colesterol está correlacionada con la habilidad del colesterol para afectar la fluidez de la bicapa y sus propiedades mecánicas [36]

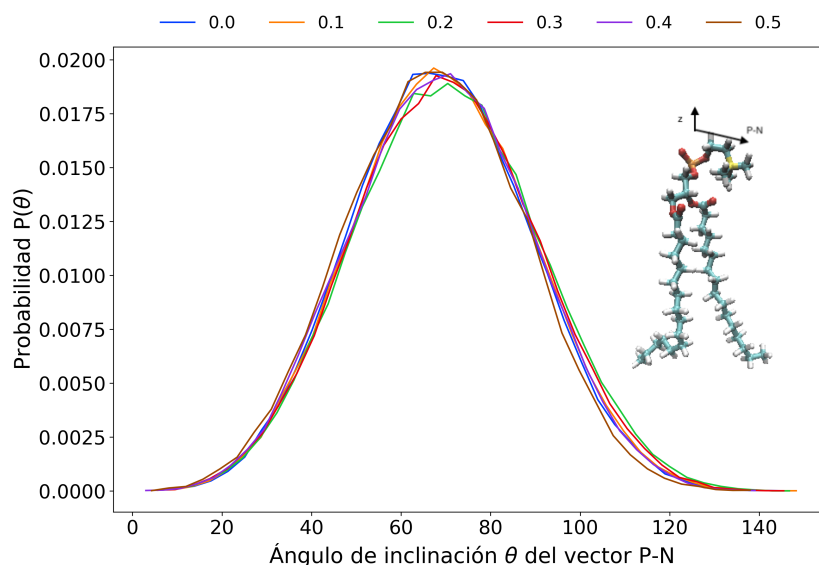


FIGURA 4.6: Probabilidad $P(\theta)$ del ángulo entre el vector P-N de las moléculas de DPPC y el eje normal a la bicapa a diferentes fracciones molares de colesterol. El inserto corresponde a una molécula de DPPC donde el átomo naranja corresponde al fósforo y el átomo amarillo es el nitrógeno.

Adicionalmente, para obtener información sobre la estructura de la bicapa a lo largo del eje z , se calculó en perfil de densidad electrónica para el sistema (figura 4.8A), los átomos del grupo fosfato del DPPC (figura 4.8B), el grupo colina del DPPC (figura 4.8C), los átomos pertenecientes a los anillos del colesterol (figura 4.8D), los átomos en la cola del colesterol (figura 4.8E) y los átomos de grupo hidroxilo del colesterol (figura 4.8F). De esta manera, la figura 4.8A representa la densidad electrónica de la bicapa y las moléculas de agua que la rodean. En esta figura, se pueden observar que entre 3.5 y 5 nm del centro de la bicapa, se encuentra una región donde la densidad electrónica es constante y no cambia al aumentar la concentración de colesterol [37], [38]. Dicha región, corresponde a las moléculas de agua que se encuentran lo suficientemente distantes de los grupos polares del DPPC como para que su ordenamiento y densidad en dicha región no se vea afectada por las interacciones electrostáticas con la región polar del DPPC. Por otra parte, al avanzar hacia el interior de la bicapa, se observa la presencia de dos puntos máximos que se localizan con las posiciones de los grupos fosfato (figura 4.8B) y colina (figura 4.8C) tal como se ha reportado en simulaciones y experimentos por rayos x [39]. Además, es notorio que cuando la concentración de colesterol aumenta hasta el 20 o 30%, la posición de los puntos máximos en la densidad electrónica de los grupos fosfato (figura 4.8B), colina (figura 4.8C), hidroxilo del colesterol (figura 4.8F) y los anillos

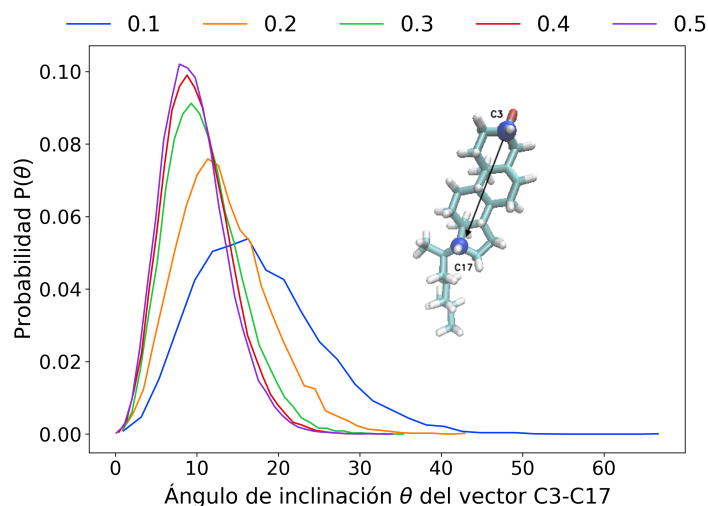


FIGURA 4.7: Probabilidad $P(\theta)$ del ángulo entre el vector C3-C17 de las moléculas de colesterol y el eje normal a la bicapa a diferentes fracciones molares de colesterol. El inserto corresponde a una molécula de colesterol donde los átomos azul oscuro son los átomos C3 y C17.

del colesterol (figura 4.8D) se desplazan hacia el contacto con la fase acuosa como se muestra en la flechas, lo cual ocasiona el aumento del espesor de la bicapa [39]. Sin embargo, cuando la concentración de colesterol es mayor al 30 %, los grupos fosfato y colina se desplazan hacia el centro de la bicapa, mientras que el grupo hidroxilo y los anillos del colesterol ocupan la misma posición, esto explica la disminución del espesor a altas concentraciones de colesterol, ya que como se dijo anteriormente, al tener el colesterol menor longitud que el DPPC, las moléculas de DPPC se deben mover hacia el centro de la bicapa para favorecer la interacción de los fosfatos y las colinas con el hidroxilo del colesterol.

Otros aspectos importantes de analizar en la distribución de densidad electrónica del sistema, es el aumento de densidad en los puntos intermedios entre los máximos y el mínimo, así como la disminución de la densidad electrónica en el centro de la bicapa [33], [40]. La primera observación se relaciona con la presencia de los anillos del colesterol aproximadamente a 1 nm del centro de la bicapa, mientras que la segunda se debe a la disminución de los grupos metil del DPPC en el centro de la bicapa al aumentar la concentración de colesterol [40].

Por otra parte, aunque las propiedades evaluadas anteriormente proporcionan un panorama general sobre el ordenamiento de la bicapa, es útil analizar también la organización estructural en diferentes regiones del eje z, ya que las interacciones colesterol-lípido, colesterol-agua y lípido-agua varían a través de este eje. Por lo tanto, en la figura 4.9 se muestra el área libre, las áreas transversales ocupadas por el DPPC y el colesterol y el número de lípidos en cada región del eje z. Dichas propiedades fueron calculadas como se menciona en la metodología. Respecto al área

transversal ocupada por el DPPC (ver figura 4.9A), se observa que la bicapa pura de DPPC tiene dos máximos aproximadamente a 2nm del centro de la bicapa, pero cuando la concentración del colesterol aumenta, los máximos se desplazan a 3nm

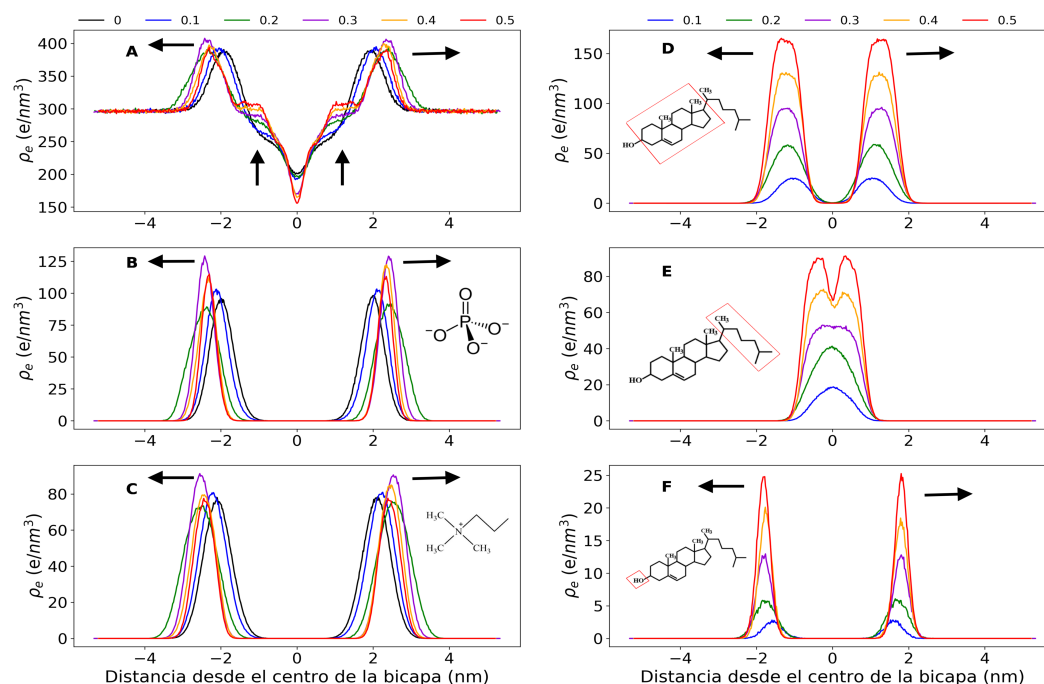


FIGURA 4.8: Densidad electrónica de las bicapas simétricas a diferentes fracciones molares de colesterol: A) bicapa y fase acuosa, B) grupo fosfato del DPPC, C) grupo colina del DPPC, D) anillos del colesterol, E) cola del colesterol, F) grupo hidroxilo del colesterol. Los insertos corresponden a los átomos cuya densidad electrónica se muestra en cada cuadro.

desde el centro de la bicapa a 50 % de colesterol, debido al aumento del espesor como se explicó anteriormente. Aunque el área del DPPC presenta cambios importantes debido a la presencia del colesterol, la figura 4.9AB muestra que el área por colesterol no presenta mayores cambios cuando la concentración de colesterol aumenta [33], [37].

Adicionalmente, en la figura 4.9AC se observa en el centro de la bicapa, todas las curvas presentan un pico, que se presenta debido a la extensión de algunos lípidos hacia la monocapa opuesta, lo cual es conocido como interdigitación, y es mencionada en diferentes estudios como una de las posibles causas del aumento del espesor de la bicapa en presencia de colesterol, ya que al aumentar la concentración de colesterol, el número de lípidos en la monocapa opuesta disminuye desde aproximadamente 50 lípidos en la bicapa pura de DPPC hasta aproximadamente 5 lípidos para concentraciones de colesterol superiores al 20 %.

Teniendo en cuenta las observaciones anteriores, se puede pensar que el colesterol también afecta el área libre en diferentes regiones de la bicapa, lo cual se comprueba en la figura 4.9D, ya que respecto a la bicapa pura de DPPC, el área libre disminuye en todas las regiones de la bicapa al aumentar la concentración de colesterol. De esta manera, Flack et.al (2004) reportaron que la bicapa pura de DPPC presenta dos puntos mínimos en el área libre aproximadamente a 1.7 nm del centro de la bicapa, lo cual es consistente con los resultados observados en la figura 4.9D, ya que dichos mínimos se ubican aproximadamente a 2 nm del centro de la bicapa [37].

Además, se observa que ambos puntos mínimos persisten en todas las concentraciones de colesterol y en posiciones más lejanas del centro de la bicapa hasta el 20 o 30% de colesterol, y cuando la concentración de colesterol es igual o mayor al 40% los puntos mínimos reducen su distancia con respecto al centro de la bicapa y el área libre aumenta sustancialmente, lo cual es consistente con los resultados obtenidos para el espesor de la bicapa.

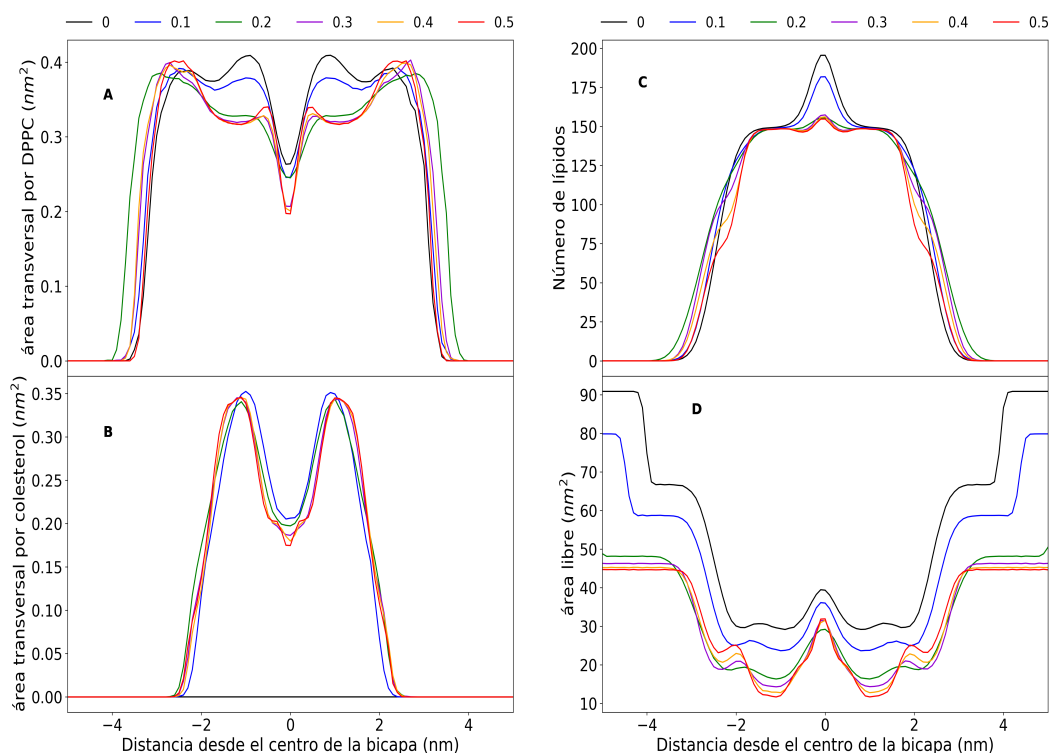


FIGURA 4.9: Áreas transversales del DPPC y colesterol, área libre y número de lípidos en función de las distancia al centro de la bicapa para diferentes fracciones molares de colesterol.

Además de las propiedades estructurales de la bicapa, también es importante examinar el comportamiento elástico cuando aumenta la concentración de colesterol. De esta manera, el módulo de compresibilidad del área obtenido para la bicapa pura de DPPC es 159.5 mN/m, el cual se compara razonablemente bien con el valor experimental reportado para bicapas de DPPC a 323 K, que es 230 ± 20 mN/m. Aunque la diferencia respecto al valor experimental es de aproximadamente el 30%, se sabe que el cálculo del módulo de compresibilidad es muy sensible a las condiciones de simulación [41]. Sin embargo, según se muestra en la figura 4.10, la tendencia obtenida coincide con el efecto de condensación del colesterol, ya que el aumento del K_A se interpreta como el costo energético asociado a la deformación de la bicapa, por lo tanto, a concentraciones altas de colesterol, se requiere más fuerza por unidad de longitud para deformar la membrana [31].

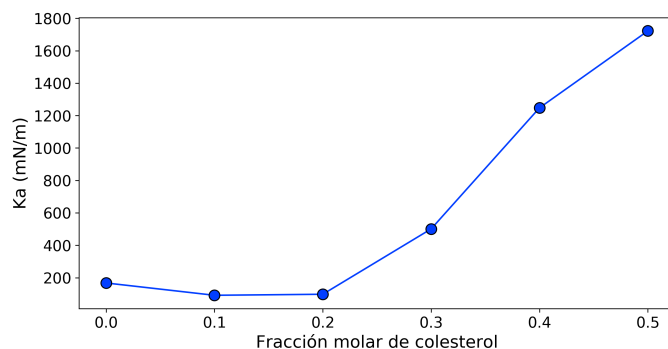


FIGURA 4.10: Módulo de compresibilidad del área a diferentes fracciones molares de colesterol.

Aparte del módulo de compresibilidad del área, el módulo de rigidez de la membrana (conocido en inglés como bending modulus) es otra propiedad mecánica importante que está asociada con las energías de interacción entre los lípidos y tal como se puede observar en la figura 4.11, al aumentar la concentración de colesterol aumenta el módulo de rigidez [31]

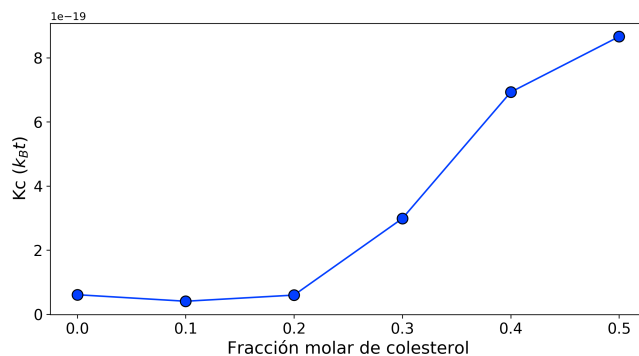


FIGURA 4.11: Módulo de rigidez a diferentes fracciones molares de colesterol.

4.2. Efecto del colesterol en bicapas simétricas de DPPC y colesterol a 310.15 K

En la figura 4.12, se observa que el área por lípido y el área por DPPC calculada por el método Voronoi y el modelo propuesto por Edholm & Nagle (2005), disminuyen cuando la concentración de colesterol es menor o igual a 10% y cuando es mayor o igual a 20%, mientras que en 20% se presenta un incremento en dichas variables. Estas observaciones, coinciden con los resultados reportados por Al-Rekabi & Contera (2018), quienes demostraron que a concentraciones bajas de colesterol, bicapas soportadas de DPPC y colesterol tienen un comportamiento elástico, es decir, que se deforman ante la aplicación de una fuerza, mientras que a concentraciones de colesterol superiores al 30%, las bicapas tienen un comportamiento viscoelástico, lo que les permite adaptarse al incremento en la concentración de colesterol. De esta manera, si la bicapa tiene un comportamiento elástico, se espera que el área por lípido aumente debido a la deformación [42].

Adicionalmente, la figura 4.13 muestra que el espesor de la bicapa con colesterol es mayor que la bicapa pura de DPPC, pero cuando la concentración de colesterol

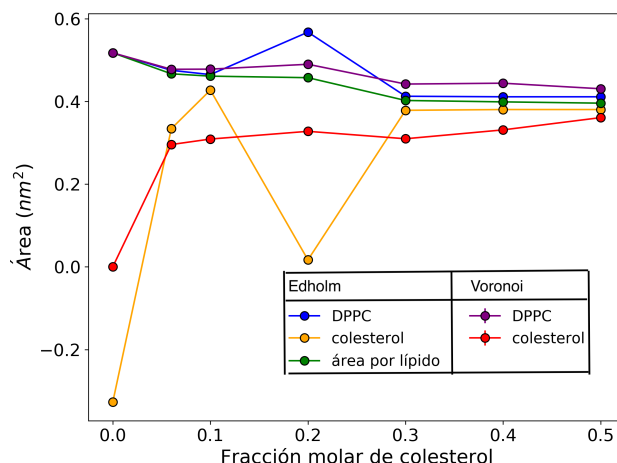


FIGURA 4.12: Comparación del área por lípido y áreas por DPPC y colesterol a diferentes fracciones molares de colesterol usando el modelo de Edholm & Nagle (2005) y el método Voronoi.

está entre 6 y 20% el espesor es igual, mientras que a partir de 30% es espesor comienza a disminuir, lo que parece sugerir que a concentraciones iguales o mayores 30% se puede observar el efecto de condensación del colesterol cuando la bicapa está en estado líquido ordenado, como es el caso de las bicapas simétricas a 323 K.

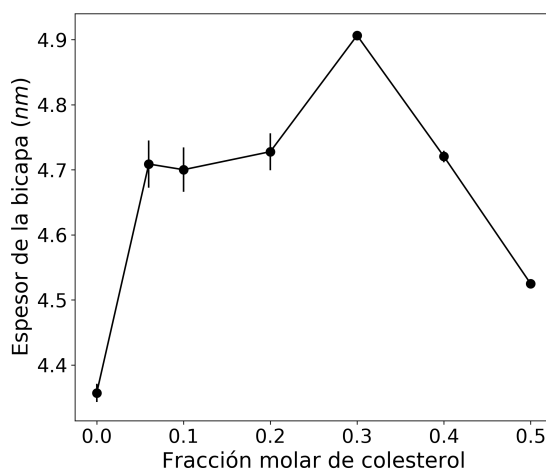


FIGURA 4.13: Espesor de la bicapa a diferentes fracciones molares de colesterol. Las barras de error indican la desviación estándar obtenida a partir del promedio de bloques.

Por otra parte, el alineamiento de las cadenas hidrofóbicas del DPPC con respecto al eje normal a la bicapa, presentados en las figuras 4.14 y 4.15, confirma que las observaciones realizadas anteriormente para el área por lípido y el espesor de la bicapa, ya que la orientación de las cadenas alifáticas del DPPC en las posiciones S_{n1} y S_{n2} es menor que el ordenamiento de las cadenas hidrofóbicas de la bicapa pura de DPPC cuando la concentración de colesterol es menor a igual a 20%. Adicionalmente, teniendo en cuenta que el DPPC a 310.15 K se encuentra en la fase gel, es decir, se comporta como un sólido, se hipotetiza que al estar tan cerca de la temperatura de transición, las concentraciones bajas de colesterol tienden a inducir un

estado desordenado de la bicapa, mientras que a concentraciones altas logra inducir el ordeamiento de la bicapa [43].

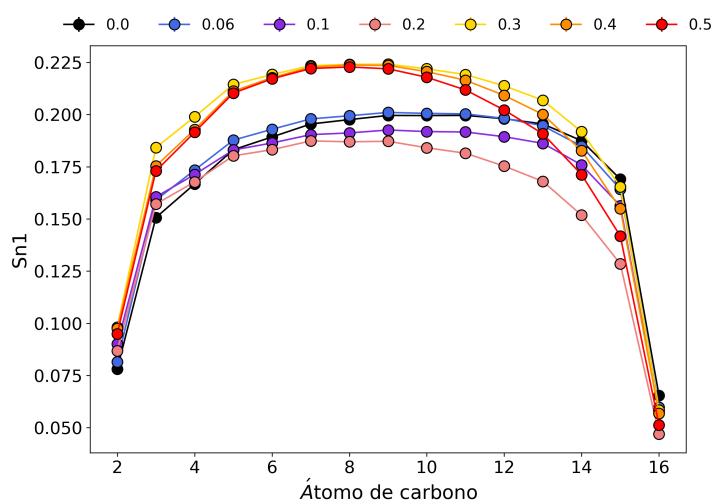


FIGURA 4.14: Parámetro de orden para los carbonos de la cadena alifática del DPPC en la posición estereoespecífica S_{n1} a diferentes fracciones molares de colesterol.

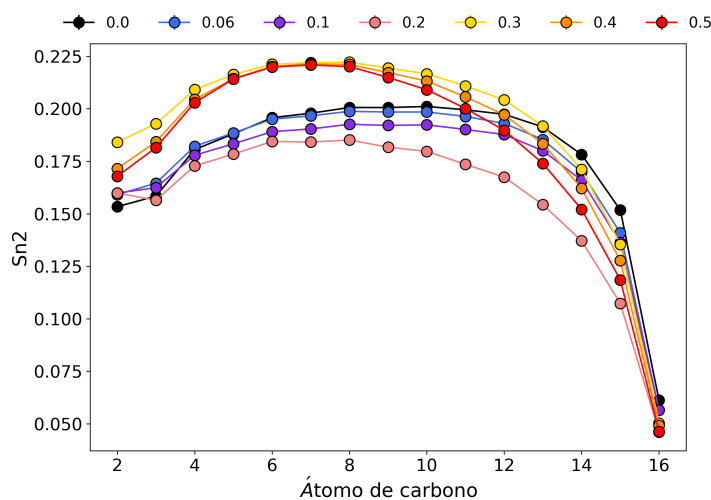


FIGURA 4.15: Parámetro de orden para los carbonos de la cadena alifática del DPPC en la posición estereoespecífica S_{n2} a diferentes fracciones molares de colesterol.

Adicionalmente, al examinar los ángulos de inclinación del grupo polar del DPPC con respecto al eje normal de la bicapa (ver figura 4.16), se observa que el ángulo promedio no cambia al incrementar la concentración de colesterol y tiene un valor promedio de 70 grados, lo que coincide con los resultados reportados en otras simulaciones [35]. Por otra parte, el ángulo de inclinación del colesterol (figura 4.17) aumenta entre el 6 y 10 % de colesterol, luego disminuye un poco en 20 % y a partir de 30 % disminuye considerablemente. Por lo tanto, si se analiza la inclinación del colesterol en conjunto con el parámetro de orden, se observa una correlación entre

ambas variables, lo que coincide con los hallazgos reportados en estudios de dinámica molecular de DMPC/colesterol [44]

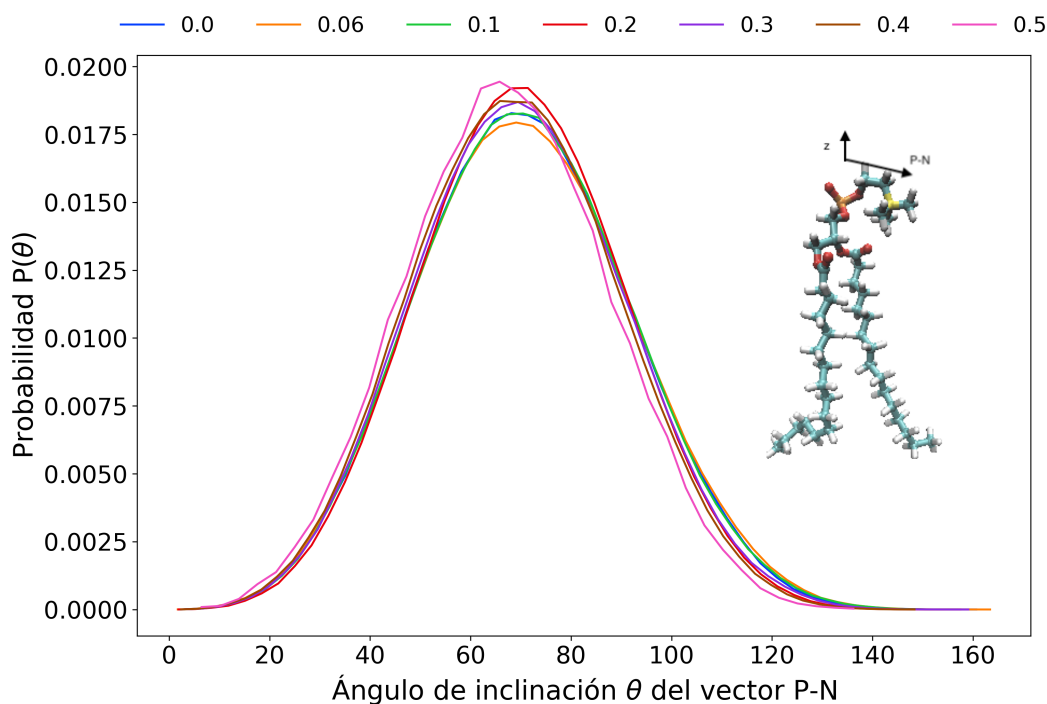


FIGURA 4.16: Probabilidad $P(\theta)$ del ángulo entre el vector P-N de las moléculas de DPPC y el eje normal a la bicapa a diferentes fracciones molares de colesterol. El inserto corresponde a una molécula de DPPC donde el átomo naranja corresponde al fósforo y el átomo amarillo es el nitrógeno.

A partir del perfil de densidad electrónica se observan patrones similares a las bicapas simétricas a 323 K. Además, cabe resaltar que en este caso, el cambio en las posiciones de los puntos máximos en la distribución de densidad electrónica del sistema (figura 4.18A), así como las posiciones de los puntos máximos de los grupos fosfato, colina, hidroxilo y anillo del colesterol, confirman los resultados obtenidos respecto al espesor de la bicapa. Adicionalmente, una característica que no se observó en las bicapas simétricas a 323 K, pero sí se observa a 310.15 K es la amplitud de la distribución de los grupos fosfato (figura 4.18B) y colina (figura 4.18C) para la bicapa pura de DPPC y la bicapa con 6% de colesterol.

Adicionalmente, si se examina las distribuciones del área ocupada por el DPPC y el colesterol en función de la distancia del centro de la bicapa como se muestra en la figura 4.19, no se observan diferencias significativas respecto a las observaciones realizadas para las bicapas simétricas a 323 K. No obstante, si hay algunas diferencias respecto a la distribución del número de lípidos y el área libre. En el caso del número de lípidos, para la bicapa pura de DPPC y concentraciones iguales o menores a 10%, la amplitud del pico en el centro de la bicapa es mayor que en las bicapas a 323 K correspondientes, aunque el número de lípidos en dicha región es similar. Por lo tanto, esto sugiere que la bicapa pura de DPPC y las bicapas con concentraciones menores o iguales a 10% son más fluidas que las bicapas con concentraciones mayores o iguales a 20%.

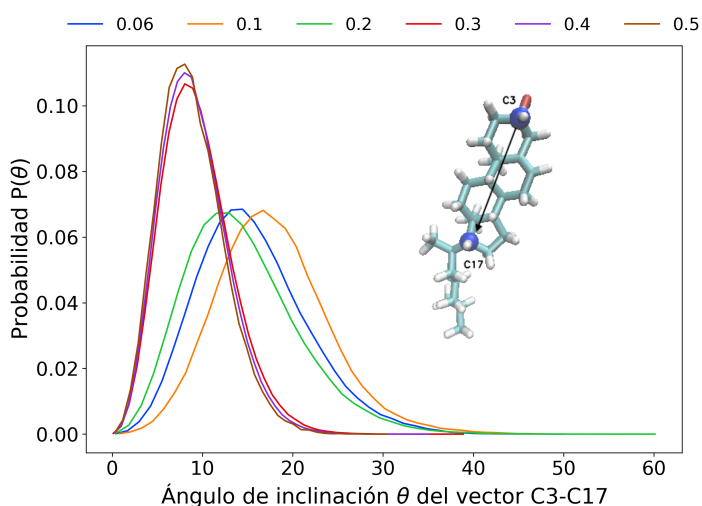


FIGURA 4.17: Probabilidad $P(\theta)$ del ángulo entre el vector C3-C17 de las moléculas de colesterol y el eje normal a la bicapa a diferentes fracciones molares de colesterol. El inserto corresponde a una molécula de colesterol donde los átomos azul oscuro son los átomos C3 y C17.

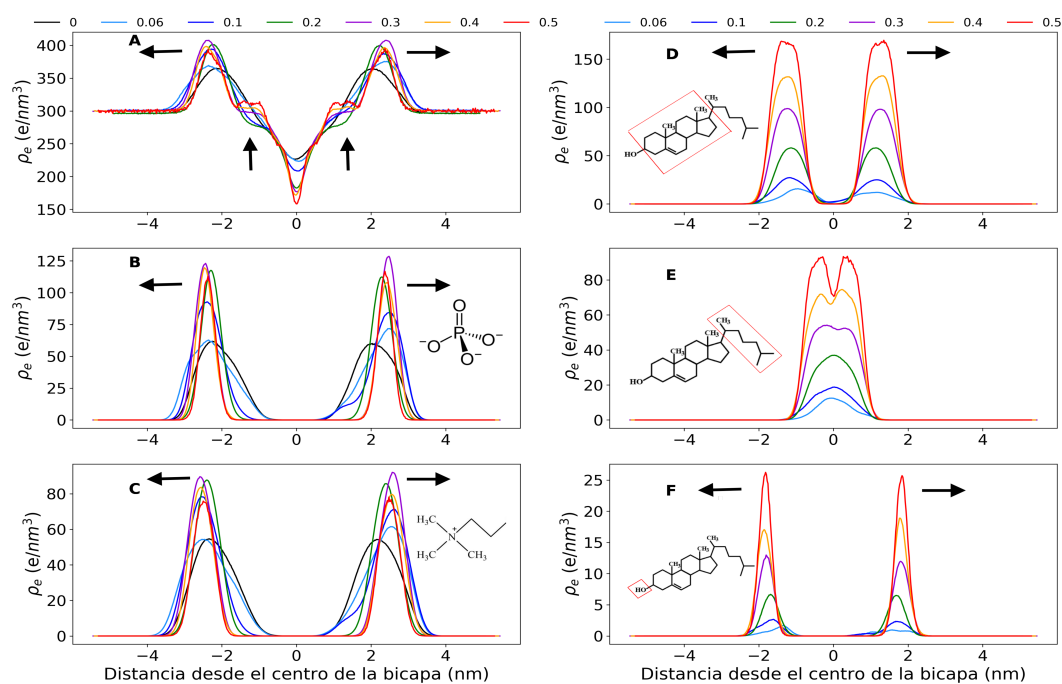


FIGURA 4.18: Densidad electrónica de las bicapas simétricas a diferentes fracciones molares de colesterol: A) bicapa y fase acuosa, B) grupo fosfato del DPPC, C) grupo colina del DPPC, D) anillos del colesterol, E) cola del colesterol, F) grupo hidroxilo del colesterol. Los insertos corresponden a los átomos cuya densidad electrónica se muestra en cada cuadro.

Por otra parte, el área libre en el centro de la bicapa, no cambia significativamente respecto a la bicapa pura de DPPC cuando aumenta la concentración de colesterol. Además, la disminución del área libre en la posición de los anillos de colesterol

(aproximadamente a 1 nm del centro de la bicapa), no disminuye gradualmente al aumentar la concentración de colesterol sino que se agrupa en dos puntos mínimos, uno correspondientes a las concentraciones menores a 20% y otro a las concentraciones mayores a 30%.

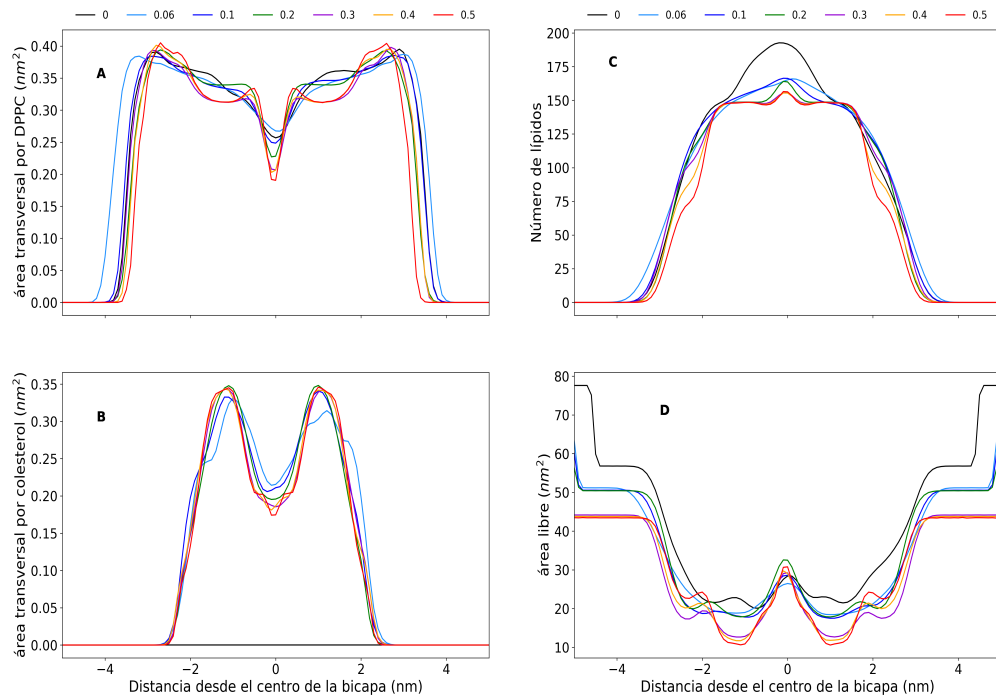


FIGURA 4.19: Áreas transversales del DPPC y colesterol, área libre y número de lípidos en función de las distancia al centro de la bicapa para diferentes fracciones molares de colesterol.

Respecto a las propiedades elásticas, las figuras 4.20 y 4.21 muestran que tanto el módulo de compresibilidad de área como el módulo de rigidez incrementan con el aumento en la concentración de colesterol, lo que indica que al igual que las bicapas simétricas a 323 K, el colesterol tiene un efecto de condensación sobre la bicapa e influencia las interacciones entre los lípidos que la componen.

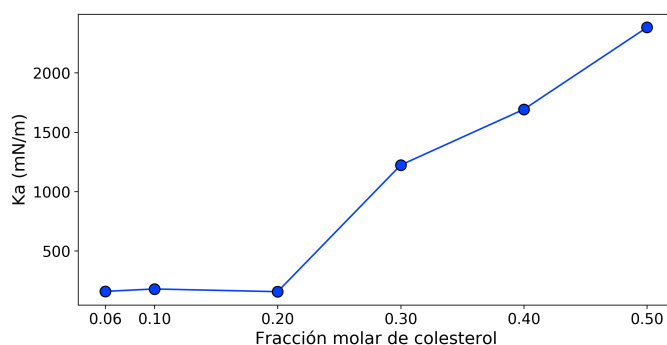


FIGURA 4.20: Módulo de compresibilidad del área a diferentes fracciones molares de colesterol.

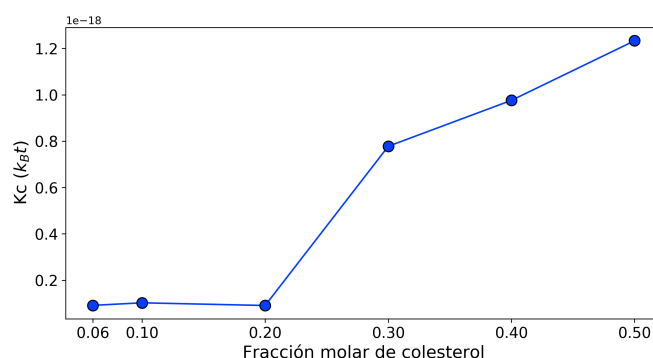


FIGURA 4.21: Módulo de rigidez a diferentes fracciones molares de colesterol.

4.3. Efecto del colesterol en bicapas asimétricas de DPPC y colesterol a 323 K

En la figura 4.22, se muestran las áreas por lípido calculadas por el método Voronoi para cada monocapa (Inf y Sup) de las bicapas simétricas y asimétricas a 323 K. En esta figura, se observa que el área por lípido para el DPPC y el colesterol en cada monocapa de las bicapas simétricas es igual, pero lo mismo no sucede en el caso de las bicapas asimétricas, ya que el área por DPPC en la monocapa inferior (con colesterol) de las bicapas asimétricas es mayor que el área por DPPC en la monocapa superior (sin colesterol), la cual tiene valores más cercanos al área por DPPC de las bicapas simétricas correspondientes. Adicionalmente, como es de esperarse, el área por colesterol de las bicapas asimétricas es mayor que en sus contrapartes simétricas, ya que el número de moléculas de colesterol en la monocapa inferior de las bicapas asimétricas es mayor que el número de moléculas de colesterol en cada monocapa de las bicapas simétricas con las mismas concentraciones de colesterol.

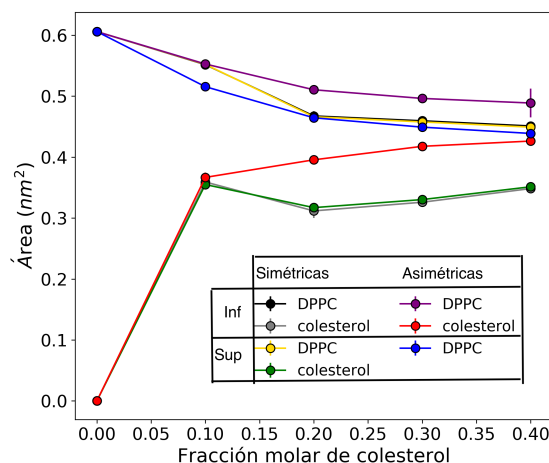


FIGURA 4.22: Área por lípido y áreas por DPPC y colesterol de las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol. Inf y Sup corresponden a las monocapas inferiores y superiores, respectivamente.

Adicionalmente, como se muestra en la figura 4.23, el espesor de las bicapas asimétricas es menor que el espesor de las bicapas simétricas correspondientes cuando la concentración del colesterol es mayor o igual a 20 %, mientras que el espesor de la bicapa asimétrica a 10 % de colesterol, es mayor que el de la bicapa simétrica con la misma concentración de colesterol.

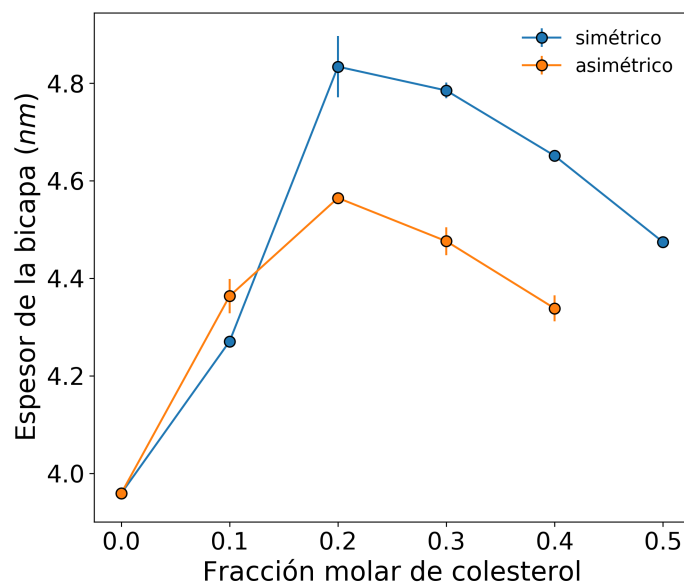


FIGURA 4.23: Espesor de la bicapa para las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol. Las barras de error representan la desviación estándar calculada mediante el promedio de bloques.

Por otra parte, la figura 4.24, permite confirmar los resultados obtenidos en el área por lípido en las bicapas asimétricas, ya que si la monocapa superior tiene menor área por lípido que la monocapa inferior, se espera que las cadenas alifáticas del DPPC en la monocapa superior estén más alineadas que la monocapa inferior en

las bicapas asimétricas, lo que se observa en el parámetro de orden para todas las concentraciones de colesterol. También, otro aspecto que se debe tener en cuenta es que desde el 20% de colesterol los primeros 8 a 10 carbonos de la cadena alifática del DPPC están más alineados en las bicapas simétricas que en las monocapas de las bicapas asimétricas a la misma fracción molar de colesterol

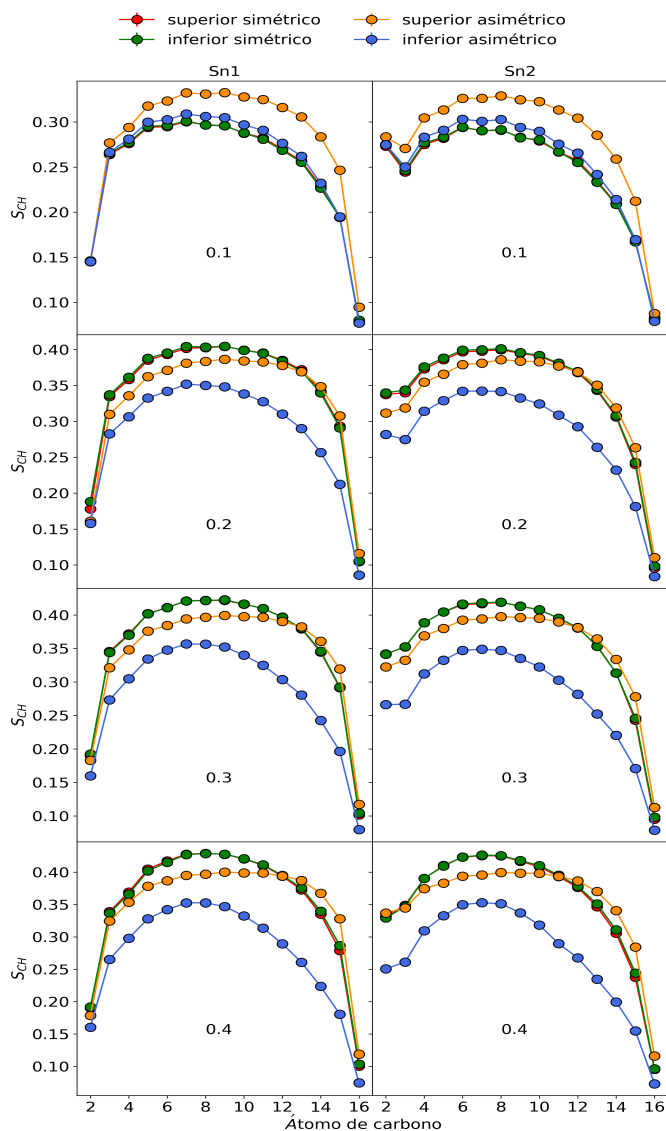


FIGURA 4.24: Parámetros de orden para las cadenas alifáticas del DPPC en las posiciones S_{n1} y S_{n2} de las bicapas simétricas y asimétricas. Cada línea corresponde al parámetro de orden para una monocapa de una bicapa simétrica o asimétrica a la fracción molar de colesterol que aparece en el medio de cada gráfica.

Adicionalmente, la figura 4.25, permite comparar el alineamiento de las cadenas alifáticas del DPPC en cada monocapa de las bicapas asimétricas con las bicapas simétricas a medida que aumenta la concentración de colesterol. De esta manera, hay tres aspectos para resaltar. Primero, tanto las bicapas simétricas como asimétricas presentan un aumento en el parámetro de orden a medida que aumenta la concentración de colesterol. Segundo, cuando la concentración de colesterol es igual a 10%, la monocapa superior de la bicapa asimétrica está más alineada que la monocapa inferior y que cualquiera de las dos monocapas de la bicapa simétrica. Tercero, a partir

de 20% de colesterol, las monocapas de las bicapas simétricas están más alineadas que las monocapa superior de las bicapas a asimétricas correspondientes, y a su vez, estas están más alineadas que la monocapa inferior. Por lo tanto, los resultados del parámetro de orden en conjunto con los resultados del área por lípido y el espesor de la bicapa, indican que cuando el colesterol se encuentra solo en la monocapa inferior, la monocapa superior presenta un efecto indirecto del colesterol.

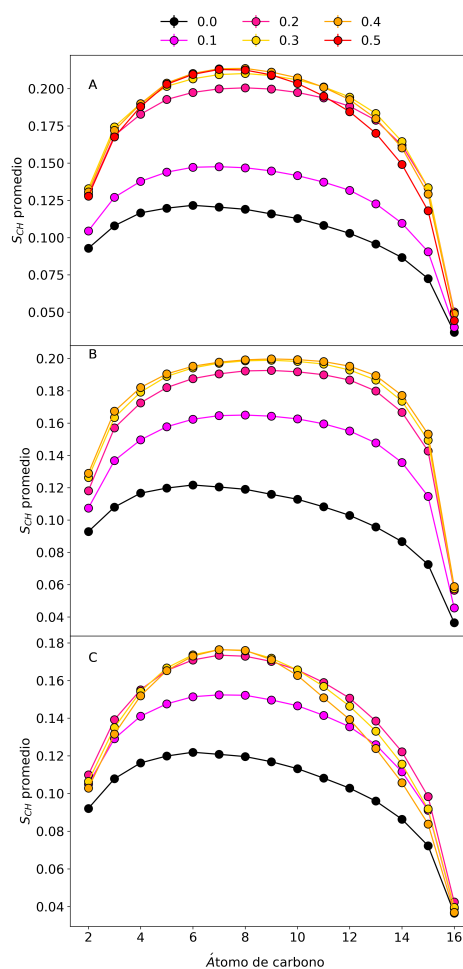


FIGURA 4.25: Parámetros de orden promedio para las bicapas simétricas y asimétricas: A) monocapas superiores de las bicapas simétricas, B) monocapa superior de las bicapas asimétricas, C) monocapa inferior de las bicapas asimétricas

Respecto al ángulo de inclinación del grupo polar del DPPC (ver figura 4.26), el ángulo promedio en la monocapa superior, es igual para todas las concentraciones de colesterol, mientras que en la inferior, si bien no hay diferencia entre las diferentes concentraciones de colesterol debido a las fluctuaciones de esta variable, si se nota en la distribución una disminución de los ángulos mayores a 100 grados y un aumento en la probabilidad de encontrar un ángulo entre 0 y 50 grados a medida que aumenta la concentración de colesterol. Por lo tanto, esto abre la posibilidad de estudiar efecto de la asimetría en las interacciones electrostáticas en las que está involucrado el grupo polar del DPPC.

Por otra parte, el ángulo de inclinación del colesterol, tal como se muestra en la figura 4.27, las desviaciones estándar tan grandes que se presentan en esta variable,

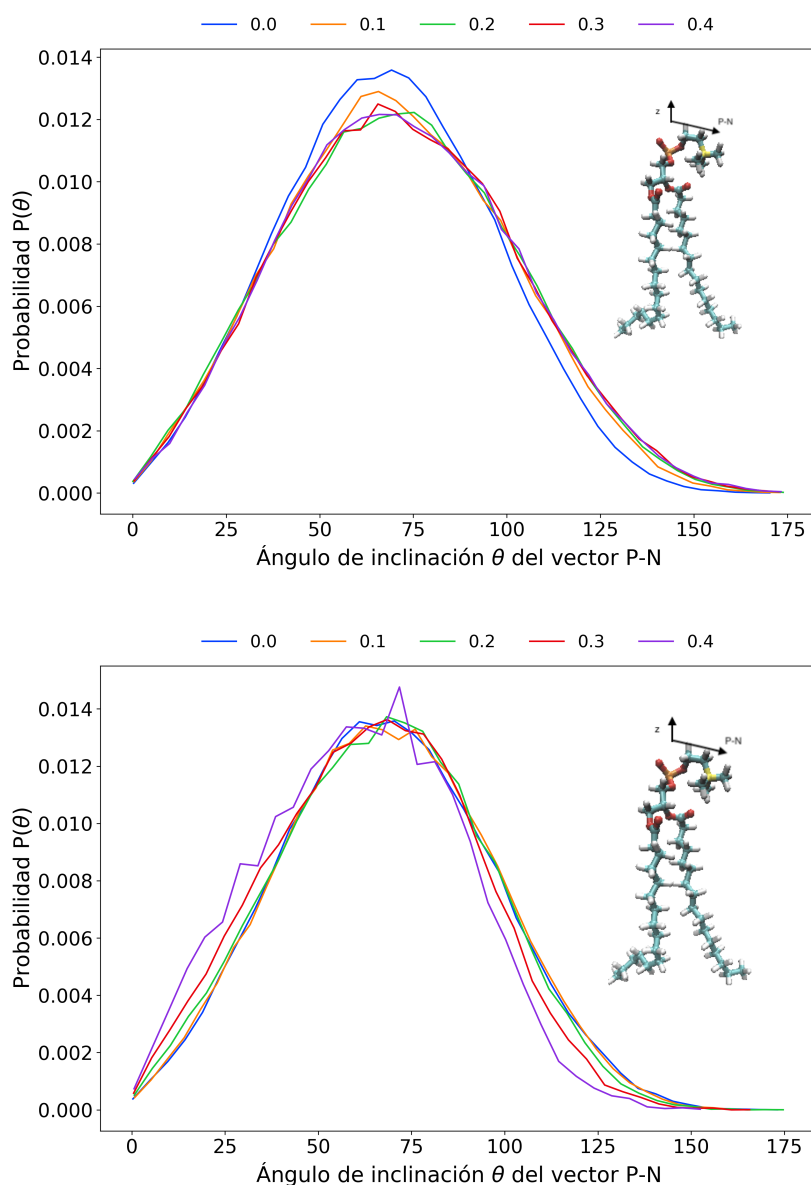


FIGURA 4.26: Ángulo de inclinación del vector P-N del DPPC: El panel superior corresponde a las moléculas de DPPC en la monocapa superior y el panel inferior corresponde a las moléculas de DPPC en la monocapa inferior. El inserto en cada uno de los paneles corresponde a una molécula de DPPC donde el átomo naranja es el fósforo y el átomo amarillo es el nitrógeno.

no permiten afirmar que hay una diferencia entre los sistemas simétricos y asimétricos, a excepción de las bicapas a 40% de colesterol, donde se nota que la bicapa asimétrica tiene un menor ángulo de inclinación que las bicapa simétrica correspondiente. No obstante, se nota que tanto en las bicapas asimétricas como simétricas, el colesterol tiende a alinearse con el eje normal de la bicapa.

Adicionalmente, el perfil de densidad electrónica (ver figura 4.28) revela diferencias importantes respecto a las bicapas simétricas, ya que por una parte, al estar el colesterol restringido a una sola monocapa, disminuye la presencia de la cola del colesterol en el centro de la bicapa, de modo que cuando aumenta la concentración del

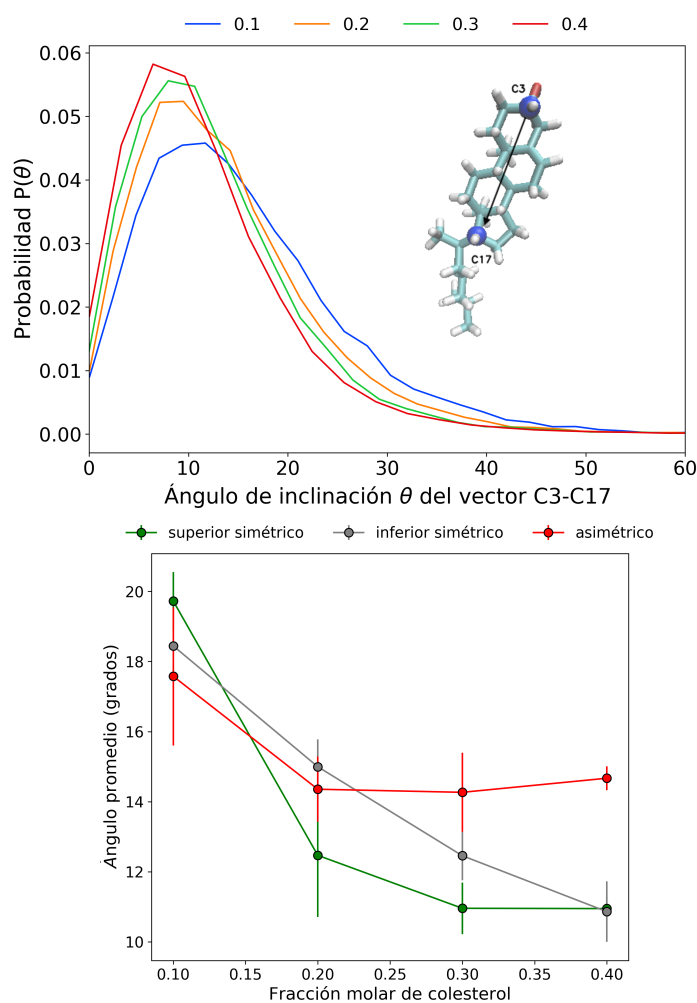


FIGURA 4.27: Ángulo de inclinación del colesterol: El panel superior muestra la función de densidad de probabilidad y el panel inferior muestra los ángulos promedio con sus respectivas desviaciones estándar.

colesterol, el grupo hidroxilo, los anillos y la cola del colesterol se desplazan desde el centro hacia la fase acuosa. Además, tal como lo indican las flechas, los grupos fosfato y colina de las moléculas de DPPC en la monocapa superior se extienden hasta el centro de la bicapa. Esta observación, puede ser explicada por la presencia de curvaturas en la membrana, por lo tanto, si el grupo polar se extiende hasta el centro, las cadenas hidrofóbicas se extienden hacia la monocapa inferior, explicando el desplazamiento del punto mínimo en la densidad electrónica del sistema desde el centro hasta la monocapa inferior cuando aumenta la concentración de colesterol.

Teniendo en cuenta las diferencias observadas entre las monocapas simétricas y asimétricas, es importante analizar el comportamiento de las áreas por DPPC y colesterol, así como el comportamiento del área libre y el número de lípidos en función de la distancia al centro de la bicapa. Como se puede observar en la figura 4.29, el área correspondiente a los átomos del DPPC en la monocapa superior (sin colesterol), pasa de tener dos picos en la bicapa pura de DPPC a tener un pico y una región estable cuando aumenta la concentración de colesterol. De igual forma, el área libre en la monocapa superior disminuye en la región hidrofóbica.

Además, considerando que la organización estructural de las monocapas de las

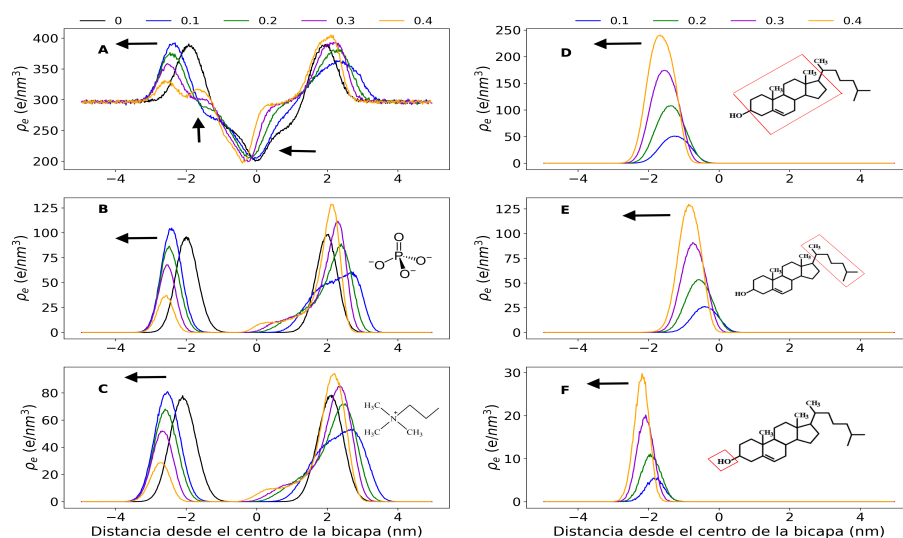


FIGURA 4.28: Densidad electrónica de las bicapas asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol: A) bicapa y fase acuosa, B) grupo fosfato del DPPC, C) grupo colina del DPPC, D) anillos del colesterol, E) cola del colesterol, F) grupo hidroxilo del colesterol. Los insertos corresponden a los átomos cuya densidad electrónica se muestra en cada cuadro.

bicapas asimétricas cambia ante el aumento en la concentración de colesterol, en las figuras 4.30 y 4.31 se evidencia que las propiedades elásticas no son la excepción, ya que tanto el módulo de compresibilidad del área como el módulo de rigidez son menores en las bicapas asimétricas que en las simétricas cuando la concentración de colesterol es 30 o 40 %, pero es mayor en 20 % y muy similar a las bicapas simétricas cuando la concentración de colesterol es 10 %

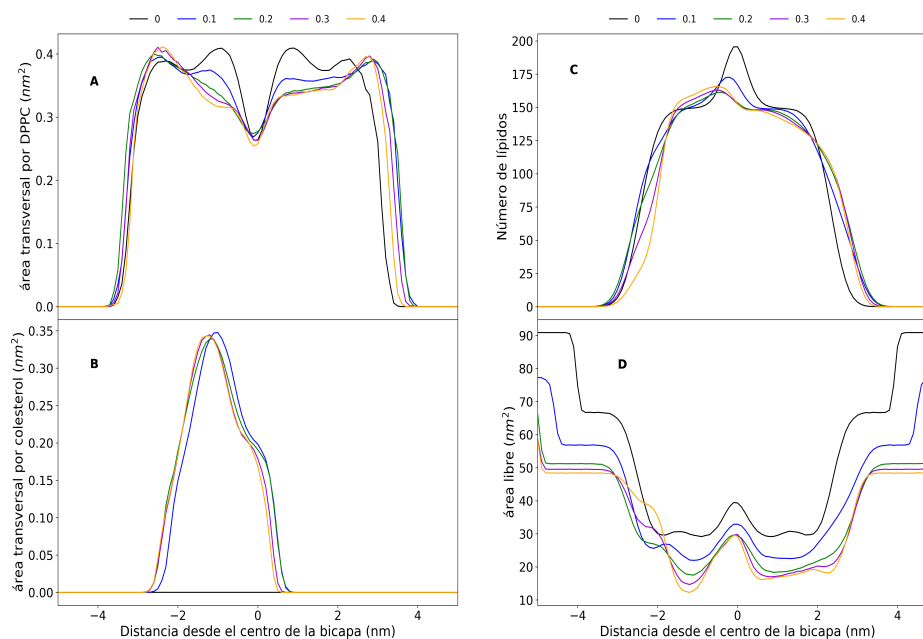


FIGURA 4.29: Áreas transversales del DPPC y colesterol, área libre y número de lípidos en función de las distancia al centro de la bicapa para diferentes fracciones molares de colesterol en las bicapas asimétricas

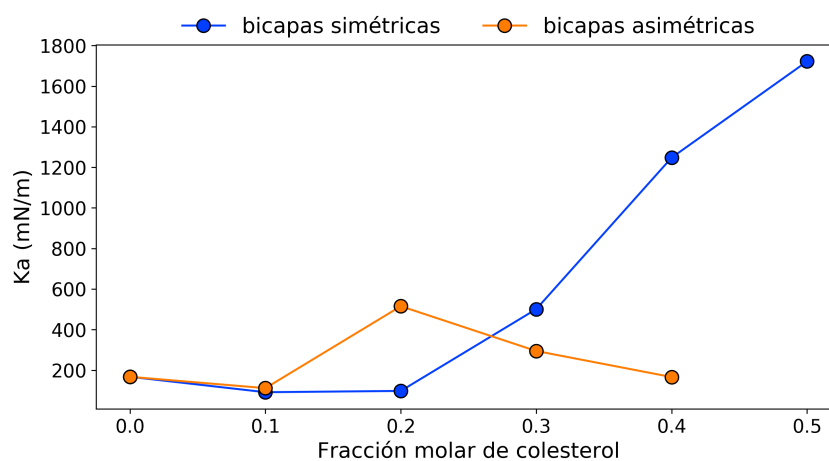


FIGURA 4.30: Módulo de compresibilidad del área para las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol.

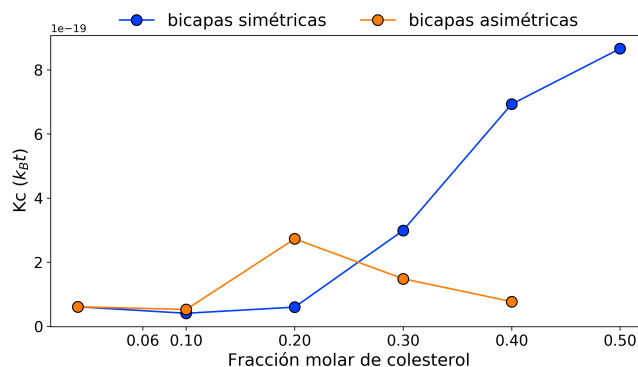


FIGURA 4.31: Módulo de rigidez para las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol.

4.4. Efecto del colesterol en bicapas asimétricas de DPPC y colesterol a 310.15 K

En la figura 4.32, se muestran las áreas por lípido calculadas por el método Voronoi para cada monocapa (Inf y Sup) de las bicapas simétricas y asimétricas a 310.15 K. En esta figura, se destacan los siguientes aspectos: Primero, las áreas por DPPC y las áreas por colesterol en cada monocapa de las bicapas simétricas son iguales. Segundo, aunque las áreas por DPPC en la monocapa superior (sin colesterol) disminuyen a medida que aumenta la concentración de colesterol, este patrón no se mantiene para todas las concentraciones de colesterol en la monocapa inferior (con colesterol), ya que el área por DPPC en esta monocapa aumenta entre 6 y 10 % de colesterol y entre 30 y 40 % de colesterol.

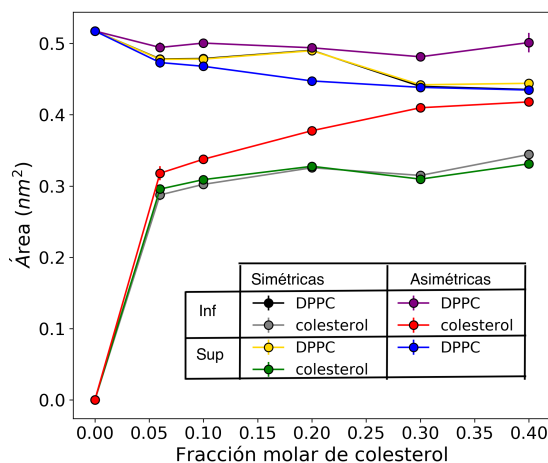


FIGURA 4.32: Área por lípido y áreas por DPPC y colesterol de las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol. Inf y Sup corresponden a las monocapas inferiores y superiores, respectivamente.

Por otra parte, en la figura 4.33 se observa que el espesor de la bicapa es igual para las bicapas simétricas y asimétricas entre 6 y 20 %, y a partir del 30 % de colesterol se observa una diferencia entre las bicapas simétricas y asimétricas, ya que a partir de esta concentración de colesterol, el espesor de la bicapa disminuye, pero las

bicapas asimétricas presentan espesores significativamente menores que las bicapas simétricas.

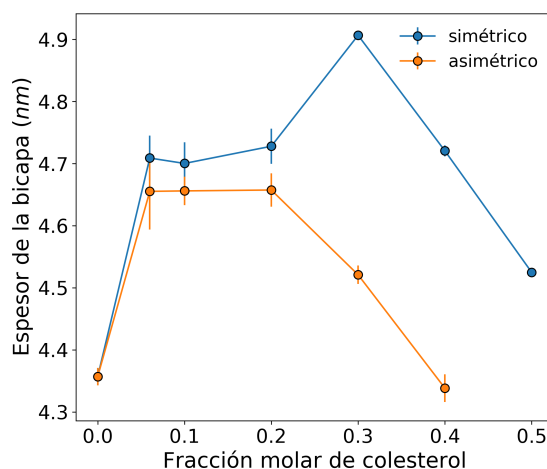


FIGURA 4.33: Espesor de la bicapa de las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol.

Adicionalmente, la figura 4.34 muestra para cada concentración de colesterol el parámetro de orden de las cadenas alifáticas S_{n1} y S_{n2} en cada monocapa de las bicapas simétricas y asimétricas. Teniendo en cuenta que el área por DPPC en la monocapa superior es menor que en la inferior para todas las concentraciones de colesterol evaluadas, se espera que la monocapa superior presente un ordenamiento mayor que la monocapa inferior. Sin embargo, tal como se observa en la figura 4.34, esto solo sucede para las concentraciones de colesterol iguales o mayores al 20 %

Al analizar el efecto de la concentración de colesterol en el parámetro de orden de cada monocapa de las bicapas asimétricas en comparación con las bicapas simétricas, la figura 4.35 permite visualizar claramente que en las monocapas inferiores el alineamiento de las cadenas hidrofóbicas del DPPC es menor que en el caso de la bicapa pura de DPPC, mientras que en la monocapas superiores se observa que cuando la concentración de colesterol es 30 % o 40 %, los carbonos 10 a 16 presentan mayor alineamiento respecto al vector normal a la bicapa en comparación con las bicapas simétricas correspondientes.

Respecto a los ángulos de inclinación del DPPC con respecto al eje normal a la bicapa (ver figura 4.36), se observa que en la monocapa superior de las bicapas asimétricas el ángulo promedio es igual en todas las concentraciones de colesterol, mientras que en la monocapa inferior, aunque el ángulo promedio no cambia, la distribución muestra que a medida que aumenta la concentración de colesterol, aumenta la probabilidad de que el DPPC adopte un ángulo menor 75 grados y disminuye la probabilidad de adoptar un ángulo mayor a 75 grados, lo que sugiere que la asimetría del colesterol genera la alineación del grupo polar del DPPC para un mayor número de moléculas de DPPC a medida que aumenta la concentración del colesterol.

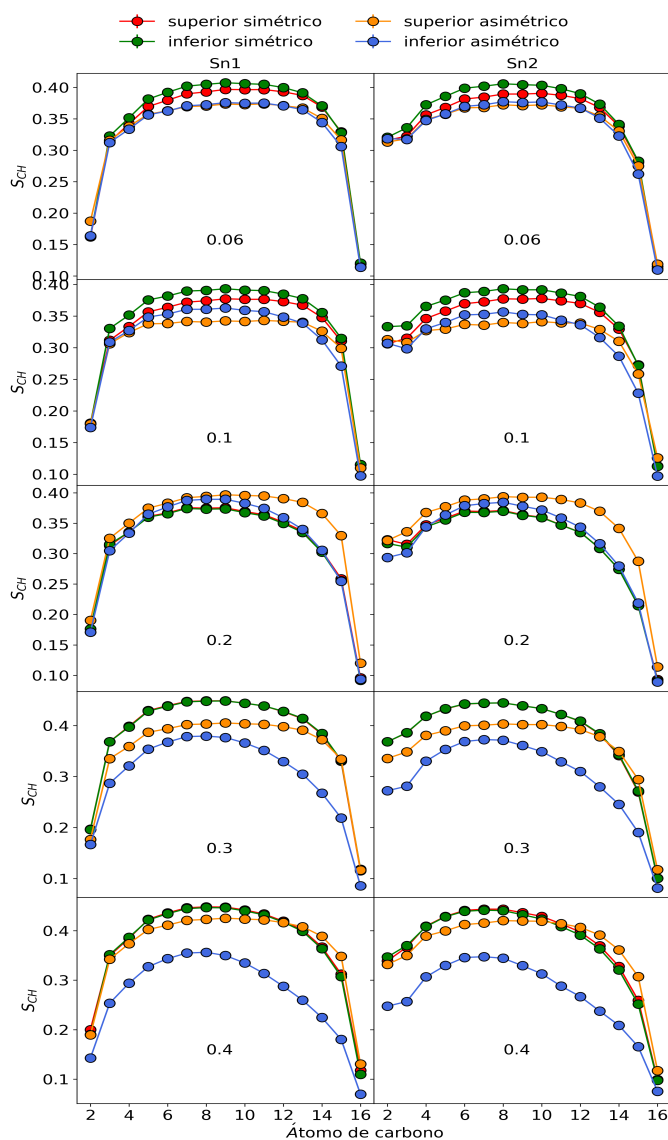


FIGURA 4.34: Parámetros de orden promedio para las bicapas simétricas y asimétricas: A) monocapas superiores de las bicapas simétricas, B) monocapa superior de las bicapas asimétricas, C) monocapa inferior de las bicapas asimétricas.

Por otra parte, la alineación del colesterol respecto al eje normal a la bicapa (ver figura 4.37) es mayor en las bicapas simétricas cuando la concentración de colesterol es 6% o cuando es mayor o igual a 30%, lo cual coincide con los patrones de alineamiento de las cadenas alifáticas del DPPC en las monocapa inferior de las bicapas asimétricas.

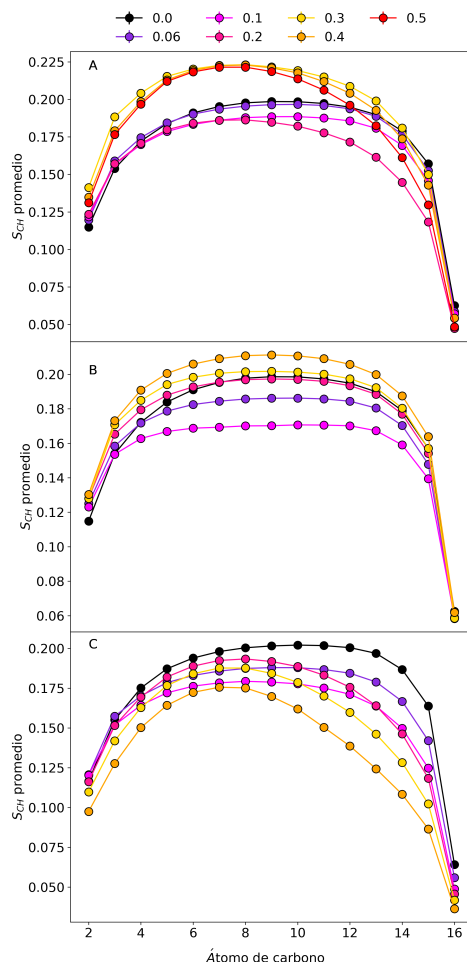


FIGURA 4.35: Parámetros de orden para las bicapas simétricas y asimétricas: El panel de la A corresponde a las bicapas simétricas, el panel B es la monocapa superior de las bicapas asimétricas y el panel C es la monocapa inferior de las bicapas asimétricas.

Por otra parte, en el perfil de densidad electrónica (ver figura 4.38) se observa que el colesterol se desplaza desde el centro de la bicapa hasta la fase acuosa a medida que aumenta la concentración de colesterol. Además, se observan diferencias en el rango de distribución de los grupos fosfato y colina entre ambas monocapas, ya que los que se encuentran en la monocapa superior tienen una mayor densidad en el centro de la bicapa que los que se encuentran en la monocapa inferior, lo que podría contribuir al desplazamiento del punto mínimo de la densidad de la bicapa hacia la monocapa inferior. Una posible explicación para las observaciones anteriores, es la formación de curvaturas en la membrana, ya que de esta forma algunas de las moléculas de DPPC de la monocapa superior podrían desplazarse hasta el centro hidrofóbico de la bicapa.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, el área libre y el número de lípidos a lo largo del eje z como se muestra en la figura 4.39, coinciden con los resultados de las densidades electrónicas, ya que por una parte, el punto máximo del número de lípidos se desplaza hacia la monocapa inferior a medida que aumenta la concentración de colesterol, mientras que la distribución del área libre sugiere que en las monocapas superiores el área libre en la región donde se ubican el grupo polar del DPPC es menor que el área libre de la bicapa pura de DPPC.

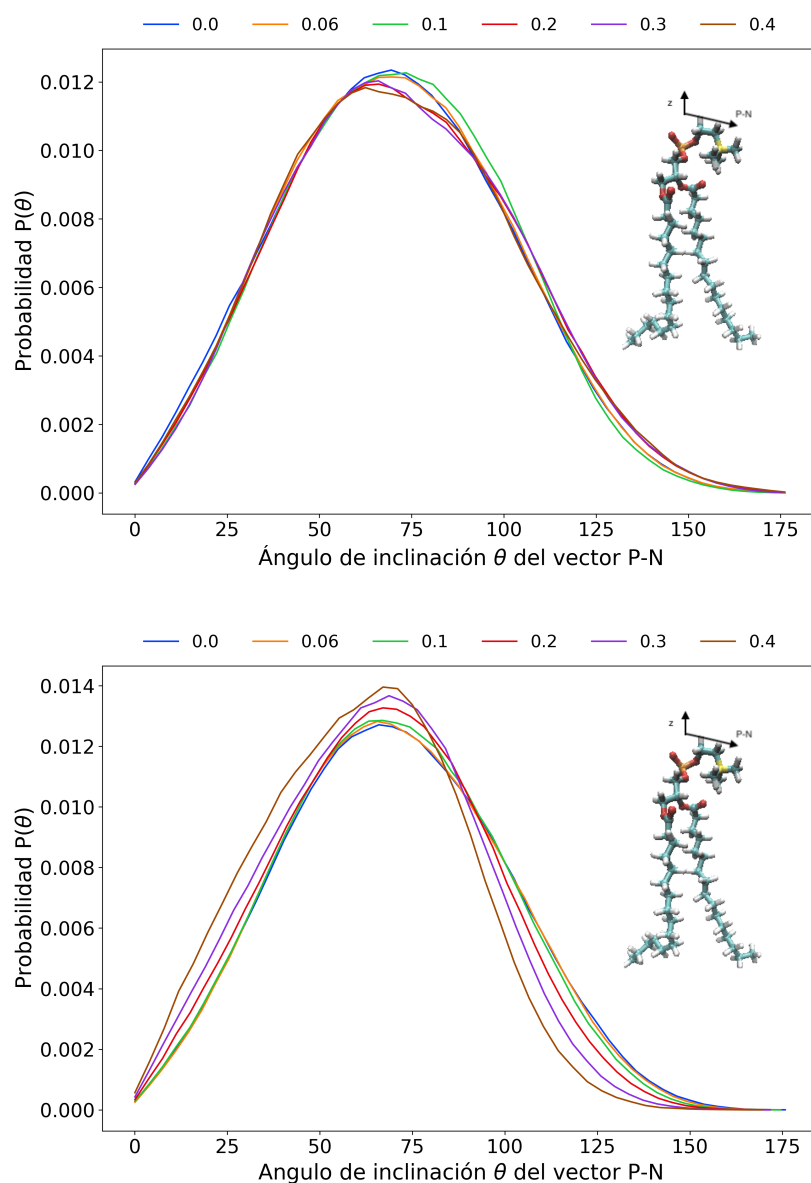


FIGURA 4.36: Ángulo de inclinación del vector P-N del DPPC con respecto al eje normal a la bicapa: El panel superior corresponde a las moléculas de DPPC en la monocapa superior y el panel inferior corresponde a las moléculas de DPPC en la monocapa inferior. El inserto en cada uno de los paneles corresponde a una molécula de DPPC donde el átomo naranja es el fósforo y el átomo amarillo es el nitrógeno.

Respecto a las áreas transversales del DPPC y colesterol a través del eje z , estas no presentan mayores cambios cuando aumenta la concentración del colesterol y se observan patrones similares a los de densidad electrónica

Finalmente, las propiedades mecánicas presentadas en las figuras 4.40 y 4.31, son claramente diferentes entre las bicapas simétricas y asimétricas, resaltando que la mayor diferencia se presenta a concentraciones mayores o iguales a 30 %, ya que en los sistemas simétricos la rigidez e interacciones entre los lípidos aumenta, mientras que en las bicapas asimétricas disminuye.

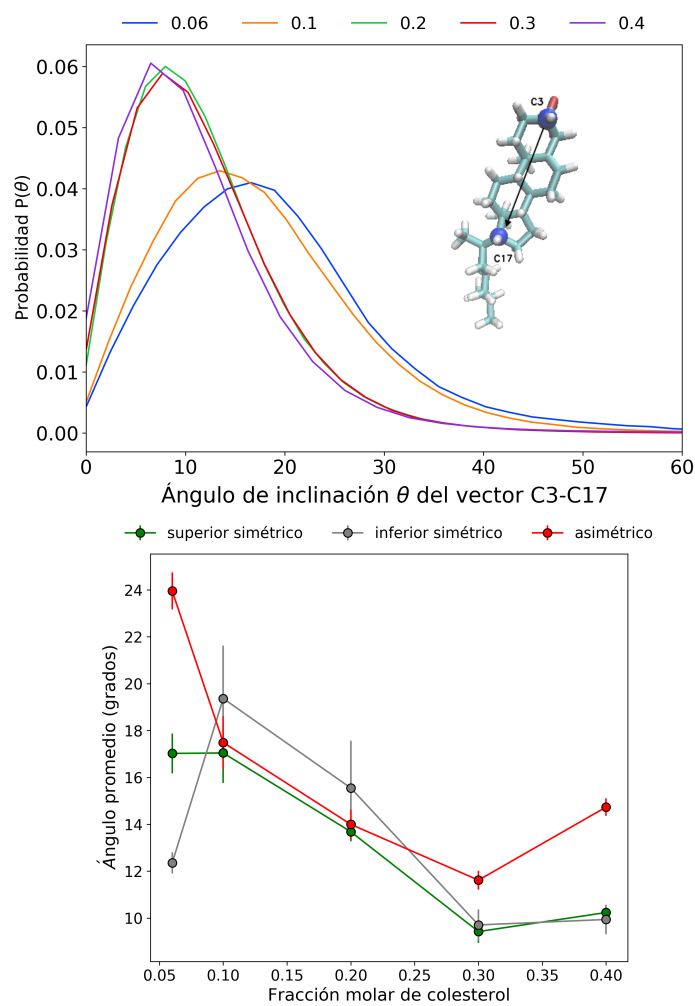


FIGURA 4.37: Ángulo de inclinación del colesterol con respecto al eje normal a la bicapa: El panel superior muestra la función de densidad de probabilidad y el panel inferior muestra los ángulos promedio con sus respectivas desviaciones estándar.

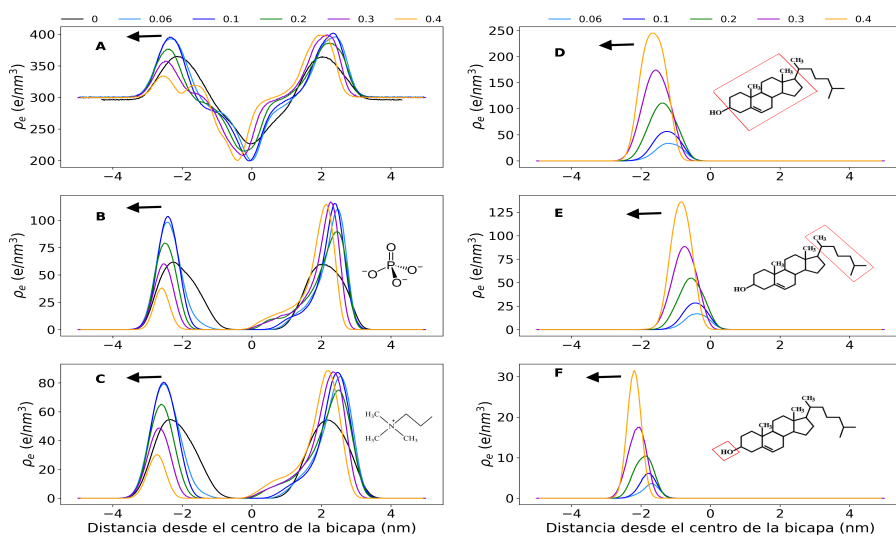


FIGURA 4.38: Densidad electrónica a diferentes fracciones molares de colesterol: A) bicapa y fase acuosa, B) grupo fosfato del DPPC, C) grupo colina del DPPC, D) anillos del colesterol, E) cola del colesterol, F) grupo hidroxilo del colesterol. Los insertos corresponden a los átomos cuya densidad electrónica se muestra en cada cuadro.

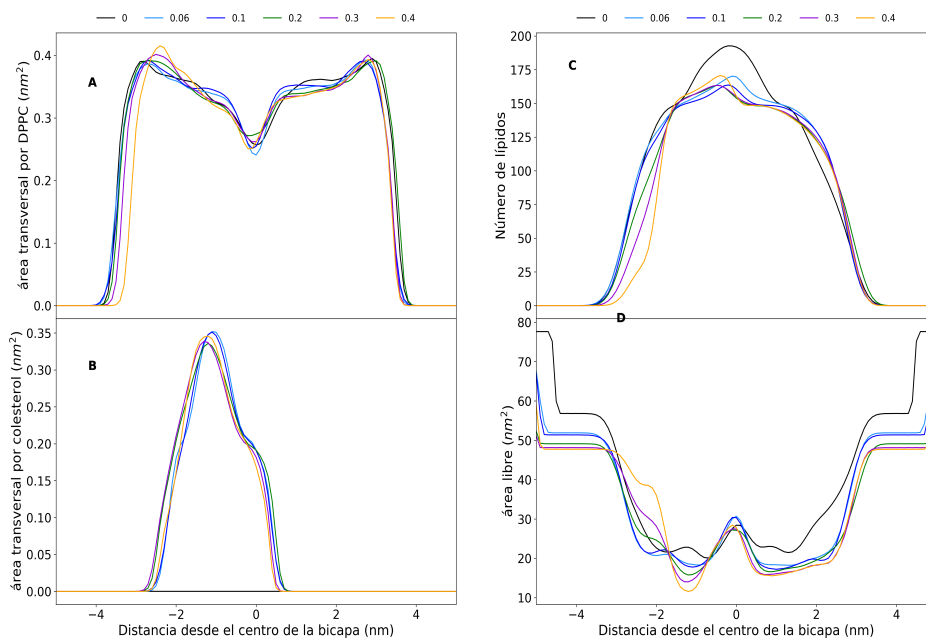


FIGURA 4.39: Áreas transversales del DPPC y colesterol, área libre y número de lípidos en función de las distancia al centro de la bicapa para diferentes fracciones molares de colesterol en las bicapas asimétricas a 310.15 K

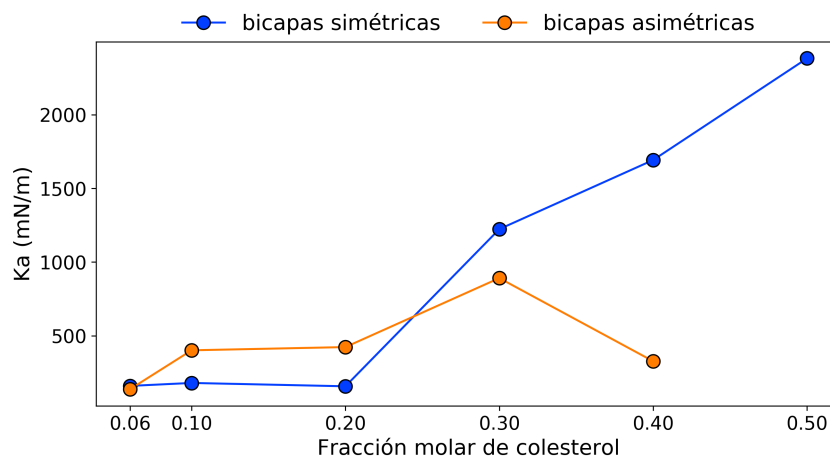


FIGURA 4.40: Módulo de compresibilidad del área para las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol.

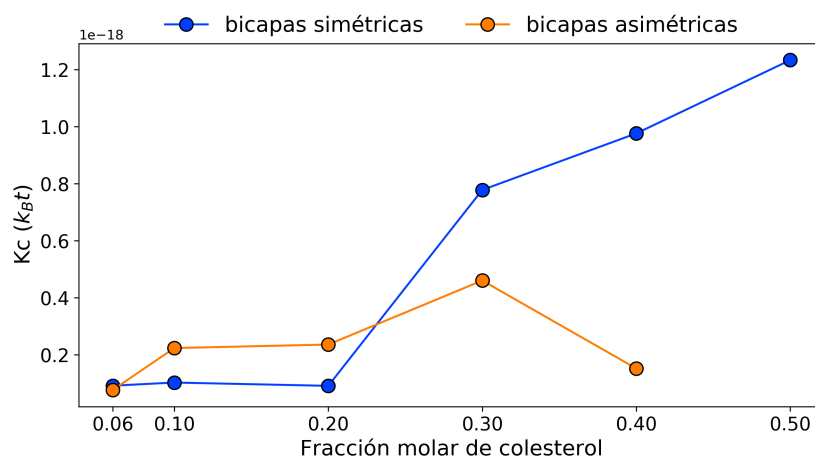


FIGURA 4.41: Módulo de rigidez para las bicapas simétricas y asimétricas a diferentes fracciones molares de colesterol.

Capítulo 5

Conclusiones y trabajo futuro

Según los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye que los campos de fuerza charmm36 y tip3 reproducen el comportamiento mecánico y organización estructural de las bicapas simétricas de DPPC y colesterol a 323 K, ya que se obtuvieron buenas aproximaciones respecto a los valores experimentales para algunas de las propiedades evaluadas.

Por otra parte, tanto los resultados de las bicapas simétricas a 310.15 K, coinciden con el comportamiento mecánico de bicapas soportadas de DPPC y colesterol medido por AFM, ya que a concentraciones bajas de colesterol la bicapa tiene un comportamiento elástico, mientras que a concentraciones altas presenta un comportamiento viscoelástico.

Finalmente, las simulaciones de bicapas asimétricas, permiten concluir que la distribución asimétrica del colesterol tiene un efecto indirecto en la organización de la monocapa donde no está presente y que ambas monocapas de las bicapas asimétricas presentan diferencias en su organización estructural y comportamiento mecánico.

Teniendo en cuenta estos resultados y la importancia del colesterol en la biología celular, se podrían desarrollar investigaciones futuras enfocadas en el estudio del efecto de la asimetría del colesterol en bicapas con varios tipos de fosfolípidos

Bibliografía

- [1] A. Verkleij, R. Zwaal, B Roelofsen, P Comfurius, D Kastelijn y L. Van Deenen, "The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 323, n.º 2, págs. 178-193, 1973.
- [2] V. A. Fadok, D. Voelker, P. Campbell, J. Cohen, D. Bratton y P. Henson, "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.," *The Journal of Immunology*, vol. 148, n.º 7, págs. 2207-2216, 1992.
- [3] Y Tanaka y A. Schroit, "Insertion of fluorescent phosphatidylserine into the plasma membrane of red blood cells. Recognition by autologous macrophages.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 258, n.º 18, págs. 11 335-11 343, 1983.
- [4] E. M. Bevers, P. Comfurius, J. L. van Rijn, H. C. Hemker, F Robert y A ZWAAL, "Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets," *European journal of biochemistry*, vol. 122, n.º 2, págs. 429-436, 1982.
- [5] A. Hossein y M. Deserno, "Spontaneous curvature, differential stress, and bending modulus of asymmetric lipid membranes," *Biophysical Journal*, vol. 118, n.º 3, págs. 624-642, 2020.
- [6] S. Pautot, B. J. Frisken y D. Weitz, "Engineering asymmetric vesicles," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, n.º 19, págs. 10 718-10 721, 2003.
- [7] M. Blumer, S. Harris, M. Li, L. Martinez, M. Untereiner, P. N. Saeta, T. S. Carpenter, H. I. Ingólfsson y W. Bennett, "Simulations of Asymmetric Membranes Illustrate Cooperative Leaflet Coupling and Lipid Adaptability," *Frontiers in cell and developmental biology*, vol. 8, págs. 575, 2020.
- [8] J. Tian, J. Nickels, J. Katsaras y X. Cheng, "Behavior of bilayer leaflets in asymmetric model membranes: atomistic simulation studies," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 120, n.º 33, págs. 8438-8448, 2016.
- [9] S. Yesylevskyy, A. Demchenko, S Kraszewski y C Ramseyer, "Cholesterol induces uneven curvature of asymmetric lipid bilayers," *The Scientific World Journal*, vol. 2013, 2013.
- [10] S. Bottaro y K. Lindorff-Larsen, "Biophysical experiments and biomolecular simulations: A perfect match," *Science*, vol. 361, n.º 6400, págs. 355-360, 2018.
- [11] W Gibson Wood, U. Igbavboa, W. E. Müller y G. P. Eckert, "Cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes," *Journal of neurochemistry*, vol. 116, n.º 5, págs. 684-689, 2011.
- [12] G. Van Meer, D. R. Voelker y G. W. Feigenson, "Membrane lipids: where they are and how they behave," *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 9, n.º 2, págs. 112-124, 2008.

- [13] G. van Meer, "Dynamic transbilayer lipid asymmetry," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 3, n.º 5, a004671, 2011.
- [14] A. Zachowski, "Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement," *Biochemical Journal*, vol. 294, n.º 1, págs. 1-14, 1993.
- [15] B. Fadeel y D. Xue, "The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease," *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, vol. 44, n.º 5, págs. 264-277, 2009.
- [16] P. F. Devaux, "Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes," *Biochemistry*, vol. 30, n.º 5, págs. 1163-1173, 1991.
- [17] V. E. Kagan, B. Gleiss, Y. Y. Tyurina, V. A. Tyurin, C. Elenström-Magnusson, S.-X. Liu, F. B. Serinkan, A. Arroyo, J. Chandra, S. Orrenius y col., "A role for oxidative stress in apoptosis: oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis," *The Journal of Immunology*, vol. 169, n.º 1, págs. 487-499, 2002.
- [18] E. Braun, J. Gilmer, H. B. Mayes, D. L. Mobley, J. I. Monroe, S. Prasad y D. M. Zuckerman, "Best practices for foundations in molecular simulations [Article v1. 0]," *Living journal of computational molecular science*, vol. 1, n.º 1, 2019.
- [19] R. Pastor y A. MacKerell Jr, "Development of the CHARMM force field for lipids," *The journal of physical chemistry letters*, vol. 2, n.º 13, págs. 1526-1532, 2011.
- [20] L. Monticelli y D. P. Tieleman, "Force fields for classical molecular dynamics," en *Biomolecular simulations*, Springer, 2013, págs. 197-213.
- [21] T. Schlick, *Molecular modeling and simulation: an interdisciplinary guide*. Springer Science & Business Media, 2010, vol. 21.
- [22] M. Masetti y W. Rocchia, "Molecular mechanics and dynamics: numerical tools to sample the configuration space," *Front. Biosci*, vol. 1, págs. 578-604, 2014.
- [23] J. Lee, X. Cheng, J. M. Swails, M. S. Yeom, P. K. Eastman, J. A. Lemkul, S. Wei, J. Buckner, J. C. Jeong, Y. Qi y col., "CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field," *Journal of chemical theory and computation*, vol. 12, n.º 1, págs. 405-413, 2016.
- [24] F. Sajadi y C. N. Rowley, "Simulations of lipid bilayers using the CHARMM36 force field with the TIP3P-FB and TIP4P-FB water models," *PeerJ*, vol. 6, e5472, 2018.
- [25] S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M. R. Shirts, J. C. Smith, P. M. Kasson, D. van der Spoel y col., "GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit," *Bioinformatics*, vol. 29, n.º 7, págs. 845-854, 2013.
- [26] S. Moradi, A. Nowroozi y M. Shahlaei, "Shedding light on the structural properties of lipid bilayers using molecular dynamics simulation: a review study," *RSC advances*, vol. 9, n.º 8, págs. 4644-4658, 2019.
- [27] O. Edholm y J. F. Nagle, "Areas of molecules in membranes consisting of mixtures," *Biophysical journal*, vol. 89, n.º 3, págs. 1827-1832, 2005.

- [28] M. G. Alinchenko, V. P. Voloshin, N. N. Medvedev, M. Mezei, L. Pártay y P. Jedlovsky, "Effect of cholesterol on the properties of phospholipid membranes. 4. Interatomic voids," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, n.º 34, págs. 16 490-16 502, 2005.
- [29] T. D. Romo, N. Leioatts y A. Grossfield, "Lightweight object oriented structure analysis: tools for building tools to analyze molecular dynamics simulations," *Journal of computational chemistry*, vol. 35, n.º 32, págs. 2305-2318, 2014.
- [30] T. J. Piggot, A. Pineiro y S. Khalid, "Molecular dynamics simulations of phosphatidylcholine membranes: a comparative force field study," *Journal of chemical theory and computation*, vol. 8, n.º 11, págs. 4593-4609, 2012.
- [31] J. Pan, S. Tristram-Nagle y J. F. Nagle, "Effect of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation," *Physical Review E*, vol. 80, n.º 2, pág. 021 931, 2009.
- [32] F. de Meyer y B. Smit, "Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, n.º 10, págs. 3654-3658, 2009.
- [33] M. Alwarawrah, J. Dai y J. Huang, "A molecular view of the cholesterol condensing effect in DOPC lipid bilayers," *The journal of physical chemistry B*, vol. 114, n.º 22, págs. 7516-7523, 2010.
- [34] W.-C. Hung, M.-T. Lee, F.-Y. Chen y H. W. Huang, "The condensing effect of cholesterol in lipid bilayers," *Biophysical journal*, vol. 92, n.º 11, págs. 3960-3967, 2007.
- [35] F. Leeb y L. Maibaum, "Spatially resolving the condensing effect of cholesterol in lipid bilayers," *Biophysical journal*, vol. 115, n.º 11, págs. 2179-2188, 2018.
- [36] G. Khelashvili y D. Harries, "How sterol tilt regulates properties and organization of lipid membranes and membrane insertions," *Chemistry and physics of lipids*, vol. 169, págs. 113-123, 2013.
- [37] E. Falck, M. Patra, M. Karttunen, M. T. Hyvönen e I. Vattulainen, "Lessons of slicing membranes: interplay of packing, free area, and lateral diffusion in phospholipid / cholesterol bilayers," *Biophysical journal*, vol. 87, n.º 2, págs. 1076-1091, 2004.
- [38] C. Hofsäß, E. Lindahl y O. Edholm, "Molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers with cholesterol," *Biophysical journal*, vol. 84, n.º 4, págs. 2192-2206, 2003.
- [39] J. F. Nagle y S. Tristram-Nagle, "Structure of lipid bilayers," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, vol. 1469, n.º 3, págs. 159-195, 2000.
- [40] A. M. Smondyrev y M. L. Berkowitz, "Molecular dynamics simulation of the structure of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers with cholesterol, ergosterol, and lanosterol," *Biophysical journal*, vol. 80, n.º 4, págs. 1649-1658, 2001.
- [41] Y. Wang, P. Gkeka, J. E. Fuchs, K. R. Liedl y Z. Cournia, "DPPC-cholesterol phase diagram using coarse-grained Molecular Dynamics simulations," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1858, n.º 11, págs. 2846-2857, 2016.
- [42] Z. Al-Rekabi y S. Contera, "Multifrequency AFM reveals lipid membrane mechanical properties and the effect of cholesterol in modulating viscoelasticity," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 115, n.º 11, págs. 2658-2663, 2018.

-
- [43] Y. Zhang, A. Lervik, J. Seddon y F. Bresme, "A coarse-grained molecular dynamics investigation of the phase behavior of DPPC/cholesterol mixtures," *Chemistry and physics of lipids*, vol. 185, págs. 88-98, 2015.
- [44] G. Khelashvili y D. Harries, "How cholesterol tilt modulates the mechanical properties of saturated and unsaturated lipid membranes," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 117, n.º 8, págs. 2411-2421, 2013.