



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE FÍSICA Y MATEMÁTICA**

**EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO NO IDEAL DE UNA  
BICAPA LIPÍDICA DE DPPC Y DPPS CON DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE COLESTEROL USANDO DINÁMICA  
MOLECULAR**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL**

Previo a la obtención del título de:

**BIOFÍSICA**

**AUTORA: KATHERINE ESTEFANY VENEGAS GUAMÁN**

**TUTORA: BIOF. DALINDA ILEANA QUINGATUÑA CALI**

Riobamba-Ecuador

2018

© 2018, Katherine Estefany Venegas Guamán

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE FÍSICA Y MATEMÁTICA**  
**CARRERA: BIOFÍSICA**

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo experimental: EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO NO IDEAL DE UNA BICAPA LIPÍDICA DE DPPC Y DPPS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COLESTEROL USANDO DINÁMICA MOLECULAR, de responsabilidad de la señorita Katherine Estefany Venegas Guamán, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Biof. Dalinda Quingatuña Cali <b>DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>	_____	_____
Dr. Robert Cazar Ramírez <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>	_____	_____
Dr. Bolívar Flores Humanante <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>	_____	_____

Yo, Katherine Estefany Venegas Guamán soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del mismo pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Katherine Estefany Venegas Guamán

## **DEDICATORIA**

A Dios por guiar mi camino, por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mis padres, por ser las personas más importantes en mi vida, por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional en todo momento. A mi hermana Valeria y a mi sobrino Jareth, por todos los momentos compartidos de mucha felicidad. Todos mis logros son por ustedes y para ustedes, los amo.

Katherine

## **AGRADECIMIENTO**

A mi familia, por apoyarme en todo momento.

A la Biof. Dalinda Quingatuña y al Dr. Robert Cazar, por su colaboración permanente y asesoramiento en este trabajo.

Al Dr. Wilian Bravo por su guía y ayuda para llevar a cabo este trabajo de titulación.

Al Grupo de Química Computacional y Teórica de la Universidad San Francisco de Quito, por abrirme sus puertas y reforzar mis conocimientos sobre esta investigación.

Al Grupo Ecuatoriano de Investigación Experimental y Teórica de Nanosistemas (GETNano) de la ESPOCH por brindarme las herramientas necesarias para el desarrollo de este trabajo de titulación.

A mis amigos por confiar en mí y apoyarme incondicionalmente.

Katherine

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
INTRODUCCIÓN .....	1
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1 MARCO REFERENCIAL .....</b>	<b>2</b>
1.1 Identificación del Problema.....	2
1.2 Formulación del Problema .....	2
1.3 Justificación del Problema.....	3
1.4 Antecedentes .....	3
1.5 Objetivos .....	5
1.5.1 <i>Objetivo general</i> .....	5
1.5.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	5
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>2 MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>6</b>
2.1 Dinámica Molecular .....	6
2.1.1 <i>Principio Físico</i> .....	7
2.1.2 <i>Algoritmos de integración numérica</i> .....	7
2.1.3 <i>Campos de Fuerza (Force Fields FF)</i> .....	8
2.1.4 <i>Interacciones Electrostáticas</i> .....	10
2.1.5 <i>Condiciones de frontera</i> .....	11
2.1.6 <i>Ensamblés</i> .....	11
2.2 Membranas biológicas .....	11
2.2.1 <i>Componentes de la membrana</i> .....	12
2.2.2 <i>Bicapa lipídica</i> .....	16
2.3 Efecto de condensación del colesterol en bicapas lipídicas .....	18

2.3.1	<i>Área molecular</i> .....	19
2.3.2	<i>Tensión Superficial</i> .....	20
2.3.3	<i>Elasticidad de Gibbs</i> .....	21

### CAPÍTULO III

3	<b>DISEÑO Y EXPERIMENTACIÓN</b> .....	22
3.1	<b>Recursos computacionales</b> .....	22
3.2	<b>Software</b> .....	22
3.3	<b>Fosfolípidos de la bicapa lipídica</b> .....	23
3.3.1	<i>DPPC</i> .....	23
3.3.2	<i>DPPS</i> .....	24
3.4	<b>Construcción y Dinámica Molecular de modelos moleculares</b> .....	24
3.5	<b>Cálculo del área molecular, presión superficial y elasticidad de Gibbs</b> .....	26
3.5.1	<i>Área molecular</i> .....	27
3.5.2	<i>Tensión Superficial</i> .....	27
3.5.3	<i>Elasticidad de Gibbs</i> .....	28

### CAPÍTULO IV

4	<b>ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	29
4.1	<b>Construcción y Dinámica Molecular de modelos moleculares</b> .....	29
4.2	<b>Cálculo de área molecular, tensión superficial y elasticidad de Gibbs</b> .....	44
4.2.1	<i>Área molecular</i> .....	44
4.2.2	<i>Tensión Superficial</i> .....	45
4.2.3	<i>Elasticidad de Gibbs</i> .....	48
4.3	<b>Comparación de resultados obtenidos con resultados experimentales</b> .....	49
4.3.1	<i>Comparación del área molecular con resultados experimentales</i> .....	50
4.3.2	<i>Comparación de la presión superficial con resultados experimentales</i> .....	51
4.3.3	<i>Comparación de la elasticidad de Gibbs con resultados experimentales</i> .....	51
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	53

**RECOMENDACIONES..... 55**

**BIBLIOGRAFÍA**

**ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-2:</b> Descripción de términos de la expresión generalizada del Campo de Fuerza molecular. ....	9
<b>Tabla 2-2:</b> Porcentaje de lípidos totales en peso. ....	16
<b>Tabla 1-3:</b> Características del DPPC. ....	24
<b>Tabla 2-3:</b> Características del DPPS. ....	24
<b>Tabla 3-3:</b> Número de moléculas de lípidos. ....	25
<b>Tabla 1-4:</b> Tamaño de los sistemas determinados. ....	29
<b>Tabla 2-4:</b> Valores promedio del área molecular de cada una de las simulaciones. ....	44
<b>Tabla 3-4:</b> Valores de tensión superficial promedio $\gamma_s$ de cada una de las simulaciones. ....	45
<b>Tabla 4-4:</b> Valores de la isoterma presión superficial $\pi$ – y el área por lípido $A_L$ . ....	48
<b>Tabla 5-4:</b> Valores de la elasticidad de Gibbs promedio $\epsilon$ y el área por lípido. ....	49
<b>Tabla 6-4:</b> Comparación del Área molecular. ....	50
<b>Tabla 7-4:</b> Comparación de la Presion superficial $\pi$ . ....	51
<b>Tabla 8-4:</b> Comparación de la elasticidad de Gibbs $\epsilon$ . ....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-2:</b> Esquema de una simulación de Dinámica molecular.....	6
<b>Figura 2-2:</b> Esquema de los términos de los campos de fuerzas.....	10
<b>Figura 3-2:</b> Representación esquemática de una membrana biológica.....	12
<b>Figura 4-2:</b> Estructura de una molécula de glucolípidio.....	13
<b>Figura 5-2:</b> Partes de una molécula de fosfolípido.....	14
<b>Figura 6-2:</b> Estructura de fosfolípidos principales en membranas plasmáticas de mamíferos. .	14
<b>Figura 7-2:</b> Disposición de empaquetado de moléculas de lípidos en un entorno acuoso.....	15
<b>Figura 8-2:</b> Estructura química del Colesterol.....	15
<b>Figura 9-2:</b> Esquema de la Dinámica de los lípidos de membrana.....	17
<b>Figura 1-3:</b> Fórmula estructural de DPPC.....	23
<b>Figura 2-3:</b> Fórmula estructural de DPPS.....	24
<b>Figura 3-3:</b> Esquema de CHAMR-GUI.....	24
<b>Figura 4-3:</b> Laminas de pseudoesferas.....	25
<b>Figura 1-4:</b> Reemplazo de psuedoesferas por las cabezas hidrofílicas de los lípidos.....	30
<b>Figura 2-4:</b> Generación de iones Na en el sistema.....	30
<b>Figura 3-4:</b> Generación de moléculas de agua en el sistema.....	31
<b>Figura 4-4:</b> Representación molecular del sistema 80% DPPC – 20% DPPS después de 10 ns de simulación.....	39
<b>Figura 5-4:</b> Representación del sistema molecular 68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1 después de 10 ns de simulación.....	40
<b>Figura 6-4:</b> Representación molecular del sistema 56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1 después de 10 ns de simulación.....	41
<b>Figura 7-4:</b> Representación molecular del sistema 40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1 después de 10 ns de simulación.....	42
<b>Figura 8-4:</b> Representación molecular del sistema 24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1 después de 10 ns de simulación.....	43

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-4:</b> Disminución de la energía potencial de los 5 modelos moleculares. ....	32
<b>Gráfico 2-4:</b> Temperatura del sistema 80% DPPC – 20% DPPS.....	33
<b>Gráfico 3-4:</b> Temperatura del sistema 68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1. ....	33
<b>Gráfico 4-4:</b> Temperatura del sistema 56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1. ....	34
<b>Gráfico 5-4:</b> Temperatura del sistema 40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1. ....	34
<b>Gráfico 6-4:</b> Temperatura del sistema 24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1. ....	35
<b>Gráfico 7-4:</b> Presión del sistema 80% DPPC – 20% DPPS. ....	36
<b>Gráfico 8-4:</b> Presión del sistema 68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1.....	36
<b>Gráfico 9-4:</b> Presión del sistema 56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1.....	37
<b>Gráfico 10-4:</b> Presión del sistema 40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1.....	37
<b>Gráfico 11-4:</b> Presión del sistema 24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1.....	38
<b>Gráfico 12-4:</b> Área molecular de las 5 simulaciones de bicapas lipídicas a los 10 ns. ....	44
<b>Gráfico 13-4:</b> Tensión superficial de la simulación de 80% DPPC – 20% DPPS. ....	45
<b>Gráfico 14-4:</b> Tensión superficial de la simulación de 68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1. .....	46
<b>Gráfico 15-4:</b> Tensión superficial de la simulación de 56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1. .....	46
<b>Gráfico 16-4:</b> Tensión superficial de la simulación de 40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1. .....	47
<b>Gráfico 17-4:</b> Tensión superficial de la simulación de 24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1. .....	47
<b>Gráfico 18-4:</b> Isoterma $\pi - A_L$ . ....	48
<b>Gráfico 19-4:</b> Elasticidad de Gibbs $\varepsilon$ con respecto al área por lípido. ....	49

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Anexo A:** Input step6.0\_minimization.mdp para la minimización de energía.

**Anexo B:** Inputs step6. [1-2] \_equilibration.mdp para el equilibrio NVT.

**Anexo C:** Inputs step6. [3-6]\_equilibration.mdp para el equilibrio NPT.

**Anexo D:** Input step7\_production.mdp para la producción.

**Anexo E:** Archivos de topología topol.top de los modelos moleculares.

## ABREVIATURAS

1.	<b>A:</b>	Área de la monocapa
2.	<b><math>A_L</math>:</b>	Área por lípido
3.	<b>CHL1:</b>	Colesterol
4.	<b>DPD:</b>	Dinámica de partículas disipativas
5.	<b>DPPC:</b>	Dipalmitoilfosfatidilcolina
6.	<b>DPPS:</b>	Dipalmitoilfosfatidilserina
7.	<b><math>E_{pot}</math>:</b>	Energía Potencial
8.	<b><math>\epsilon</math>:</b>	Elasticidad de Gibbs
9.	<b><math>F_i</math>:</b>	Fuerza de la partícula $i$
10.	<b>FF:</b>	Force Field (Campo de fuerza)
11.	<b>GROMACS:</b>	Groningen Machine for Chemical Simulations
12.	<b><math>m_i</math>:</b>	Masa de la partícula $i$
13.	<b>MD:</b>	Molecular Dynamics (Dinámica Molecular)
14.	<b>Na:</b>	Sodio
15.	<b>NaCl:</b>	Cloruro de sodio
16.	<b><math>N_{lipids}</math>:</b>	Número total de lípidos en la monocapa
17.	<b>NMR:</b>	Resonancia Magnética Nuclear
18.	<b>NPT:</b>	Ensamble Isotérmico – Isobárico
19.	<b>NVE:</b>	Ensamble Microcanónico
20.	<b>NVT:</b>	Ensamble Canónico
21.	<b>P:</b>	Presión
22.	<b>PME:</b>	Partícula Malla Ewald
23.	<b><math>\pi</math>:</b>	Presión superficial
24.	<b><math>r_i</math>:</b>	Coordenadas de la partícula $i$
25.	<b>SDS:</b>	Dodecil sulfato sódico
26.	<b>T:</b>	Temperatura
27.	<b>TIP3P:</b>	Modelo de agua
28.	<b><math>\gamma</math> ó <math>\gamma_s</math>:</b>	Tensión superficial
29.	<b><math>\gamma_0</math>:</b>	Tensión superficial agua/aire
30.	<b><math>\gamma_m</math>:</b>	Tensión superficial de la monocapa
31.	<b><math>\gamma_{wv}</math>:</b>	Tensión superficial de la interfase agua/vacío
32.	<b>V:</b>	Volumen

- 33. **VMD:** Visual Molecular Dynamics
- 34.  $\mathbf{v}_i$ : Velocidades de la partícula  $i$
- 35.  $V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$ : Función de potencial
- 36.  $\mathbf{x}_i$ : Posiciones de la partícula  $i$

## RESUMEN

Se usó Charmm-GUI para construir cinco modelos moleculares de bicapas lipídicas que contienen 200 lípidos de Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y Dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) con concentraciones de colesterol (CHL1) de 0, 15,30,50 y 70% para evaluar el comportamiento no ideal (efecto de condensación). Se realizaron una serie de simulaciones de Dinámica Molecular usando Gromacs, para lo cual se realizó la minimización de energía y el equilibramiento de los sistemas moleculares usando ensambles NVT y NPT a una temperatura de 315 K para un total de 10ns. Se determinó las variables: área molecular, tensión superficial y elasticidad de Gibbs para cada modelo. A medida que aumenta la concentración de colesterol disminuye el área molecular, la tensión superficial fluctúa. La presencia de colesterol afecta también la rigidez de las bicapas lipídicas. Se evaluó la elasticidad de Gibbs dando como resultado rigidez en la bicapa cuando esta tiene 70% de colesterol en su composición. El sistema con mayor flexibilidad fue la bicapa lipídica con 30% de colesterol. El comportamiento de la presión superficial y elasticidad de Gibbs de las simulaciones con respecto a los resultados experimentales son semejantes, demostrando el comportamiento no ideal del colesterol frente a los fosfolípidos afectando las propiedades de las bicapas lipídicas y por ende la funcionalidad de las células. Se recomienda profundizar el estudio de otros factores que determinan el comportamiento no ideal del colesterol frente a los fosfolípidos en las bicapas lipídicas.

**Palabras clave:** <CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES>, <BIOFÍSICA>, <BICAPA LIPÍDICA>, <DPPC>, <DPPS>, <COLESTEROL>, <EFECTO DE CONDENSACIÓN>, <COMPORTAMIENTO NO IDEAL>, <DINÁMICA MOLECULAR>, <ÁREA MOLECULAR>, <TENSIÓN SUPERFICIAL>, <PRESIÓN SUPERFICIAL>, <ELASTICIDAD DE GIBBS>.

## ABSTRACT

Charmm-GUI was used to build five molecular models of lipid bilayers containing 200 lipids of Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and Dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS) with cholesterol concentrations (CHL1) of 0, 15, 30, 50 and 70% to evaluate non – ideal behavior (condensation effect). A series of Molecular Dynamics simulations were performed using Gromacs, the energy minimization and the molecular systems equilibration were performed using NVT and NPT assemblies at a temperature of 315 K for a total of 10 ns. The variables were determined: molecular area, surface tension and Gibbs elasticity for each model. As the cholesterol concentration increases, the molecular area decreases, the surface tension fluctuates. The cholesterol level also affects the lipid bilayers hardness. The Gibbs elasticity was evaluated, resulting in hardness in the bilayer when it has 70% cholesterol in its composition. The system with the greatest flexibility was the lipid bilayer with 30% cholesterol. The surface pressure and Gibbs elasticity behavior of the simulations in relation to the experimental results are similar, demonstrating the non – ideal cholesterol behavior against phospholipids affecting the lipid bilayers properties and cell functionality as well. It is recommended to deepen the study of other factors that determine the non – ideal cholesterol behavior versus phospholipids in the lipid bilayers.

**Key words:** <EXACT AND NATURAL SCIENCES>, <BIOPHYSICS>, <LIPID BILAYER>, <DPPC>, <DPPS>, <CHOLESTEROL>, <CONDENSATION EFFECT>, <NON-IDEAL BEHAVIOR>, <MOLECULAR DYNAMICS>, <MOLECULAR AREA>, <SURFACE TENSION>, <SURFACE PRESSURE >, <GIBBS ELASTICITY>.

## INTRODUCCIÓN

La membrana celular es una estructura de consistencia fluida que recubre las superficies de las células u organelos. Su importancia radica en que la célula requiere todos los nutrientes que se encuentran en el medio extracelular; además, debe eliminar los desechos provenientes del metabolismo y mantener el medio intracelular estable.

Estas membranas son denominadas como mosaicos fluidos debido a que están compuestas por diferentes componentes orgánicos (lípidos, proteínas y azúcares) y algunas macromoléculas incluidas en la matriz fosfolipídica pueden rotar y desplazarse en la superficie de la membrana. Uno de sus componentes, el colesterol, influye en la fluidez de las membranas.

A medida que la concentración de colesterol aumenta o disminuye, existirán cambios en las propiedades de las membranas. El estudio de este fenómeno denominado comportamiento no ideal de las capas lipídicas tiene gran importancia para comprender diversos procesos biológicos.

La simulación de Dinámica Molecular (MD) se ha convertido en una técnica importante para estudiar estos fenómenos en detalle atómico, ya que los recursos computacionales y los campos de fuerza han permitido realizar simulaciones significativas de membranas lipídicas para comprender mejor sus propiedades y funciones físicas.

En este trabajo se realiza una evaluación del comportamiento no ideal de una capa lipídica de DPPC y DPPS con diferentes concentraciones de colesterol usando Dinámica Molecular para corroborar como el colesterol influye en ciertas propiedades de las membranas celulares. Se considera estos dos tipos de fosfolípidos debido a su presencia con mayor concentración en membranas celulares eucariotas.

# CAPÍTULO I

## 1 MARCO REFERENCIAL

### 1.1 Identificación del Problema

Las membranas biológicas cumplen un papel importante en la funcionalidad y estructura de células eucariotas y procariotas. Por lo general, estas membranas están compuestas por azúcares, proteínas y lípidos; estos últimos forman parte de la zona más fluida de las membranas, las capas lipídicas.

Los fosfolípidos y el colesterol son los lípidos que conforman las capas lipídicas. El colesterol contribuye a la estabilidad y organización de los fosfolípidos, por lo que en ausencia de este lípido muchas de las funciones de la membrana no podrían llevarse a cabo. Esta contribución es fundamental, siendo objetivo de muchas investigaciones en los últimos años.

Un mínimo cambio de la concentración del colesterol dentro de la membrana supone propiedades diferentes en el comportamiento de los fosfolípidos. En varios estudios de monocapas y bicapas lipídicas, el colesterol muestra un comportamiento no ideal en su interacción con los fosfolípidos.

Existen varios modelos experimentales que explican este comportamiento, pero no con mayor precisión, además de que la variación de concentración de este lípido supondría cambios biológicos y físicos en todo el organismo, por lo que hasta hoy en día se sigue buscando una explicación.

En el Ecuador, no se han realizado estudios experimentales en biofísica de las membranas debido a la falta de laboratorios adecuadamente equipados, por lo que se busca realizar este tipo de investigación con simulación en Dinámica Molecular para poder contrastar con estudios experimentales anteriormente realizados.

### 1.2 Formulación del Problema

¿Se puede demostrar el comportamiento no ideal de una bicapa lipídica de DPPC y DPSS con diferentes concentraciones de Colesterol usando Dinámica Molecular?

### **1.3 Justificación del Problema**

Con este trabajo de investigación se pretende evaluar el comportamiento no ideal de una bicapa lipídica de DPPC y DPPS con diferentes concentraciones de Colesterol usando Dinámica Molecular, lo cual aportará en los conocimientos sobre los efectos que tiene el colesterol sobre la bicapa lipídica como condensar a los fosfolípidos e influir en otras propiedades de la bicapa.

La presente investigación es factible ya que se cuenta con el apoyo del Grupo Ecuatoriano de Investigación Experimental y Teórica de Nanosistemas (GETNano) de la ESPOCH. Además, cuenta con los equipos y software necesarios junto con el recurso humano capacitado.

Esta investigación también satisface el objetivo 4 del Plan Nacional del Buen Vivir: “FORTALECER LAS CAPACIDADES Y POTENCIALIDADES DE LA CIUDADANÍA”, enfatizando en el artículo 6 “Promover la interacción recíproca entre la educación, el sector productivo y la investigación científica y tecnológica, para la transformación de la matriz productiva y la satisfacción de necesidades” y el artículo 9 “Impulsar la formación en áreas de conocimiento no tradicionales que aportan a la construcción del Buen Vivir”.

### **1.4 Antecedentes**

El colesterol es un componente importante en las membranas biológicas eucariotas. Gracias a décadas de investigación, se sabe que el colesterol influye sobre la estructura y la Dinámica de las bicapas lipídicas.

En 1925, se realizaron estudios experimentales con respecto a la influencia fisiológica del colesterol en la modificación del comportamiento de la lecitina, en películas que contenían una solución de ambas sustancias. Se observó un comportamiento no ideal, donde el área molecular disminuye en presencia del colesterol (Leathes, 1925: pp. 853-856). Este comportamiento no ideal se denomina efecto de condensación y ha sido investigado por muchos años para comprender mecanismos como la fluidez de la membrana y la modulación de la función de las proteínas de membrana debido a su relación con la importancia del colesterol (McConnell et al., 2003: pp. 159).

En 1998, se efectuó una Investigación de Dinámica Molecular de los efectos del colesterol a presión constante en una bicapa de Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) para examinar los efectos del colesterol sobre la estructura global de la bicapa y las conformaciones de la cadena hidrocarbonada de DPPC, también enfocándose con cierto detalle en los efectos del colesterol sobre la estructura y las propiedades eléctricas de la interfaz membrana / agua, el empaque de las

cadena de hidrocarburos y la escala de picosegundos de tiempo de las moléculas de lípidos completas, así como la dinámica de los reajustes conformacionales en el interior de la bicapa. Se construyó una bicapa de DPPC que contenía 12,5% moles de colesterol a 50°C empleando campos de fuerzas validados en trabajos previos. Se observó cambios globales en las dimensiones de la bicapa. El análisis sugirió que en el interior de la bicapa, el colesterol a concentraciones consideradas no afecta significativamente las conformaciones y el empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas (Tu et al., 1998: pp. 2147-2156).

En 2003, para investigar las interacciones microscópicas entre el colesterol y los lípidos en membranas biológicas, se realizó una serie de simulaciones de Dinámica Molecular de membranas grandes con diferentes niveles de contenido de colesterol. Las simulaciones en GROMACS se extendieron a 10 ns, y se realizaron con bicapas de dipalmitoilfosfatidilcolina hidratada (DPPC). Las bicapas contenían 1024 lípidos de los cuales 0-40% eran colesterol y el resto DPPC. Los efectos del colesterol sobre la estructura y la dinámica mesoscópica de la bicapa fueron monitoreados en función de la concentración de colesterol. Los principales efectos observados son un ordenamiento significativo de las cadenas de DPPC (monitorizado por parámetros de orden de tipo NMR (Resonancia Magnética Nuclear)), una fracción reducida de enlaces de tipo gauche, una superficie por lípido reducida, menos ondulaciones correspondientes a un mayor módulo de flexión para la membrana, fluctuaciones del área más pequeñas y una reducción de la difusión lateral de los lípidos DPPC así como de colesterol (Hofsäß et al., 2003: pp. 2192-2206).

En el 2009, en Estados Unidos se realizó un estudio del efecto del colesterol sobre la estructura de una bicapa fosfolipídica. Se desarrolló un modelo mesoscópico de agua-lípido-colesterol tomando en cuenta las interacciones hidrofóbico-hidrofílicas y la estructura de las moléculas. El sistema contenía 100000 moléculas de agua para un total de 4000 moléculas de colesterol. Calcularon el diagrama de fase de dimiristoilfosfatidilcolina-colesterol mediante el uso de dinámica de partículas disipativas (DPD) y mostraron que el modelo predice muchas de las diferentes fases que se han observado experimentalmente. En acuerdo cuantitativo con datos experimentales, el modelo también muestra el efecto de condensación; al agregar colesterol, el área molecular disminuye más de lo que se esperaría de una mezcla ideal. Los cálculos mostraron que este efecto es máximo cerca de la temperatura de transición de la fase principal, la temperatura más baja para la cual la membrana está en la fase líquida, y está directamente relacionada con el aumento de esta temperatura de transición de la fase principal al agregar colesterol. Se demostró que no se observa condensación si se cambia ligeramente la estructura de la molécula de colesterol añadiendo un grupo de cabeza hidrofílico adicional o si se disminuye el tamaño de la parte hidrofóbica del colesterol (de Meyer et al., 2009: pp. 3654-3658).

En el 2015, en Bogotá se realizó un trabajo de Grado titulado Bio – Membranas: una aproximación vía Simulaciones computacionales con el objetivo de estudiar las propiedades mecánicas de superficie de biomembranas en particular la tensión superficial, utilizando Dinámica molecular. Se simuló una monocapa de 45 DPPC y 2750 moléculas de agua tipo TIP3P mediante GROMACS y VMD. En el sistema se observó que la densidad evidencia un comportamiento de homogeneidad e isotropía. La tensión superficial evidencia un comportamiento estable y uniforme a lo largo de la simulación (Quemba et al., 2015: pp. 65-85).

En el Ecuador no hay evidencias de estudios de este tipo por lo que, mediante Dinámica Molecular, con el apoyo del GETNano-ESPOCH se realizará una evaluación del comportamiento no ideal de una bicapa lipídica de DPPC y DPPS con diferentes concentraciones de Colesterol usando Dinámica Molecular.

## **1.5 Objetivos**

### ***1.5.1 Objetivo general***

- Evaluar el comportamiento no ideal de una bicapa lipídica de DPPC y DPPS con diferentes concentraciones de Colesterol usando Dinámica Molecular.

### ***1.5.2 Objetivos específicos***

- Construir cinco modelos moleculares de bicapas lipídicas de DPPC y DPPS con diferentes concentraciones de Colesterol.
- Utilizar software de modelado molecular y Dinámica Molecular para modelar las cinco bicapas lipídicas de DPPC y DPPS con diferentes concentraciones de colesterol.
- Determinar propiedades como tensión superficial, área molecular y elasticidad de Gibbs de las bicapas lipídicas de DPPC y DPPS con diferentes concentraciones de Colesterol usando Dinámica Molecular.
- Comparar resultados obtenidos con datos experimentales.

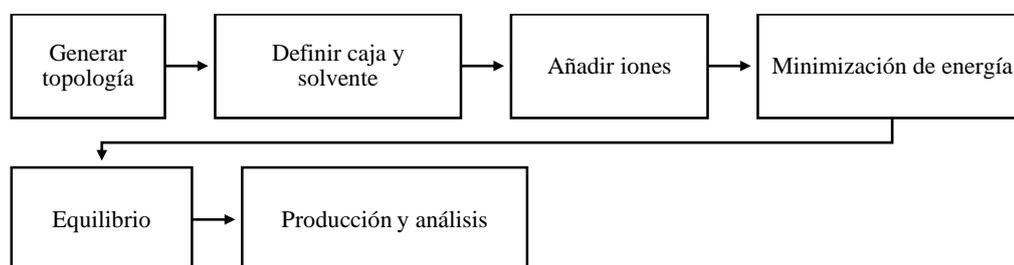
## CAPÍTULO II

### 2 MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Dinámica Molecular

La Dinámica Molecular (MD, Molecular Dynamics) es un tipo de simulación molecular computacional que permite analizar el comportamiento o evolución de un sistema (físico, químico o biológico) a través del tiempo (Lozano Aponte et al., 2014: pp. 86), para generar las trayectorias de un sistema compuesto de  $N$  partículas por integración numérica directa de las ecuaciones de movimiento de Newton, con especificaciones de un potencial de interacción interatómico de condiciones iniciales y de frontera adecuadas. MD es un método de modelado y simulación a nivel atómico cuando las partículas en cuestión son los átomos que constituyen el material o sistema de estudio (Cai et al., 2012: pp. 250).

La simulación de Dinámica Molecular cuenta con distintos pasos mostrados en el siguiente esquema:



**Figura 1-2:** Esquema de una simulación de Dinámica molecular.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.

**Generar topología.** El sistema inicial construido solamente nos indica las coordenadas, al generar la topología describe el sistema en términos de tipo de átomos, cargas enlaces, parámetros de interacción, etc.

**Definir caja y solvente.** Antes de agregar el solvente se debe definir las condiciones de frontera para la simulación del sistema. El solvente se acopla al tipo de caja. Estos dos parámetros dependen del campo de fuerza a aplicar.

**Añadir iones.** Se añade iones al sistema para neutralizarlo.

**Minimización de energía.** Las estructuras iniciales creadas poseen energías muy altas por lo que se utiliza algoritmos para calcular fuerzas y posiciones originales, con el objetivo de minimizarlas y se aproximen a lo real.

**Equilibrio.** Resolución de las ecuaciones de movimiento hasta que las propiedades de sistema no cambien con el tiempo y permanezcan estables o en equilibrio.

**Producción y análisis.** Mediciones que se utilizan para los cálculos computacionales. Existen varios tipos de análisis que son útiles para los sistemas de bicapas lipídicas.

### **2.1.1 Principio Físico**

Las simulaciones de MD resuelven las ecuaciones de movimiento de Newton para sistemas de N partículas que interactúan (Abraham et al., 2014: pp. 3). La ecuación está descrita de la siguiente manera:

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i, i = 1 \dots N. \quad [ 1 ]$$

Donde  $m_i$  es la masa de la partícula  $i$ ,  $r_i$  las coordenadas de la partícula  $i$ . Las fuerzas  $F_i$  son derivadas negativas de una función de potencial  $V(r_1, r_2, \dots, r_N)$ :

$$F_i = - \frac{\partial V}{\partial r_i} \quad [ 2 ]$$

La integración de la ecuación es realizada en pequeños pasos de tiempo con varios métodos de simplificación para su resolución, debido a su complejidad por su dependencia de las coordenadas de cada átomo (Barragán, 2015: pp. 6).

### **2.1.2 Algoritmos de integración numérica**

El objetivo de las simulaciones de Dinámica molecular es resolver las ecuaciones del movimiento (véase ecuación 1) para así obtener una trayectoria del sistema en función del tiempo. Para calcular las posiciones y velocidades de cada átomo en un instante de tiempo se usa algoritmos numéricos (numerical integrators). Los más utilizados son el algoritmo del salto de rana (leap-frog algorithm) y el algoritmo de velocidad-Verlet (velocity Verlet algorithm) (Serrano, 2013: pp. 8-9).

### 2.1.2.1 Leap frog integrator

El algoritmo del salto de la rana usa las posiciones  $x_i$  en el instante  $t$  y las velocidades  $v_i$  en el instante  $t - \frac{1}{2}\Delta t$ . Se actualizan las posiciones y velocidades usando las fuerzas  $F_i(t)$  determinadas por la posición en el instante (Serrano, 2013: pp. 8-9):

$$v_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m_i}F_i(t) \quad [ 3 ]$$

### 2.1.2.2 Velocity Verlet integrator

En el algoritmo de velocidad-Verlet las posiciones y velocidades en instante  $t$  se usan para integrar las ecuaciones de movimiento del siguiente modo (Serrano, 2013: pp. 8-9):

$$x_i(t + \Delta t) = x_i(t) + \Delta t v_i(t) + \frac{\Delta t^2}{2m_i}F_i(t)$$

$$v_i(t + \Delta t) = v_i(t) + \frac{\Delta t^2}{2m_i}[F_i(t) + F_i(t + \Delta t)] \quad [ 4 ]$$

### 2.1.3 Campos de Fuerza (Force Fields FF)

Un campo de fuerza es una función de energía potencial que describe las interacciones entre los átomos mediante un conjunto de términos enlazantes y términos no enlazantes mostrados en la Tabla 1-2. La representación más generalizada del campo de fuerza molecular está dada por un potencial efectivo para un sistema de  $n$  – átomos de la siguiente manera:

$$V(r_1, r_2, \dots, r_n) = \sum_{str} \frac{1}{2}K_b[b - b_0]^2 + \sum_{angles} \frac{1}{2}K_\theta[\theta - \theta_0]^2$$

$$+ \sum_{impropers} \frac{1}{2}K_\xi[\xi - \xi_0]^2 + \sum_{dihedrals} \frac{1}{2}K_\phi[1 + \cos(n\phi - \delta)]^2$$

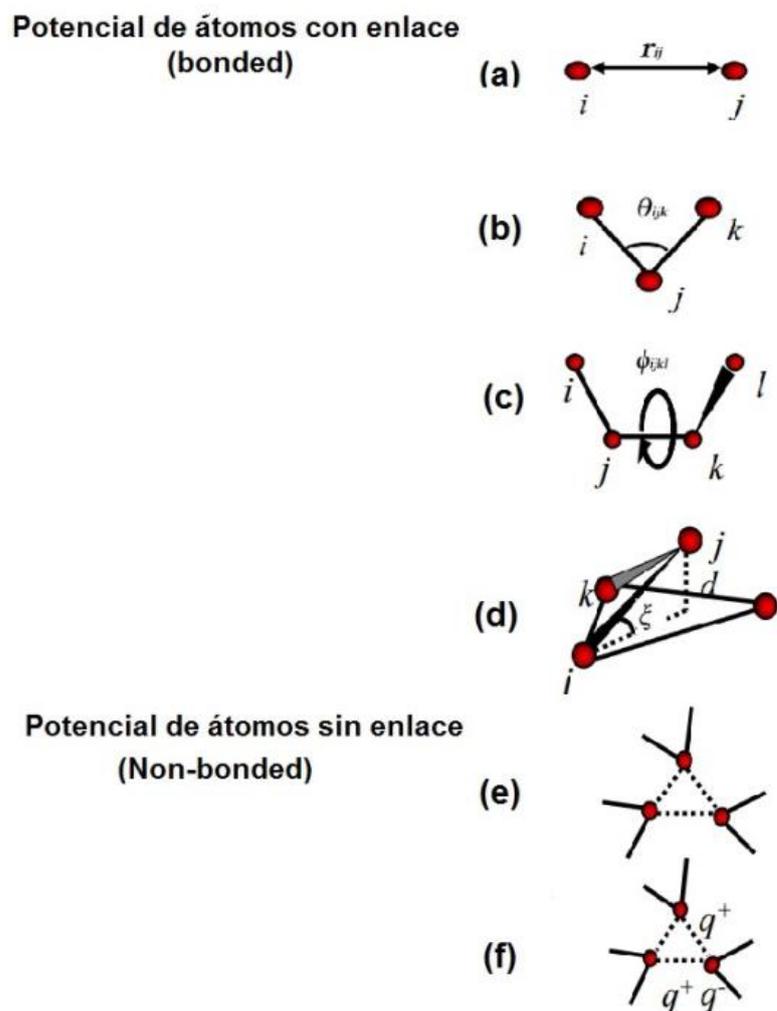
$$+ \sum_{nonbond} \epsilon \left[ \left( \frac{R_{minij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{R_{minij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad [ 5 ]$$

**Tabla 1-2:** Descripción de términos de la expresión generalizada del Campo de Fuerza molecular.

<b>TÉRMINOS ENLAZANTES</b>	
<p><b>Estiramiento</b></p> $\sum_{str} K_b [b - b_0]^2$	<p>Describe el cambio de energía potencial causado por el cambio de enlaces covalentes entre dos átomos. El campo de fuerza de macromoléculas se representa con un término armónico. Donde <math>K_b</math> es la constante de fuerza de enlace, y <math>b - b_0</math> es la distancia de equilibrio desde que el átomo se ha movido (ver Figura 2-2(a)).</p>
<p><b>Ángulos</b></p> $\sum_{angles} K_\theta [\theta - \theta_0]^2$	<p>Describe la energía potencial causada por el cambio de ángulos formados entre enlaces covalentes vecinos. Donde <math>K_\theta</math> es la constante de fuerza de ángulo, y <math>\theta - \theta_0</math> es el ángulo de equilibrio entre 3 átomos enlazados (ver Figura 2-2(b)).</p>
<p><b>Ángulos de Torsión o Diedros</b></p> $\sum_{dihedrals} K_\varphi [1 + \cos(n\varphi - \delta)]^2$	<p>Describe la rotación de los átomos alrededor de un enlace, es importante para describir la conformación de la molécula. Donde <math>K_\varphi</math> es la constante de fuerza de diedro, <math>n</math> es la multiplicidad de la función, <math>\varphi</math> es el ángulo diedro y <math>\delta</math> es el desplazamiento de fase (ver Figura 2-2(d)).</p>
<p><b>Diedros impropios</b></p> $\sum_{impropers} K_\xi [\xi - \xi_0]^2$	<p>Donde <math>K_\xi</math> es la constante de fuerza y <math>\xi - \xi_0</math> es el ángulo plano. Describe el movimiento fuera del plano de átomos en una molécula planar. Se definen diedros impropios cuando se quieren mantener ciertos grupos en un mismo plano o configuración determinada (ver Figura 2-2(c)).</p>
<b>TÉRMINOS NO ENLAZANTES</b>	
<p><b>Lennard – Jones</b></p> $\sum_{nonbond} \epsilon \left[ \left( \frac{R_{min_{ij}}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{R_{min_{ij}}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$	<p>Las interacciones de van der Waals se describen por el potencial de Lennard Jones donde <math>\epsilon</math> es la profundidad del pozo y <math>r_{ij}</math> es la distancia entre dos partículas. El término <math>R_{min_{ij}}</math> no es el mínimo de potencial, sino donde el potencial de L-J cruza el eje (es decir, cero) (ver Figura 2-2(e)).</p>
<p><b>Coulomb</b></p> $E_{elec} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}$	<p>La interacción electrostática se produce por la distribución entre dos cargas puntuales <math>q_i</math> y <math>q_j</math>, donde <math>\epsilon_0</math> es la permitividad del vacío y <math>r_{ij}</math> es la distancia entre <math>i</math> y <math>j</math> (ver Figura 2-2(e)).</p>

**Fuente:** Barragán, 2015: pp. 9-10. (Evaluación del campo de fuerza CHARMM27 implementado en NAMD para la simulación de ADN G-cuádruple tetramoleculares y paralelos).

Los primeros cuatro términos (enlazantes) están contruidos de tal manera que permitan preservar la estereoquímica de las moléculas, es decir, se garantiza que la arquitectura fundamental de la biomolécula con ayuda de las restricciones de carácter espacial emule los movimientos de una molécula. Los últimos términos (no enlazantes) corresponden a las interacciones de Van der Waals y Coulomb respectivamente entre pares de iones (Quemba et al., 2015: pp. 10).



**Figura 2-2:** Esquema de los términos de los campos de fuerzas.

**Fuente:** (Quemba et al., 2015: pp. 10). Bio - Membranas: Una Aproximación Vía Simulaciones Computacionales.

#### 2.1.4 Interacciones Electroestáticas

Para las simulaciones biomoleculares existen técnicas principales para calcular las interacciones electrostáticas, una de ellas es la técnica basada en el “Cut off”, donde se considera una pequeña zona de interacción para las partículas, la misma que se la considera como esfera con un radio de 10 a 15 Å centrada en la partícula a estudiar (Quemba et al., 2015: pp. 7).

La técnica de las sumas de Ewald resume las interacciones de largo alcance entre partículas y todas sus imágenes infinitas en el espacio de Fourier. Se basan en la división de la energía potencial de interacción. Transforma una serie lenta y condicionalmente convergente, en la suma de dos series rápidamente convergentes más un término convergente. Un método mejorado es el llamado Partícula Malla Ewald (PME) desarrollado para acelerar el cálculo de la parte potencial electrostático en el espacio recíproco de la suma de Ewald (Toukmaji et al., 1996: pp. 73-92).

### 2.1.5 *Condiciones de frontera*

Para todo sistema durante una simulación de MD se impone condiciones de frontera, es decir, cualquier límite o restricción geométrica o termodinámica forzada para poder realizar comparaciones directas con experimentos. Se puede distinguir entre límites fuertes y débiles, en términos de condiciones de frontera. Las primeras representan una restricción en un punto exacto del tiempo durante la simulación (instante observable). Los límites débiles representa una restricción en el valor promedio de un observable, es decir, permite que el valor instantáneo correspondiente fluctúe alrededor del promedio especificado (Quemba et al., 2015: pp. 12-13).

### 2.1.6 *Ensamblés*

En mecánica estadística se define a un ensamble como un conjunto hipotético de sistemas termodinámicos con características similares permitiendo realizar un análisis estadístico del conjunto. Existen varios tipos de ensambles dependiendo del enfoque del problema a estudiar:

**Ensamble Microcanónico.** Se trata de un sistema adiabáticamente aislado donde la energía  $E$ , número de partículas  $N$  y volumen  $V$  permanecen constantes (Vesely, 2015).

**Ensamble Canónico.** Describe un sistema en equilibrio térmico, es decir, mantiene la temperatura  $T$  constante, así también el volumen  $V$ . La energía  $E$  únicamente se intercambia con el exterior en forma de calor (Vesely, 2015).

**Ensamble Isotérmico – Isobárico.** La temperatura  $T$  y la presión  $P$  se mantiene constante. Describe sistemas en contacto con termostato a una temperatura  $T$  y barostato a presión  $P$  (Cai, 2011: pp. 3).

## 2.2 **Membranas biológicas**

Para mantenerse vivos, todos los seres vivos necesitan membranas. Las membranas son barreras que dan a las células sus límites externos (membranas plasmáticas) y sus compartimentos internos (orgánulos). Al ser selectivamente permeables, las membranas controlan el movimiento de sustancias dentro y fuera de las células, regulando la composición del fluido dentro de las células individuales. Las membranas controlan el flujo de información entre las células ya sea por reconocimiento de moléculas de señal recibidas de otras células, o enviando señales químicas o eléctricas a otras células (Brown, 1996: pp. 1).

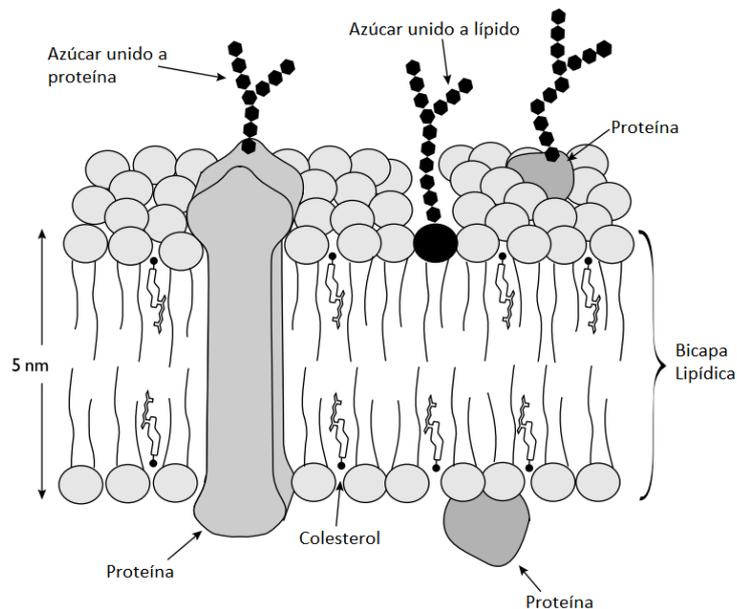
Por último, las membranas están involucradas en la captura y liberación de energía - la fotosíntesis y la fosforilación oxidativa tienen lugar en las membranas. Las membranas biológicas son, por lo tanto, más que una barrera o cubierta inerte: juegan un papel activo en la vida de la célula (Brown, 1996: pp. 1).

### 2.2.1 Componentes de la membrana

Las membranas biológicas están formadas por tres componentes principales: lípidos, proteínas y azúcares. Todas las membranas tienen una estructura general común (ver Figura 3-2), en la cual la membrana conformada por dos capas de moléculas de lípidos (una superior y otra inferior) tienen proteínas incrustadas en ellos (Brown, 1996: pp. 1-4).

La estructura es altamente fluida; la mayoría de las moléculas de lípidos y proteínas pueden moverse en el plano de la membrana. Las moléculas de lípidos y proteínas se mantienen unidas principalmente por interacciones no covalentes. Los azúcares se unen por enlaces covalentes a algunas de las moléculas de lípidos y proteínas. Sólo se encuentran en un lado de la membrana: por ejemplo, en la superficie exterior de la membrana plasmática (Brown, 1996, pp. 1-4).

Dentro de las membranas biológicas se encuentran en mayor cantidad tres tipos de lípidos: glucolípidos, fosfolípidos y el colesterol. Estos cumplen diferentes funciones dentro de las membranas. Los tres tipos son anfipáticos, es decir, tienen un extremo hidrofílico (polar o «que se siente atraído por el agua») y un extremo hidrofóbico (no polar o «que rehúye el agua»).

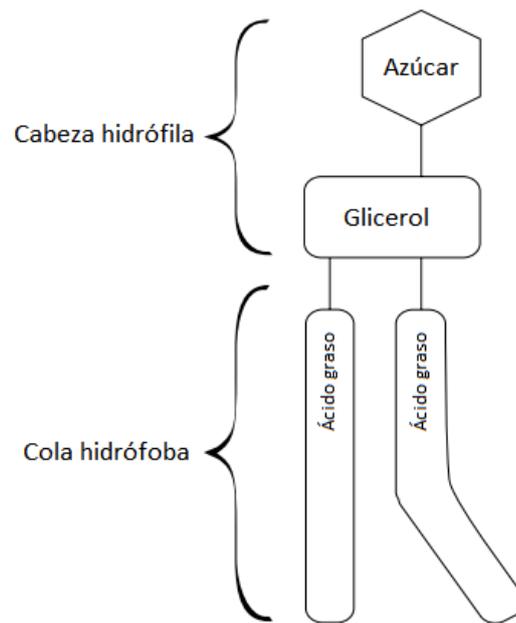


**Figura 3-2:** Representación esquemática de una membrana biológica.

**Fuente:** (Brown, 1996: pp. 2). How membranes are organized.

### 2.2.1.1 Glucolípidos

Los glucolípidos es un componente menor de las membranas, se encuentran en la hoja externa, y las moléculas de hidratos de carbono quedan expuestas en la superficie celular (Kierszenbaum et al., 2012). Al igual que los fosfolípidos, los glucolípidos tienen en su estructura glicerol o esfingosina unido a cadenas de ácidos grasos (ver Figura 4-2). La diferencia es que estos tienen azúcar como la glucosa o galactosa en lugar del grupo fosfato (Brown, 1996, pp. 3-4).

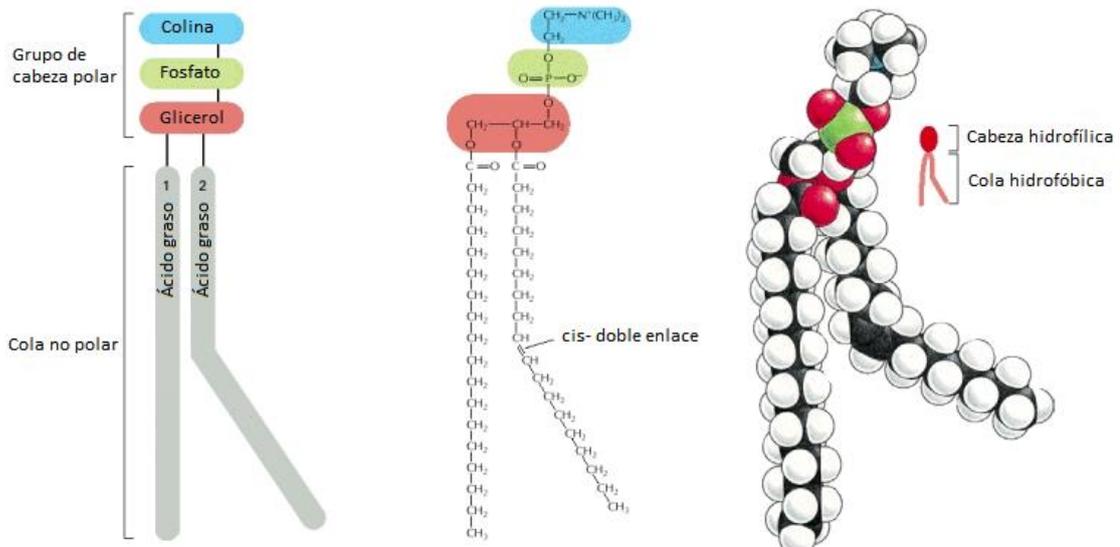


**Figura 4-2:** Estructura de una molécula de glucolípido.

**Fuente:** (Brown, 1996, pp. 4)

### 2.2.1.2 Fosfolípidos

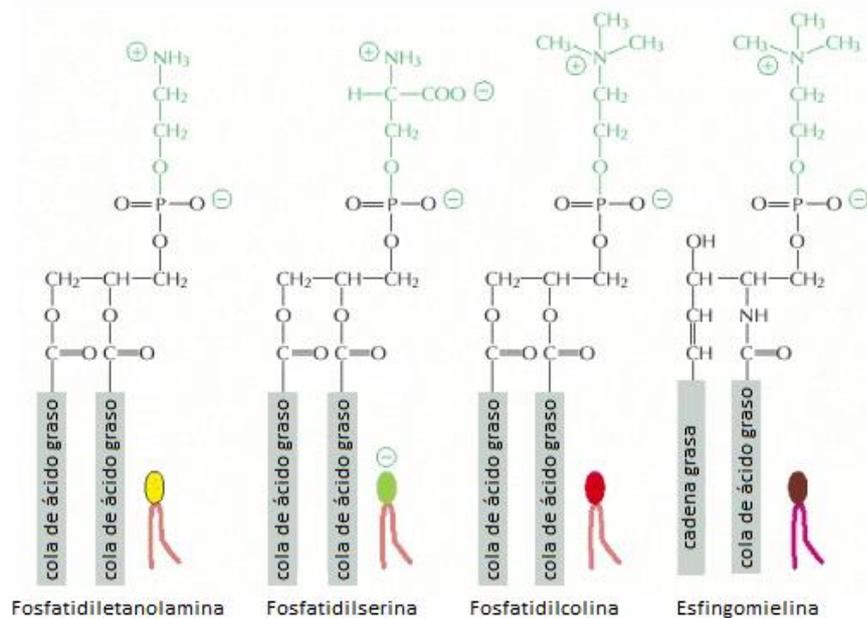
Los fosfolípidos son los lípidos más abundantes dentro de la membrana. Tienen un grupo de cabeza polar y dos colas que son generalmente ácidos grasos, que pueden diferir en longitud. Por lo general, una cola puede tener uno o más enlaces cis (insaturada), mientras que la otra cola no (saturada). En la Figura 5-2 se muestra un ejemplo de una molécula de fosfolípido, la fosfatidilcolina, representada primero esquemáticamente, segundo mediante fórmula y tercero como un modelo de esferas. También muestra que el doble enlace crea un pliegue. Estas diferencias entre colas son importantes porque influyen en la capacidad de compactarse los fosfolípidos entre sí, afectando la fluidez de la membrana (Alberts et al., 2002).



**Figura 5-2:** Partes de una molécula de fosfolípido.

**Fuente:** (Alberts et al., 2002). The lipid bilayer.

Los cuatro fosfolípidos fundamentales en la membrana plasmática son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y esfingomielina (ver Figura 6-2). Representan más de la mitad de los lípidos en la mayoría de las membranas (Kierszenbaum et al., 2012).



**Figura 6-2:** Estructura de fosfolípidos principales en membranas plasmáticas de mamíferos.

**Fuente:** (Alberts et al., 2002). The lipid Bilayer.

Por ser anfipáticos, en entornos acuosos se organizan automáticamente para formar bicapas. Si se dispersan en agua, obligan a las moléculas de agua a reorganizarse en nuevas estructuras rodeando



El colesterol desempeña funciones esenciales para el buen funcionamiento de la membrana celular. Regula las propiedades físicas como la organización de los lípidos y el comportamiento de las fases. Además, regula la fluidez de la membrana y su resistencia mecánica (Redondo-Morata et al., 2012: pp. 12851).

Se encuentra con abundancia en las membranas de los eritrocitos, otras membranas plasmáticas y diversos compartimientos celulares de eucariotas como se muestra en la Tabla 2-2 (Eeman et al., 2010: pp. 721).

**Tabla 2-2:** Porcentaje de lípidos totales en peso.

Lípidos	Membrana plasmática de células hepáticas	Membrana plasmática de glóbulos rojos	Mielina	Mitocondria (membranas interiores y exteriores)	Retículo endoplasmático	E. Coli
Colesterol	17	23	22	3	6	0
Fosfatidiletanolamina	7	18	15	25	17	70
Fosfatidilserina	4	7	9	2	5	Rastro
Fosfatidilcolina	24	17	10	39	40	0
Esfingomielina	19	18	8	0	5	0
Glucolípidos	7	3	28	Rastro	Rastro	0
Otros	22	13	8	21	27	30

Fuente: Alberts et al., 2002. (Molecular Biology of the Cell).

### 2.2.2 *Bicapa lipídica*

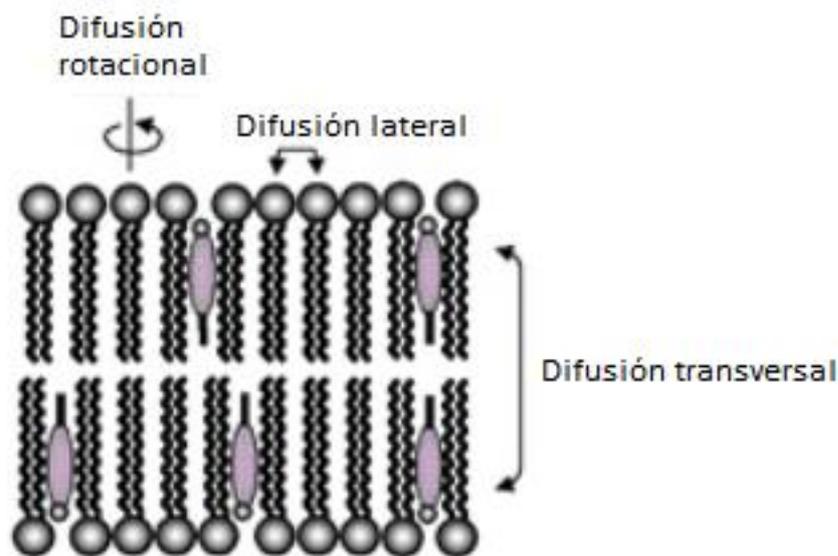
Es importante recordar dos aspectos generales de la bicapa de fosfolípidos:

- La estructura de los fosfolípidos explica su función en la membrana como barreras entre dos compartimentos acuosos. Las cadenas de ácidos grasos hidrófobos en el interior de la bicapa fosfolipídica son responsables de que las membranas sean impermeables a las moléculas hidrosolubles (Kierszenbaum et al., 2012).
- La bicapa de fosfolípidos es un líquido viscoso. Las largas cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos de la mayoría de los fosfolípidos están agregadas de forma laxa y se pueden desplazar en el interior de la membrana. Por tanto, los fosfolípidos y las proteínas pueden difundirse lateralmente por la membrana para que ésta pueda realizar sus funciones fundamentales (Kierszenbaum et al., 2012).

Las bicapas lipídicas son consideradas como cristales líquidos. Como cristales debido a que los fosfolípidos se disponen como una matriz ordenada con sus cabezas polares hacia el exterior y sus cadenas de ácidos grasos hacia el interior; son líquidos porque a pesar de la disposición ordenada de las moléculas, sus cadenas hidrocarbonadas se encuentran en constante movimiento. Tal movimiento le da a la bicapa la propiedad de fluido bidimensional (Solomon et al., 2007: pp. 109). Esto significa que una molécula de fosfolípido es libre de moverse lateralmente (ver Figura 9-2).

Como en un cristal líquido, se realiza una combinación de alta ordenación con fluidez y labilidad, asegurando el cumplimiento de las funciones fundamentales de las membranas. Las propiedades cristalinas líquidas se evidencian debido a que los lípidos se encuentran fundidos a temperatura fisiológica (Volkenshtein, 1985: pp. 361).

Existe un caso especial de movimiento que experimentan los lípidos denominado difusión transversal o flip-flop. Esto ocurre cuando un lípido rota en el plano de la bicapa seguida de su traslación perpendicular al plano de la bicapa (ver Figura 9-2). La difusión transversal es un proceso muy lento (posiblemente puede tardar días) y es energéticamente desfavorable ya que el paso de la cabeza polar a través del centro hidrofóbico de la bicapa es forzado. No obstante, el colesterol puede experimentar un rápido flip-flop ( $< 1s^{-1}$ ) entre las dos capas de la bicapa lipídica (Müller et al., 2002: pp. 1418-1428).



**Figura 9-2:** Esquema de la Dinámica de los lípidos de membrana.

**Fuente:** (Eeman et al., 2010: p.722). From biological membranes to biomimetic model membranes.

### 2.2.2.1 *Fluidez de una bicapa lipídica*

La fluidez depende de la composición química de los fosfolípidos, la temperatura y el colesterol. A temperaturas bajas la bicapa lipídica es bastante rígida debido a que las colas de hidrocarburos de los lípidos se agrupan reducidamente para disponerse de manera ordenada (estado gel). A medida que aumenta la temperatura, las moléculas de lípidos vibran más rápido, haciendo que la bicapa se “derrita”, disponiéndose de manera desordenada (estado líquido). La temperatura en la que se funde la bicapa lipídica se denomina Temperatura de Transición, dentro de un rango de 10 – 40°C (Brown, 1996: pp. 11-12).

Otro factor es la composición química de los lípidos. La bicapa lipídica se encuentra a una temperatura de transición menor, es decir, la bicapa es más fluida debido a que las colas de los lípidos son cortas o en su composición tiene doble enlaces. Las cadenas al ser cortas interactúan menos entre sí, por lo que necesitan temperaturas más bajas para fundir la bicapa. los dobles enlaces hacen que las cadenas sean más difíciles de agrupar e incrementa la fluidez de la bicapa (Brown, 1996: pp. 11-12).

La concentración de colesterol afecta a la fluidez de la bicapa debido a la ubicación del grupo hidroxilo del colesterol cerca de las cabezas de los fosfolípidos, y sus anillos hidrófobos y cadena lateral están incrustados dentro de las cadenas de ácidos grasos del interior de la membrana. La estructura rígida de anillos de esteroide interactúa con las regiones cercanas de las colas de los lípidos y las endurece provocando que la bicapa sea menos fluida. Las membranas eucariotas contienen una molécula de colesterol por cada dos moléculas de fosfolípidos (Brown, 1996: pp. 11-12).

## 2.3 **Efecto de condensación del colesterol en bicapas lipídicas**

Una propiedad que hace que el colesterol sea único entre las moléculas de lípidos es su efecto condensador sobre los fosfolípidos en las mezclas. Este efecto se descubrió por primera vez en experimentos de monocapa en la interfaz aire-agua (Leathes, 1925; Demel et al., 1967; Phillips, 1972) donde se descubrió que el área por fosfolípido disminuía en presencia de colesterol. El efecto correspondiente también se encontró en las bicapas lipídicas (Hung et al., 2007: pp. 3960).

Claramente, el efecto de condensación es más que la interacción molecular entre el colesterol y los fosfolípidos. En las monocapas, el colesterol hace que el área por fosfolípido disminuya de manera no ideal (Leathes, 1925; Demel et al., 1967; Phillips, 1972). Este fenómeno puede ser evaluado

mediante una serie de parámetros simulados mediante MD, algunos de ellos descritos a continuación.

### 2.3.1 Área molecular

El efecto de condensación del colesterol puede ser cuantitativamente descrito en términos de área por molécula promedio, el cual refleja la organización molecular dentro de una bicapa lipídica (Alwarawrah et al., 2010; pp. 7516-7523). Para una bicapa lipídica pura el cálculo del área por molécula se puede obtener mediante la ecuación [6]:

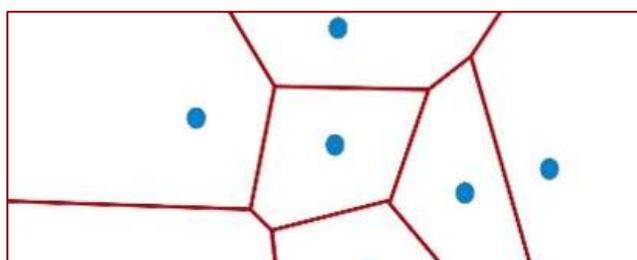
$$area\ per\ lipid = \frac{A(x)}{N_{lipids}} \quad [6]$$

Donde  $A(x)$  es área de la monocapa.  $N_{lipids}$  es el número total de lípidos en la monocapa.

Para bicapas lipídicas mixtas se han desarrollado varios métodos con el propósito de calcular el área molecular y el área del colesterol de una simulación de MD. Estos métodos se han aplicado a varias bicapas de fosfolípidos y a diferentes fracciones molares de colesterol, así como a diferentes temperaturas del sistema (Hofsäß et al., 2003; Edholm et al., 2005).

Uno de los métodos que se aplica es el análisis de Voronoi en dos dimensiones para encontrar área molecular promedio y por colesterol (Shinoda et al., 1998; Guixà-González et al., 2014); el diagrama de Voronoi de un conjunto de puntos en el plano es la división de dicho plano en diferentes regiones, donde a cada punto se le asigna una región del plano formada por los puntos que son más cercanos a él (Grima, 2017).

El área de cada molécula de lípido está definida por un polígono de Voronoi, por lo que el diagrama tendría un aspecto como el de la Figura 10-2:



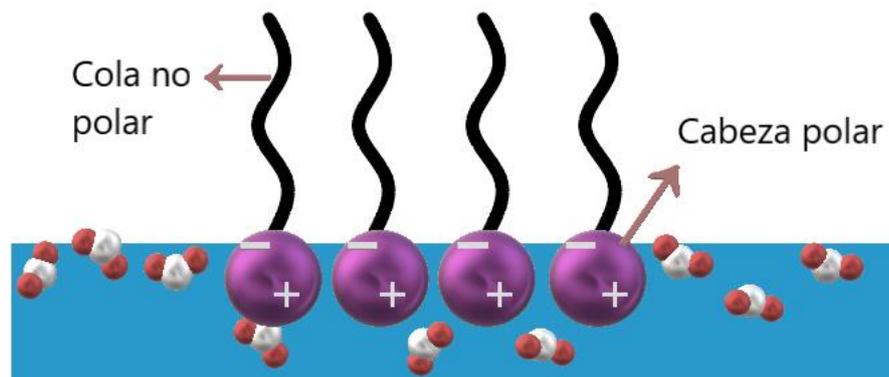
**Figura 10-2:** Diagrama de Voronoi.

**Fuente:** (Grima, 2017). El diagrama de Voronoi, la forma matemática de dividir el mundo.

### 2.3.2 Tensión Superficial

Se denomina tensión superficial de un líquido,  $\gamma$  (mN/m) a la cantidad de energía necesaria para aumentar su superficie por unidad de área. Esta definición implica que el líquido tiene una resistencia para aumentar su superficie. La tensión superficial del agua es alrededor de 73 mN/m a 20°C, que es un valor alto comparado con otros líquidos (Ramírez, 2014: pp. 24-25).

La adición de moléculas anfipáticas sobre una interfase aire-agua reduce la tensión superficial del agua. Las moléculas de una sustancia anfipática insoluble en agua (Figura 11-2) se extienden y disponen en la superficie del líquido, generalmente agua, formando una capa molecular. Puesto que el grosor de la película es del orden de la longitud de la molécula, se obtiene una película de grosor nanométrico (Ramírez, 2014: pp. 24-25).



**Figura 11-2:** Esquema de moléculas dispuestas en una interfase aire-agua.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.

En simulaciones computacionales la tensión superficial se calcula a partir de las componentes diagonales del tensor de presión como se muestra en la ecuación [7]:

$$\gamma_s = h_z \left( P_{zz} - \left( \frac{P_{xx} + P_{yy}}{2} \right) \right) \quad [7]$$

Donde  $h_z$  es la componente Z del tamaño de la caja.  $P_{zz}$  es el valor de la presión normal a la monocapa.  $\left( \frac{P_{xx} + P_{yy}}{2} \right)$  es la presión tangencial de la monocapa.

Por lo tanto, la tensión superficial es la diferencia entre la presión normal y lateral de la capa lipídica (Rose et al., 2008: pp. 71-72). En la configuración de la simulación, existen dos tipos de

interfases que tienen tensión superficial. Estas son la interfaz lípido/agua y la interfaz agua/vacío (Rose et al., 2008: pp. 71-72).

Cuando el área para la monocapa es grande, la distancia entre moléculas adyacentes es grande y sus interacciones son débiles. La monocapa puede considerarse como un gas en dos dimensiones. Bajo estas condiciones la monocapa tiene un pequeño efecto en la tensión superficial del agua. Si el área superficial de la monocapa es reducida, las moléculas empiezan a ejercer un efecto repulsión sobre las otras (Rose et al., 2008: pp. 71-72). Este análogo es llamado presión superficial  $\pi$ , y es dado por la siguiente ecuación

$$\pi = \gamma_0 - \gamma_m \quad [ 8 ]$$

Donde  $\gamma_0$  es la tensión superficial agua/aire y  $\gamma_m$  es la tensión superficial de la monocapa.

### 2.3.3 *Elasticidad de Gibbs*

También llamado módulo de compresión de equilibrio nos cuantifica la rigidez o flexibilidad de la monocapa. Sus unidades son mN/m. Está relacionado a la capacidad de las interfases para aumentar su tensión debido a un estiramiento (Arteaga, 2014: pp. 32-34). Esta propiedad se caracteriza cuantitativamente por el módulo dilatacional superficial, que se define como:

$$\epsilon = \frac{d\gamma}{d \ln A} \quad [ 9 ]$$

Donde  $\gamma$  es la tensión superficial y  $A$  es el área superficial de la película.

El término módulo dilatacional superficial se usa para el caso más general donde la película tiene un comportamiento viscoso además del elástico ante una deformación. La componente viscosa refleja la existencia de procesos de relajación en la superficie. Mientras que la elasticidad de Gibbs  $\epsilon$ , es una medida de la resistencia que pone una superficie a la creación de regiones de alta tensión superficial y de la velocidad a la que los gradientes de tensión superficial desaparecen una vez que cesa la perturbación en la superficie (Arteaga, 2014: pp. 32-34).

## CAPÍTULO III

### 3 DISEÑO Y EXPERIMENTACIÓN

#### 3.1 Recursos computacionales

Para la construcción, minimización de energía, equilibrio, análisis, interpretación de resultados y redacción se utilizó 2 procesadores con las siguientes características:

Fabricante:	Toshiba
Modelo:	Satellite S55t-B
Procesador:	Intel ® Core™ i5-5200U @ 2.20GHz
Memoria (RAM):	4,00 GB
Sistema operativo:	64-bit Operating System, x64-Bassed Processor

Disco:	483,7 Gb
Procesador:	Intel ® Core™ i7-2600 CPU @ 3.40GHz
Memoria:	7,8 GiB
Sistema operativo:	Ubuntu 16.04 LTS

Para producción de las bicapas lipídicas se utilizó un procesador con las siguientes características:

Disco:	2 Tb
Procesador:	Intel ® Core™ i7-3930 CPU @ 3.20GHz × 12
Memoria:	31,4 GiB
Sistema operativo:	Ubuntu 14.04 LTS

#### 3.2 Software

**CHARM-GUI.** La construcción de los modelos moleculares se hizo mediante una interfaz gráfica en la web, CHARMM-GUI (<http://www.charmm-gui.org/>). Funciona con CHARMM, un software académico utilizado para la Dinámica y mecánica de sistemas macromoleculares. Se desarrolló en la Universidad de Harvard, en el grupo de investigación del Profesor Martin Karplus.

Permite generar varios sistemas para la simulación molecular con sus respectivos archivos de entrada para agilizar y facilitar el uso de técnicas de simulación comunes y avanzadas. Dentro de esta interfaz se encuentra una herramienta para la construcción de bicapas lipídicas llamada Membrane Builder. Genera una serie de entradas para la construcción de complejos proteína/membrana y membranas solas para la simulación de MD.

**GROMACS.** La Dinámica Molecular de los modelos moleculares se realizó en GROMACS (<http://www.gromacs.org/>). Originalmente fue desarrollado por la Universidad de Groningen. Es un software libre para realizar simulaciones de Dinámica Molecular y minimización de energía. Se opera mediante líneas de comando y usa archivos de entrada y salida.

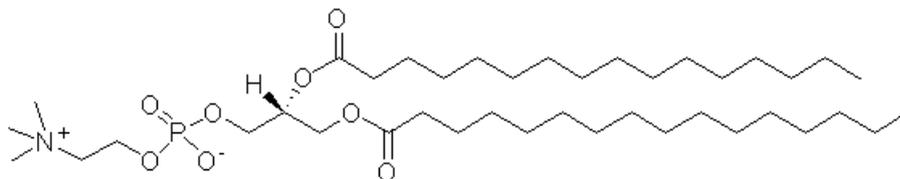
Además, soporta diferentes campos de fuerzas por lo que hace que Gromacs sea muy flexible. Trabaja con campos de fuerza CHARMM, AMBER, GROMOS, etc. Tiene varias herramientas para el análisis de los resultados obtenidos durante la simulación.

**VMD.** Para la visualización de los modelos moleculares se manejó VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). Es un software que permite visualizar, animar y analizar grandes sistemas biológicos utilizando gráficos en 3D. Es compatible con GROMACS y provee de una gama de representaciones para los átomos del sistema.

Una herramienta que se puede ejecutar dentro del entorno de VMD para el análisis de simulaciones de bicapas lipídicas es Membplugin, Mediante algoritmos se puede medir un conjunto de propiedades biofísicas de las membranas simuladas.

### 3.3 Fosfolípidos de la bicapa lipídica

#### 3.3.1 DPPC



**Figura 1-3:** Fórmula estructural de DPPC.

**Fuente:** (Echelon Biosciences Incorporated), DPPC.

La fosfatidilcolina (PC) es generalmente el más abundante de los lípidos en las membranas celulares de animales que proporcionan marco estructural. PC es más común en el prospecto

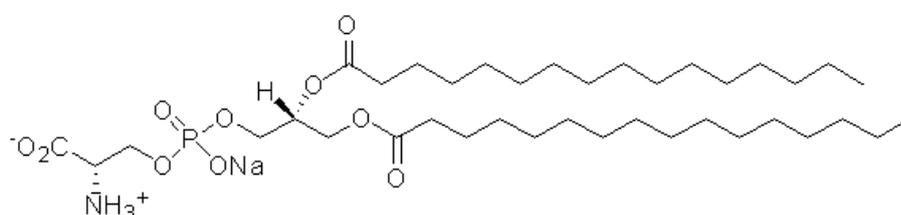
exterior donde funciona como parte de la barrera de permeabilidad (Echelon Biosciences Incorporated).

**Tabla 1-3:** Características del DPPC.

<b>Nombre IUPAC</b>	1, 2 – Dipalmitoil – <i>sn</i> – glicero – 3 – Fosfocolina
<b>Fórmula Molecular</b>	C <sub>40</sub> H <sub>80</sub> N O <sub>8</sub> P
<b>Peso Molecular</b>	734,04 g/mol

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

### 3.3.2 DPSS



**Figura 2-3:** Fórmula estructural de DPSS.

Fuente: (Echelon Biosciences Incorporated). DPSS.

La fosfatidilserina (PS) es un fosfolípido cargado negativamente situado en la cara interna de la membrana celular. (Echelon Biosciences Incorporated).

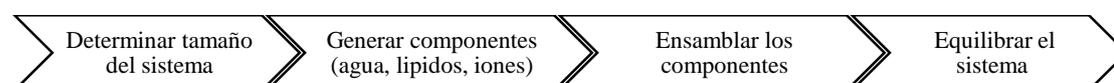
**Tabla 2-3:** Características del DPSS.

<b>Nombre IUPAC</b>	1, 2 – Dipalmitoil – <i>ns</i> – glicero – 3 – Fosfoserina
<b>Fórmula Molecular</b>	C <sub>38</sub> H <sub>74</sub> N Na O <sub>10</sub> P
<b>Peso Molecular</b>	757,95 g/mol

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

## 3.4 Construcción y Dinámica Molecular de modelos moleculares

Todos los sistemas de bicapa de lípidos se construyeron usando Membrane Builder de CHARMM-GUI, siguiendo una serie de pasos generalizados y automatizados de la siguiente manera:



**Figura 3-3:** Esquema de CHAMR-GUI.

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

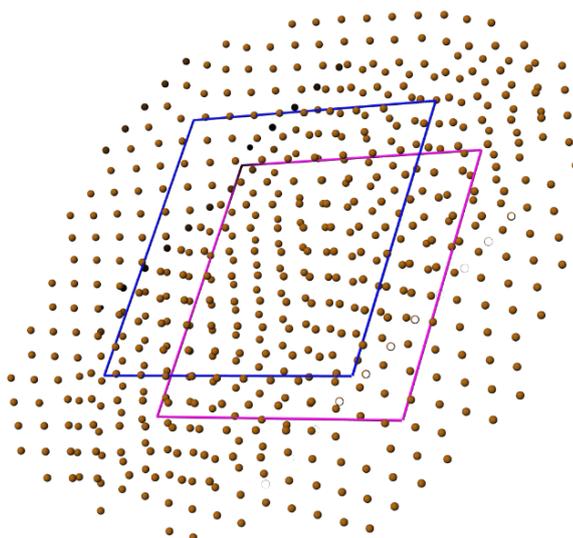
**Determinación del tamaño del sistema.** En este paso se estableció el tamaño y forma del sistema, el número y tipo(s) de lípido(s) para el sistema, por último, el número de moléculas de agua. Se estableció la forma de la caja rectangular. Se colocaron un total de 200 moléculas de lípidos distribuidos en la capa superior e inferior de la bicapa lipídica. El número de lípidos que se colocó en cada sistema se muestran en la Tabla 3-3. Se estableció que por cada molécula de lípido se añade 25 moléculas de agua (TIP3) para solvatar el sistema.

**Tabla 3-3:** Número de moléculas de lípidos.

	Modelos moleculares				
	80%DPPC- 20%DPPS	68%DPPC- 17%DPPS- 15%CHL1	56%DPPC- 14%DPPS- 30%CHL1	40%DPPC- 10%DPPS- 50%CHL1	24%DPPC- 06%DPPS- 70%CHL1
<b>DPPC</b>	160	136	112	80	48
<b>DPPS</b>	40	34	28	20	12
<b>CHL1</b>	00	30	60	100	140
<b>TOTAL</b>	200	200	200	200	200

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

Se formaron pseudoesferas de tipo único con un radio atómico de 5.4 Å de en los sistemas para posicionar las cabezas hidrofílicas de los lípidos de una manera realista. Proporcionan distancias optimas entre las cabezas polares de los lípidos. Cada pseudoesfera se distribuye en el plano XY aleatoriamente.



**Figura 4-3:** Laminas de pseudoesferas.

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

**Generación de componentes.** Se generaron adecuadamente la cantidad de iones especificados. La configuración inicial de los iones se determinó por medio de simulaciones de Monte Carlo. Las moléculas de agua se generan y las pseudoesferas son reemplazadas por las moléculas de lípidos.

**Ensamble de los componentes.** Todos los componentes se acoplaron en un sistema. Se aplicó un campo de fuerza CHARMM36 validado en estudios previos (Lee et al., 2016: pp. 1-19).

**Equilibrio del sistema.** CHARMM-GUI generó archivos de entrada para el equilibrio del sistema, la minimización de energía y la producción.

La minimización de energía se realizó a 5000 pasos.

El equilibrio del sistema se realizó en dos fases NVT y NPT. La primera fase es más corta que la segunda debido a la heterogeneidad del sistema, ya que está compuesto por moléculas de lípidos y agua que actúan como solventes. Las moléculas de agua deben orientarse alrededor de las cabezas hidrofílicas mediante la estabilización de la temperatura T.

*Fase 1.* El sistema fue sometido dos veces a una temperatura de 315 K con un ensamble NVT, un termostato V-rescale. El tiempo de simulación de cada equilibrio NVT fue de 25000 pasos (corresponde a 100 ps = 0,1 ns).

*Fase 2.* Se procedió a aplicar el ensamble NPT para optimizar el volumen del sistema y equilibrar la presión. El sistema fue sometido cuatro veces a una temperatura de 315 K y 1 atm. Se utilizó un termostato V-rescale y barostato Parrinello-Rahman. El tiempo de simulación para cada equilibrio NPT fue: primero de 25000 pasos, los tres restantes de 50000 pasos.

Para la producción final se ejecutaron 500000 pasos correspondientes a 1 ns de simulación del sistema. Se realizaron 9 extensiones de tiempo del sistema teniendo como resultado una simulación de 10 ns.

### **3.5 Cálculo del área molecular, presión superficial y elasticidad de Gibbs**

Para evaluar el comportamiento no ideal de las capas lipídicas con diferentes concentraciones de colesterol se calculó tres parámetros que definen tal comportamiento: área molecular, tensión superficial y elasticidad de Gibbs.

### 3.5.1 *Área molecular*

Para el cálculo de área molecular se empleó Membplugin de VMD. Los pasos a seguir están detallados en el Manual Membplugin (Rodríguez et al., 2013: pp. 6-10). Se requirió el archivo de estructura .gro y el archivo de trayectoria .xtc de 10 ns para el cálculo de cada una de las simulaciones. Se utilizó una selección personalizable de un átomo clave o triada de átomos de cada tipo de fosfolípidos que se encuentran en las bicapas.

Las coordenadas X e Y del conjunto seleccionado de puntos se proyectaron en un plano delimitado por el cuadro de simulación. Este plano se dividió posteriormente en polígonos a través de un diagrama de Voronoi utilizando el programa qvoronoi, del paquete Qhull (Barber et al., 1996: pp. 469-483). De ese modo, se calcula el área de cada polígono.

Se requiere que las trayectorias estén envueltas según las condiciones de contorno periódicas. Se rodearon en tiempo de ejecución las trayectorias usando el comando “Wrap” o el parámetro de línea de comando “-wrapcmd” en la consola TK de VMD.

Se seleccionó las capas a analizar. Al tratarse de bicapas lipídicas se selecciona 0 y 1, que corresponden a la capa superior e inferior respectivamente. Además, se definió el número de fotograma inicial y final de la simulación.

Otra forma de calcular el área molecular es mediante la siguiente fórmula:

$$area\ per\ lipid = \frac{A(x)}{N_{lipids}} = \frac{Box\ X \times Box\ Y}{N_{lipids}} \quad [ 10 ]$$

Donde Box X corresponde a la longitud de la bicapa en el eje X, Box Y a la longitud de la bicapa en el eje Y; y  $N_{lipids}$  corresponde al número de lípidos en cada capa. Estas medidas se obtuvieron mediante el comando gmx energy de Gromacs.

### 3.5.2 *Tensión Superficial*

Mediante gmx energy de Gromacs se calculó la tensión superficial promedio de cada una de las bicapas lipídicas en cada nanosegundo de la simulación (10 ns). Gromacs calculó a partir de la ecuación [7].

La tensión superficial en Gromacs también está definido como la suma total de todas las superficies de la simulación como se muestra en la ecuación [11].

$$\gamma_s = \gamma_m + \gamma_{wv} \quad [ 11 ]$$

Donde  $\gamma_m$  es la tensión superficial de la monocapa.  $\gamma_{wv}$  es la tensión superficial de la interfase agua/vacío. Gromacs recomienda que el cálculo total de la tensión superficial de una bicapa lipídica sea dividido para dos, ya que el valor calculado considera que se trata de una monocapa lipídica.

El cálculo de la presión superficial  $\pi$  se realizó mediante la ecuación [8]. La tensión superficial de la interfase agua/aire se tomó el valor experimental de 70mN/m debido a que la presión superficial solo representa una conversión no un cálculo (Rose et al., 2008: p. 72).

### 3.5.3 *Elasticidad de Gibbs*

La elasticidad de Gibbs se calculó con la siguiente ecuación

$$\varepsilon = -A \frac{d\gamma}{dA} \simeq -A \frac{\Delta\gamma}{\Delta A} \quad [ 12 ]$$

Donde  $A$  es el área de la superficie ( en este caso la superficie es la bicapa lipídica) y  $\gamma$  es la tensión superficial.

## CAPÍTULO IV

### 4 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El presente capítulo está subdividido en tres secciones. La primera sección muestra los resultados de la construcción de los modelos moleculares y graficas que representan el comportamiento del sistema en la minimización de energía, en el equilibrio y los sistemas moleculares finales.

En la segunda sección se realiza un análisis de los parámetros calculados para la evaluación del comportamiento no ideal.

En la tercera sección se compara los resultados obtenidos con resultados de trabajos experimentales.

#### 4.1 Construcción y Dinámica Molecular de modelos moleculares

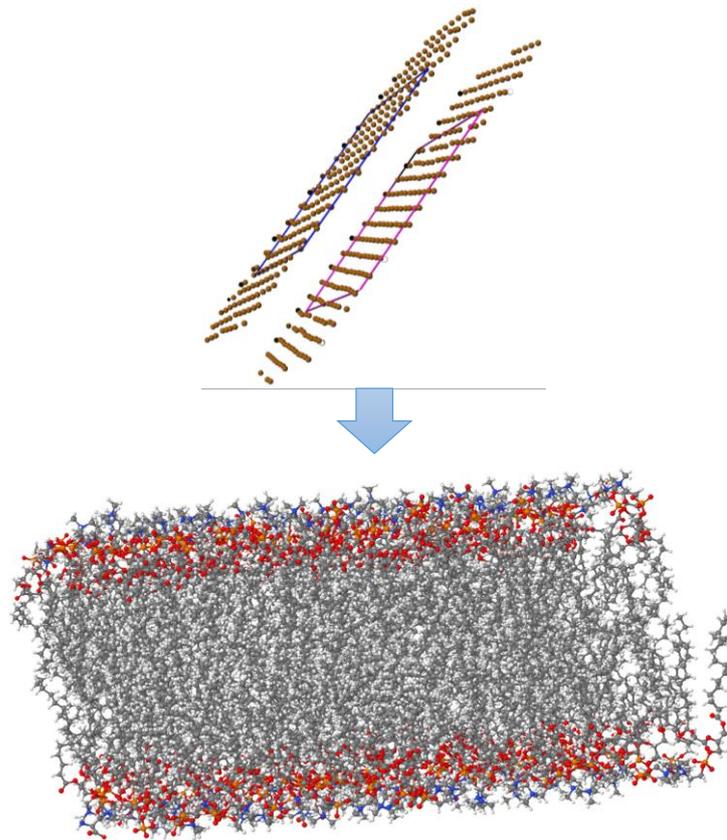
Al establecer las medidas del sistema, Membrane Builder reveló la información inicial del sistema:

**Tabla 1-4:** Tamaño de los sistemas determinados.

		<b>80%DPPC- 20%DPPS</b>	<b>68%DPPC- 17%DPPS- 15%CHL1</b>	<b>56%DPPC- 14%DPPS- 30%CHL1</b>	<b>40%DPPC- 10%DPPS- 50%CHL1</b>	<b>24%DPPC- 06%DPPS- 70%CHL1</b>
<b>Tipo de caja</b>		Rectangular	Rectangular	Rectangular	Rectangular	Rectangular
<b>Tipo de cristal</b>		Tetragonal	Tetragonal	Tetragonal	Tetragonal	Tetragonal
<b>Longitud Å</b>	<i>X</i>	79,0948797	76,9259384	74,6940426	71,6100552	68,3871333
	<i>Y</i>	79,0948797	76,9259384	74,6940426	71,6100552	68,3871333
	<i>Z</i>	57,9291238	73,16	74,66	75,68	77,12
<b>Angulo del cristal</b>	<i>Alpha</i>	90	90	90	90	90
	<i>Beta</i>	90	90	90	90	90
	<i>Gamma</i>	90	90	90	90	90
<b># de lípidos</b>	<i>Superior</i>	100	100	100	100	100
	<i>Inferior</i>	100	100	100	100	100
<b># de agua</b>		5000	5000	5000	5000	5000
<b># de iones Na</b>		40	34	28	20	12
<b>Centro Z</b>		0	0	0	0	0

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

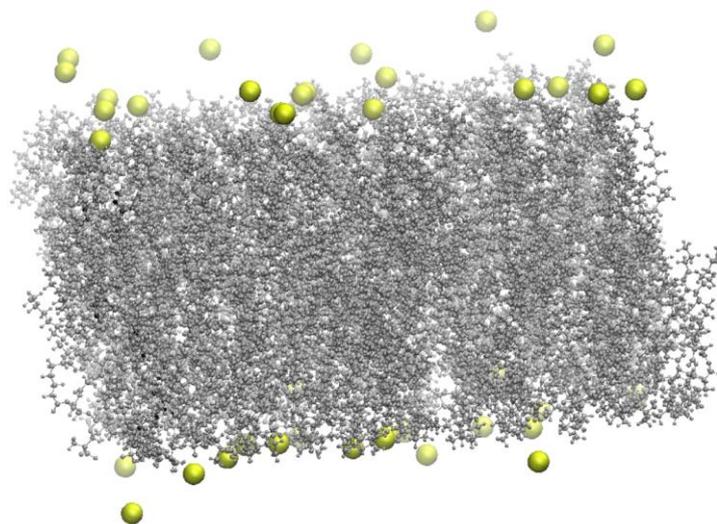
Las pseudoesferas generadas fueron reemplazadas con las moléculas de lípidos.



**Figura 1-4:** Reemplazo de pseudoesferas por las cabezas hidrofílicas de los lípidos.

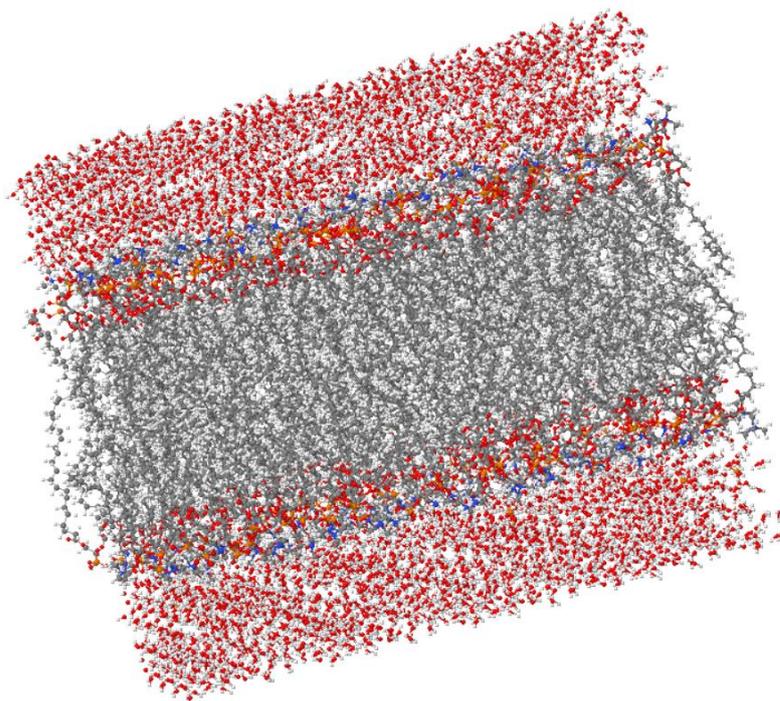
**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.

Se generaron los componentes de agua e iones de Na para neutralizar el sistema debido a la carga negativa del DPPS.



**Figura 2-4:** Generación de iones Na en el sistema.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.



**Figura 3-4:** Generación de moléculas de agua en el sistema.

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

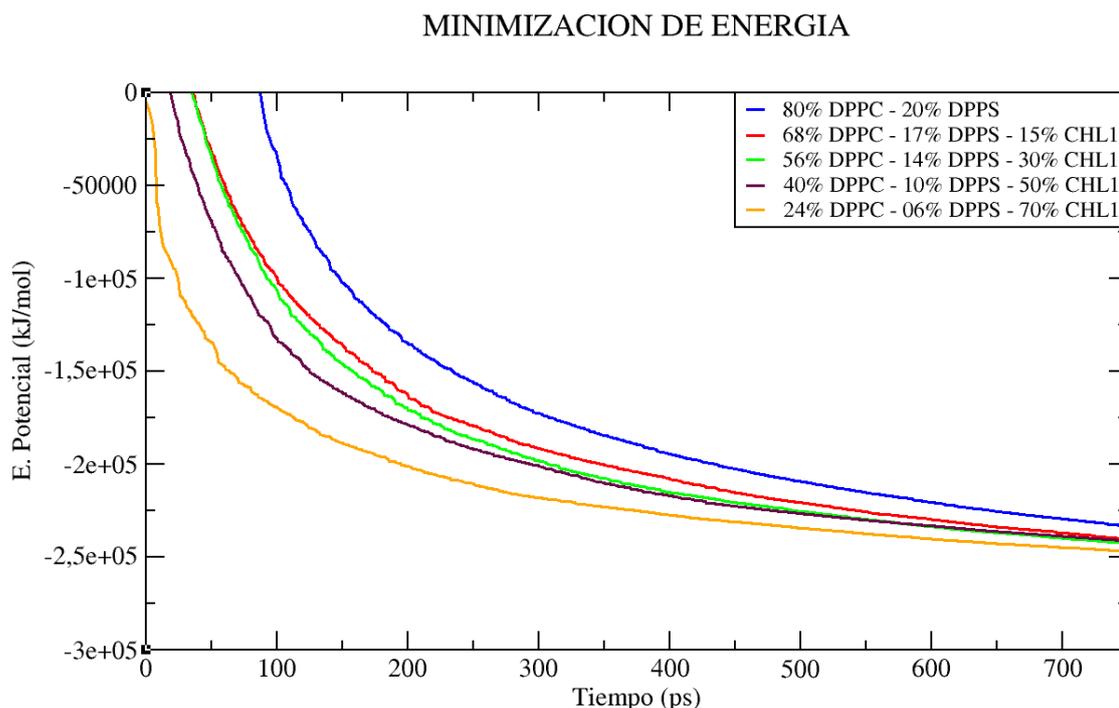
Se generaron 11 archivos para Gromacs que contienen la estructura, la información y los parámetros adecuados para continuar con la Dinámica Molecular de los modelos moleculares:

- index.ndx: índice
- topol.top: topología
- step5\_charmm2gmx.pdb: archivo de estructura
- step6.0\_minimization.mdp: minimización de energía
- step6. [1-2] \_equilibration. mdp: equilibrio NVT
- step6. [3-6] \_equilibration. mdp: equilibrio NPT
- step7\_production.mdp: producción

### **Minimización de energía**

Los sistemas moleculares fueron sometidos a un algoritmo de minimización para encontrar un mínimo energético de su estructura. Este algoritmo debe ser adecuado para explorar la superficie de energía potencial. En el Anexo A se encuentra un archivo de entrada Gromacs para la minimización de energía.

Los resultados obtenidos en la minimización de energía revelan una disminución de la energía potencial como muestra el Gráfico 1-4. Las estructuras de los modelos moleculares se relajaron y obtuvieron una geometría estable para la simulación. Los valores promedios de la  $E_{pot}$  son:  $-168448 \pm 53000$  kJ/mol (80% DPPC – 20% DPPS),  $-205153 \pm 31000$  kJ/mol (68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1),  $-208513 \pm 31000$  kJ/mol (56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1),  $-204282 \pm 26000$  kJ/mol (40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1) y  $-209781 \pm 19000$  kJ/mol (24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1).



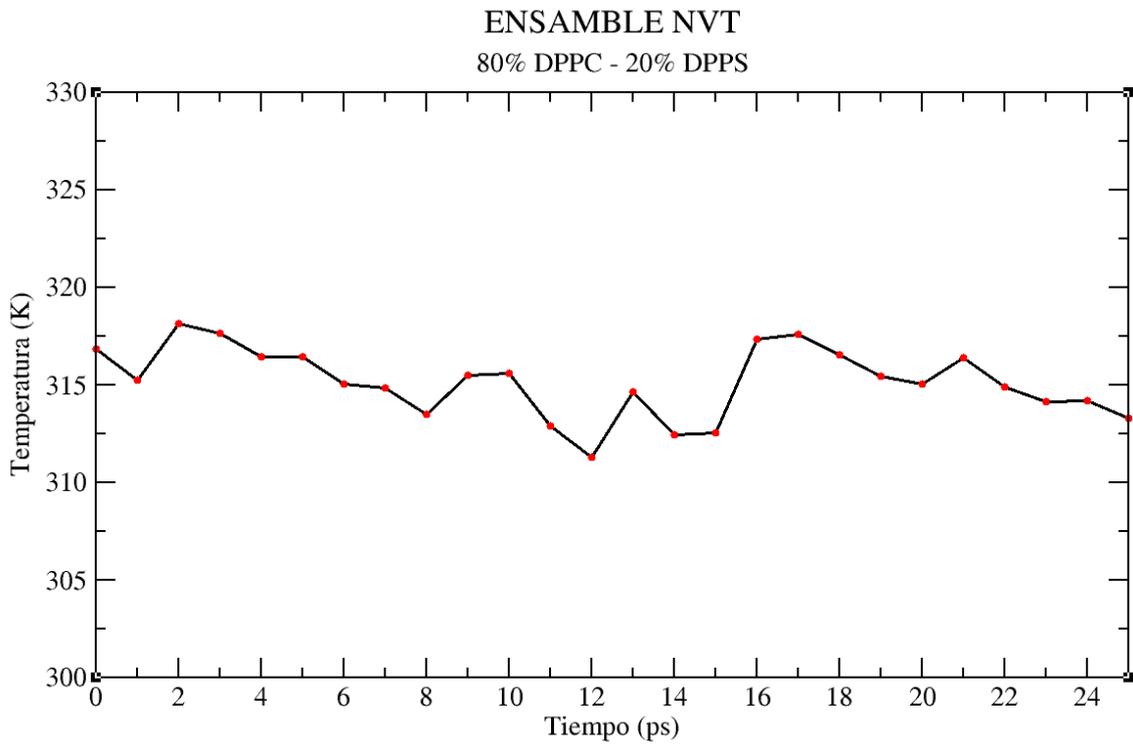
**Gráfico 1-4:** Disminución de la energía potencial de los 5 modelos moleculares.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.

### Equilibrio del sistema

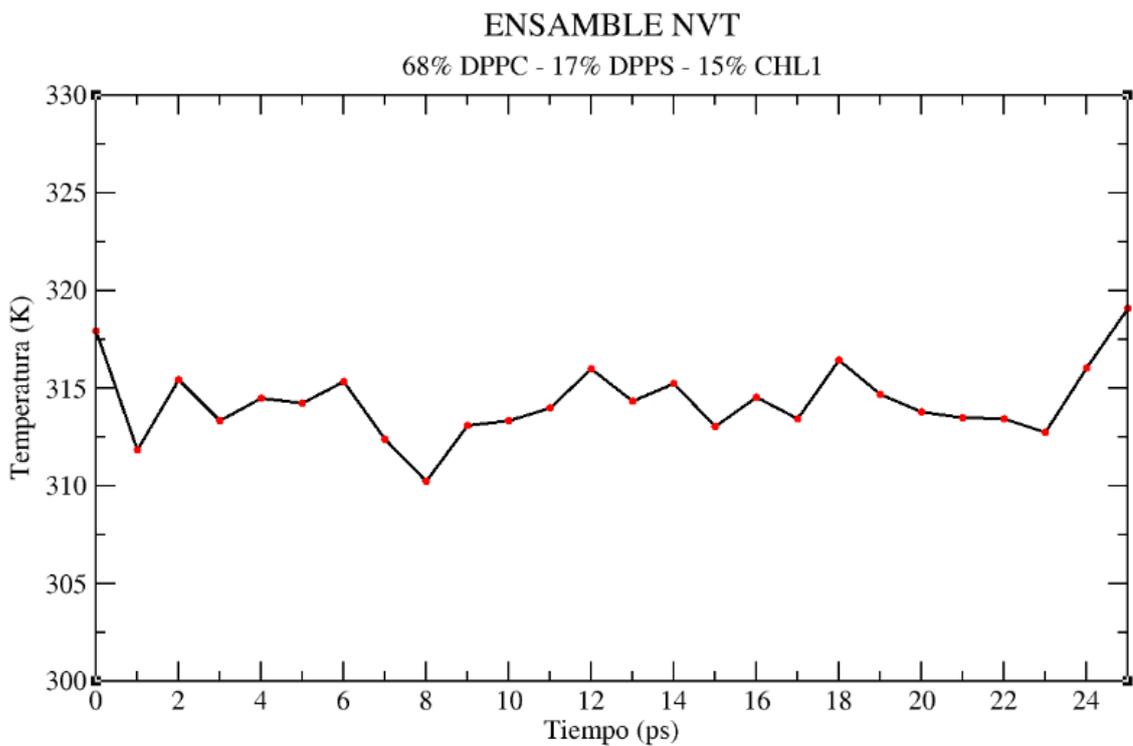
Después de la minimización de energía, los sistemas fueron sometidos a ensambles NVT y NPT para equilibrar el sistema. Al someter los sistemas al ensamble NVT controlado por un termostato V-rescale se presenta un incremento en la temperatura  $T$  hasta alcanzar el equilibrio y mantenerse constante. Los valores promedios de la  $T$  son:  $315,149 \pm 0,511$  K (80% DPPC – 20% DPPS),  $314,244 \pm 0,330$  K (68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1),  $314,978 \pm 0,422$  K (56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1),  $315,461 \pm 0,210$  K (40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1) y  $315,200 \pm 0,460$  K (24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1).

Estos resultados se muestran a continuación:



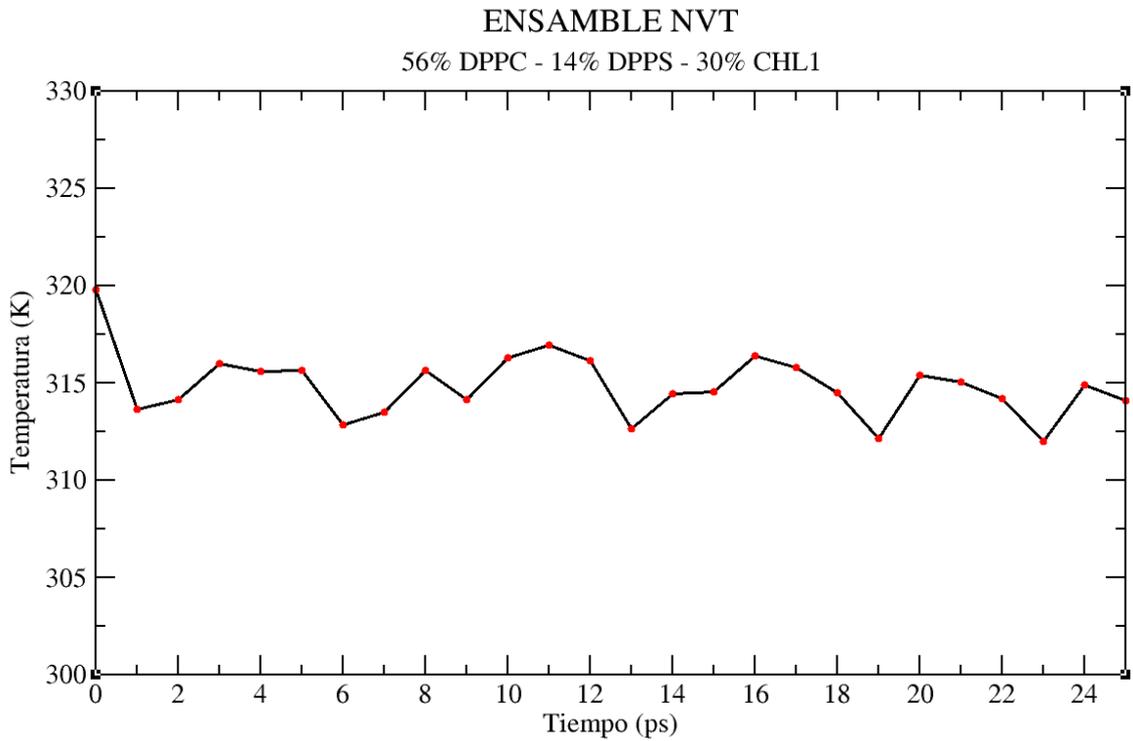
**Gráfico 2-4:** Temperatura del sistema 80% DPPC – 20% DPPS.

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.



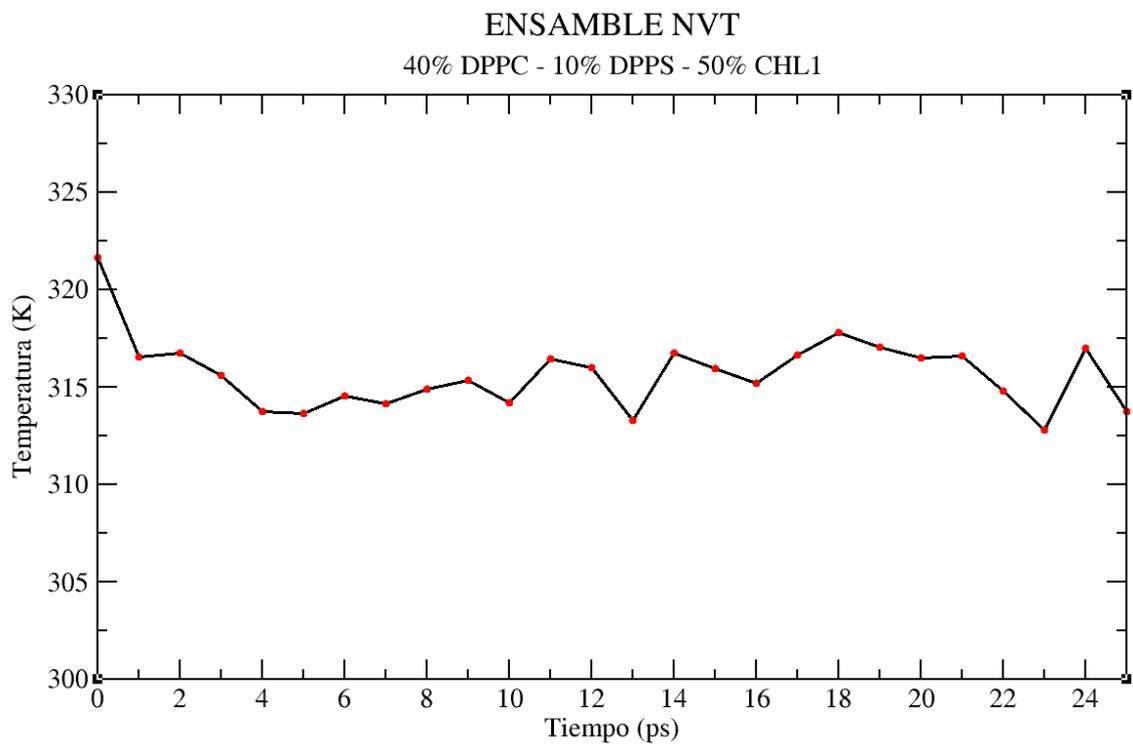
**Gráfico 3-4:** Temperatura del sistema 68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1.

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.



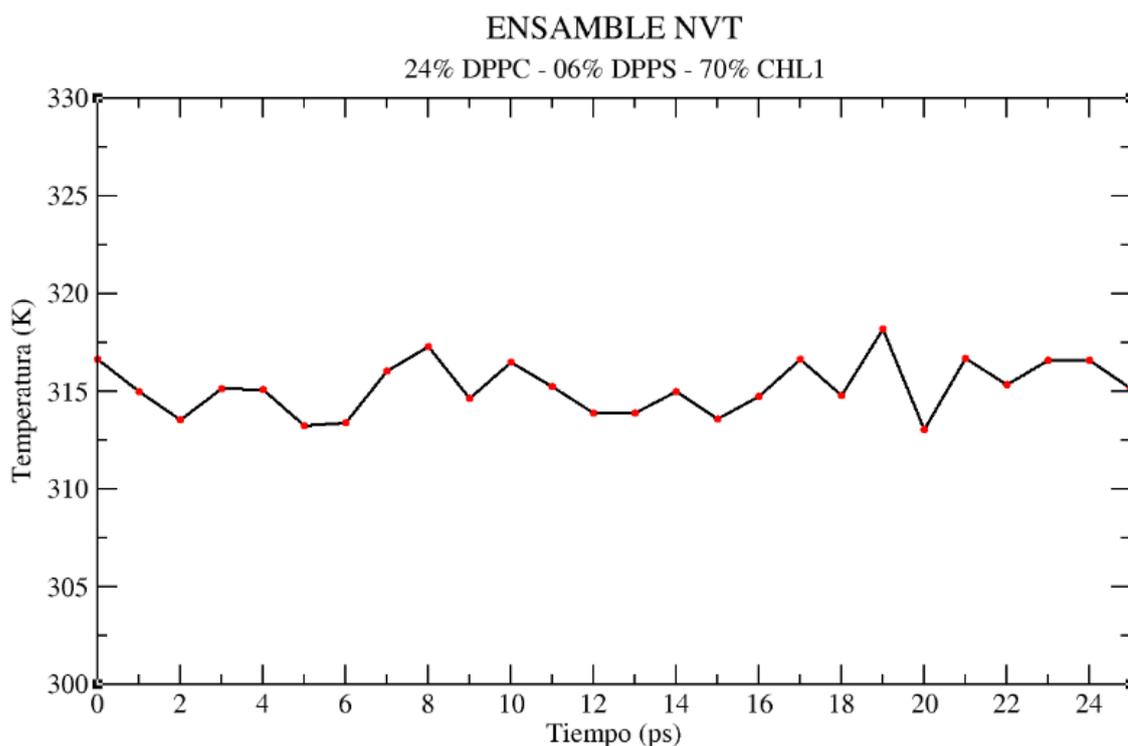
**Gráfico 4-4:** Temperatura del sistema 56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1.

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.



**Gráfico 5-4:** Temperatura del sistema 40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1.

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.



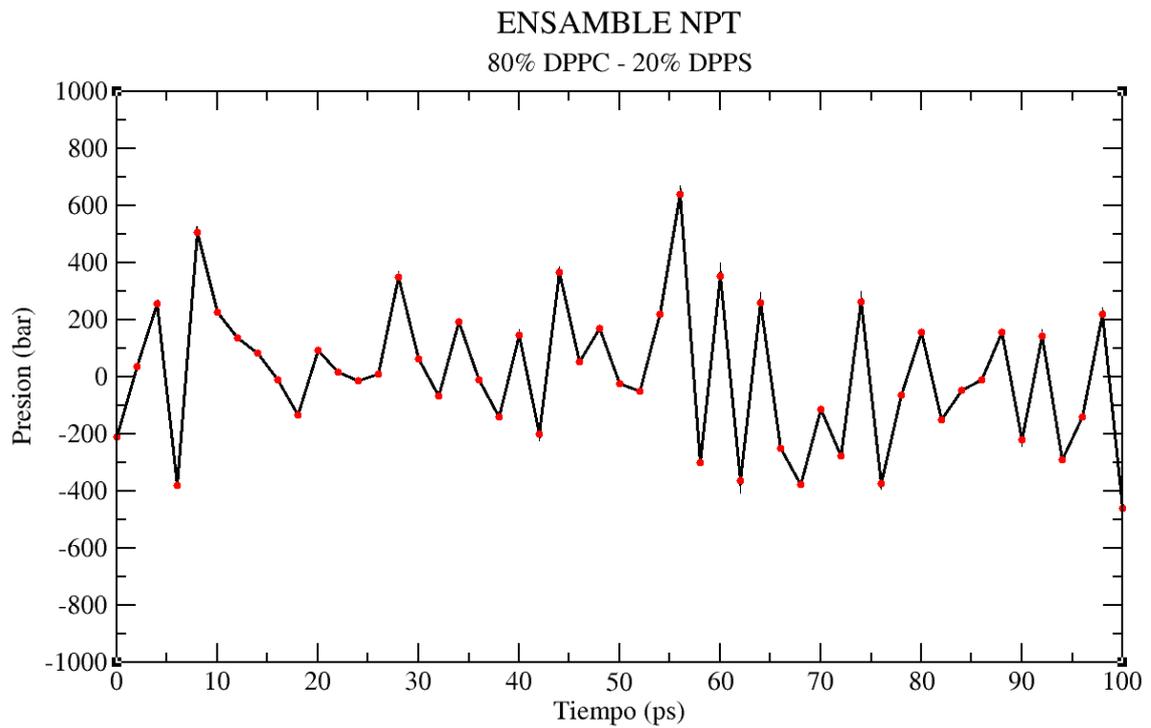
**Gráfico 6-4:** Temperatura del sistema 24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1.

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

En el Anexo B: Inputs step6. [1-2] \_equilibration.mdp para el equilibrio NVT. se muestra los parámetros de simulación para el equilibrio NVT del sistema.

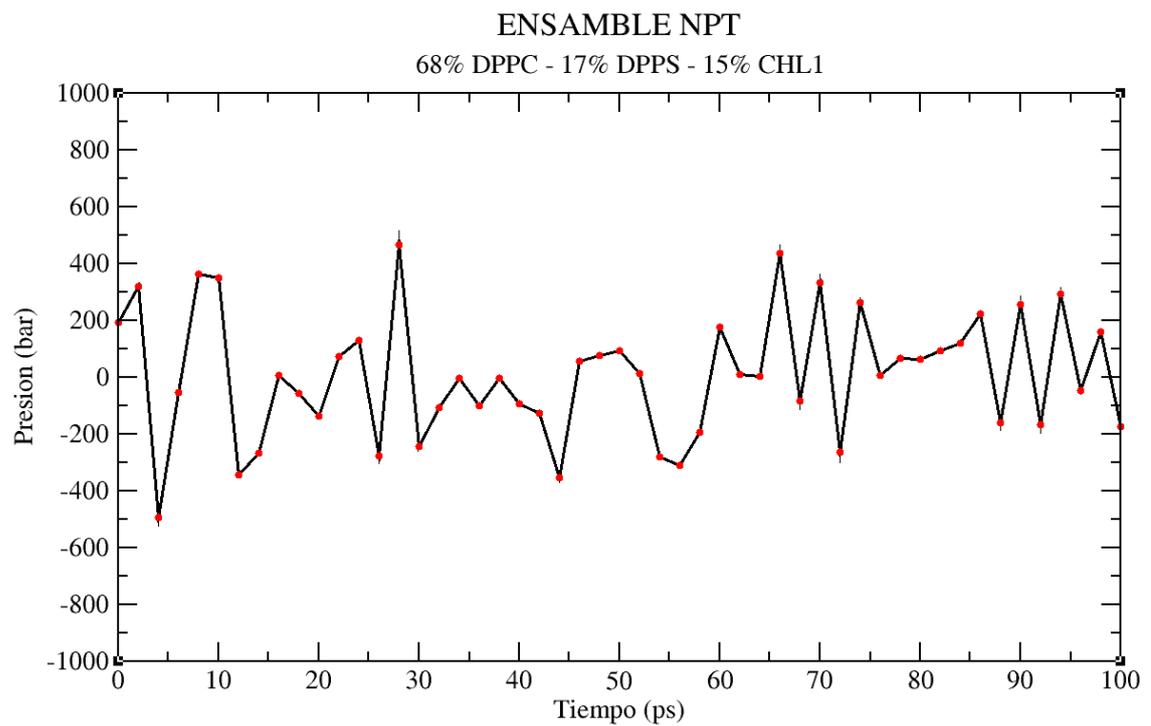
Posteriormente se sometió a los sistemas al ensamble NPT controlado por un barostato Parrinello-Rahman para mantener una presión constante  $P$  y una optimización del volumen. Los valores promedios obtenidos de la  $P$  son:  $-7,929 \pm 9,901$  bar (80% DPPC – 20% DPPS),  $6,997 \pm 5,600$  bar (68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1),  $4,509 \pm 9,501$  bar (56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1),  $-5,637 \pm 6,300$  bar (40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1) y  $28,363 \pm 16,001$  bar (24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1).

Los resultados se muestran a continuación:



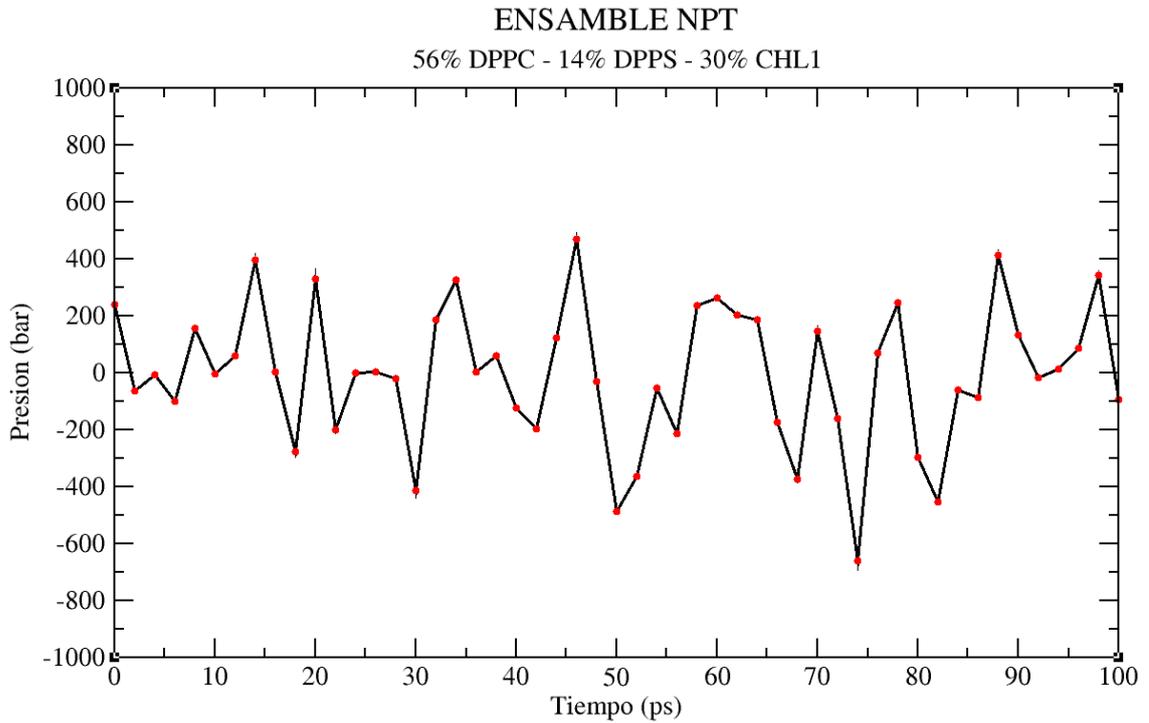
**Gráfico 7-4:** Presión del sistema 80% DPPC – 20% DPPS.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.



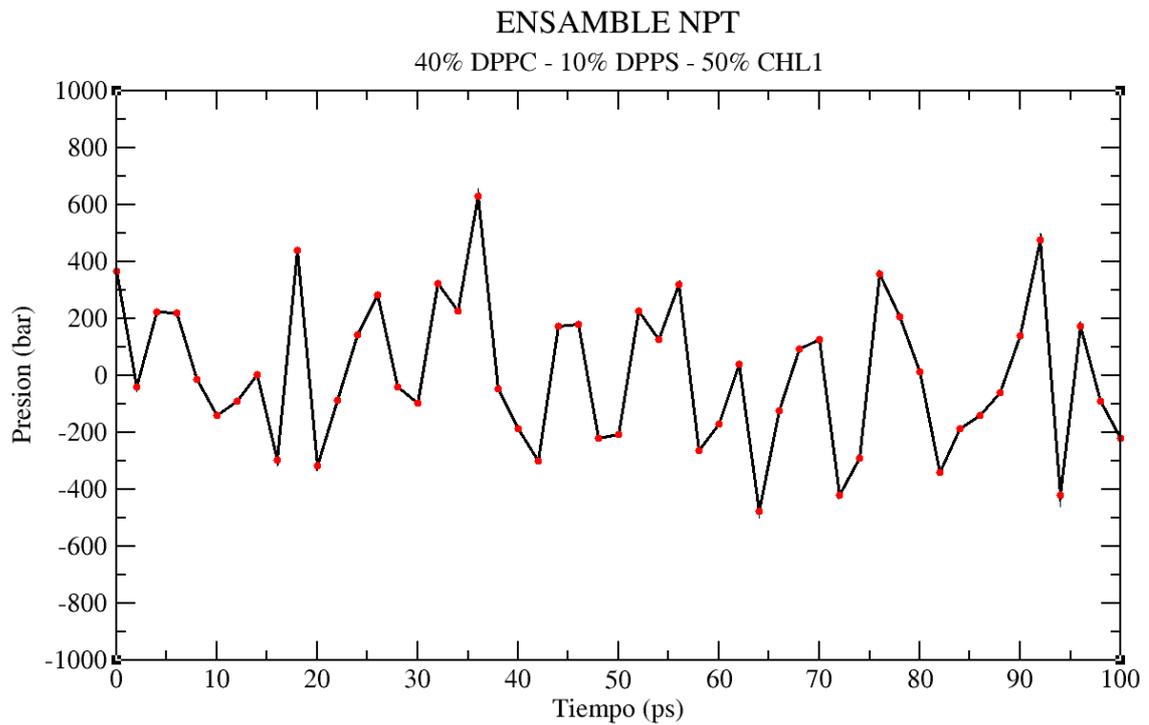
**Gráfico 8-4:** Presión del sistema 68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.



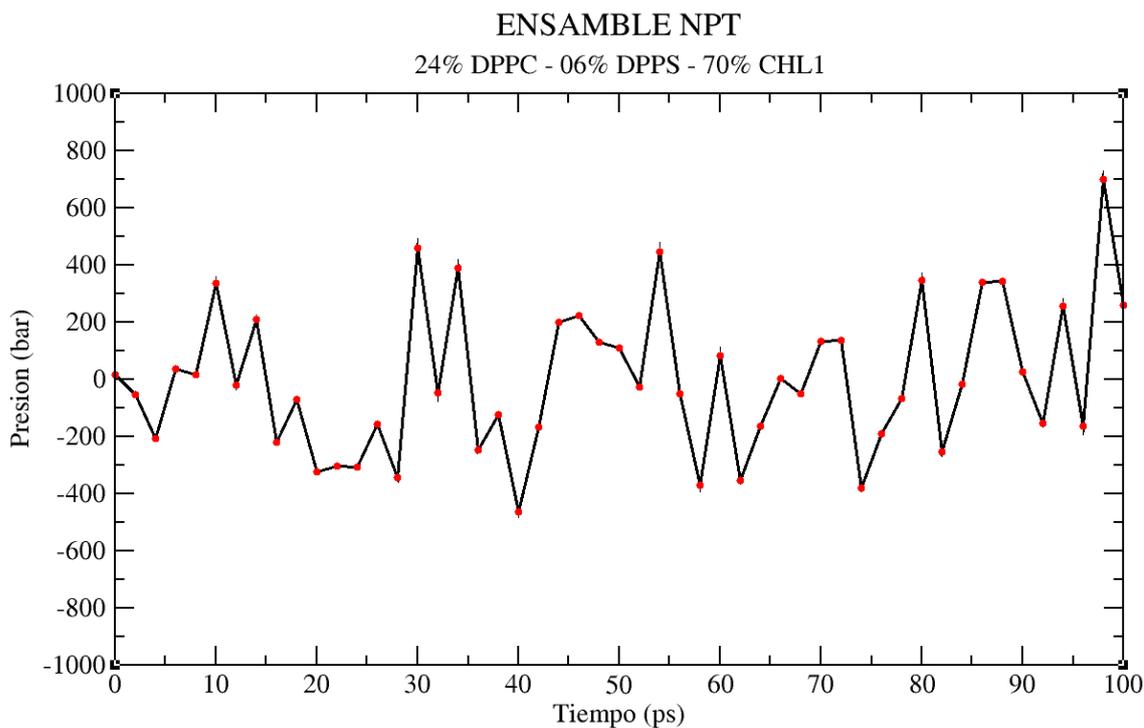
**Gráfico 9-4:** Presión del sistema 56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.



**Gráfico 10-4:** Presión del sistema 40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.



**Gráfico 11-4:** Presión del sistema 24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1.

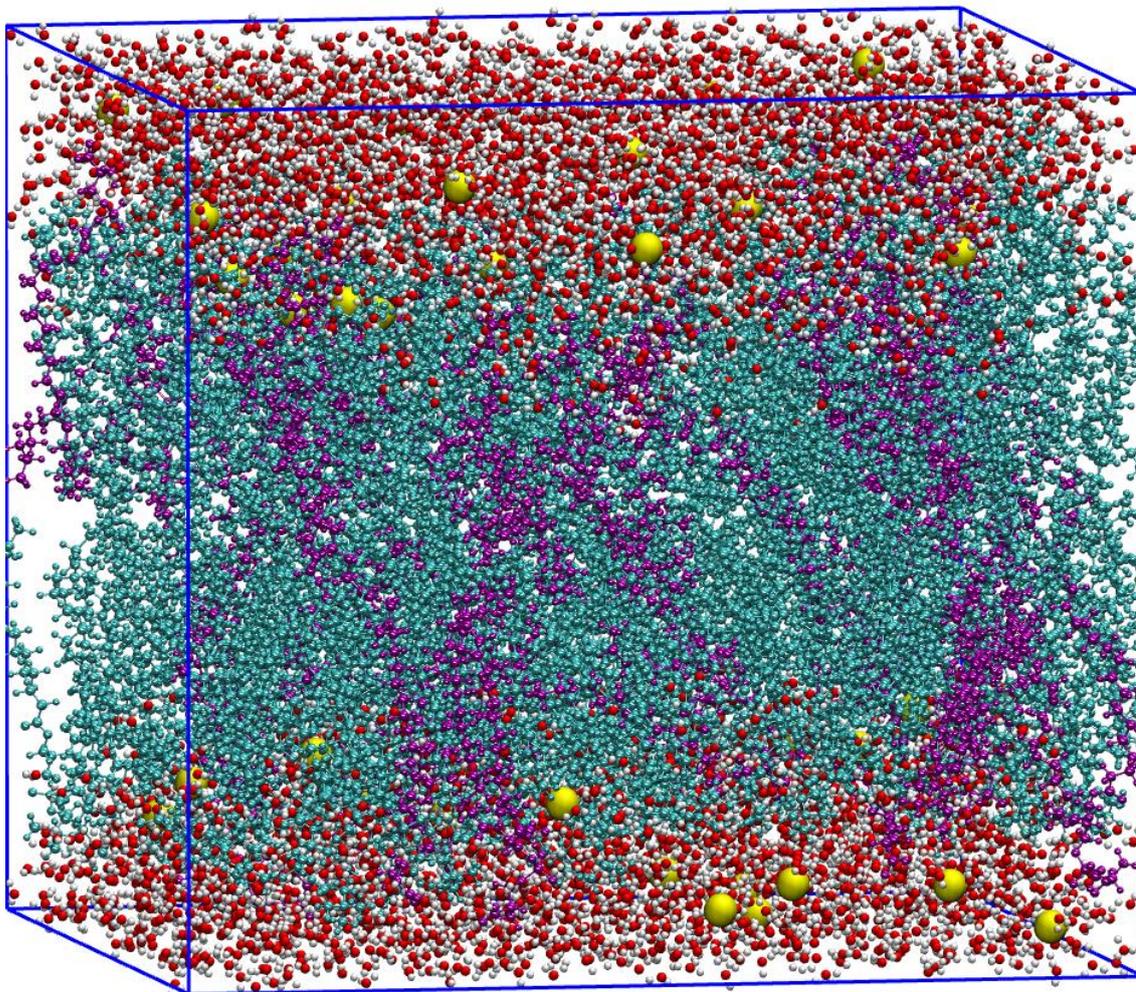
**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.

En el Anexo C: Inputs step6. [3-6]\_equilibration.mdp para el equilibrio NPT. se muestra los parámetros definidos para el equilibrio NPT.

## Producción

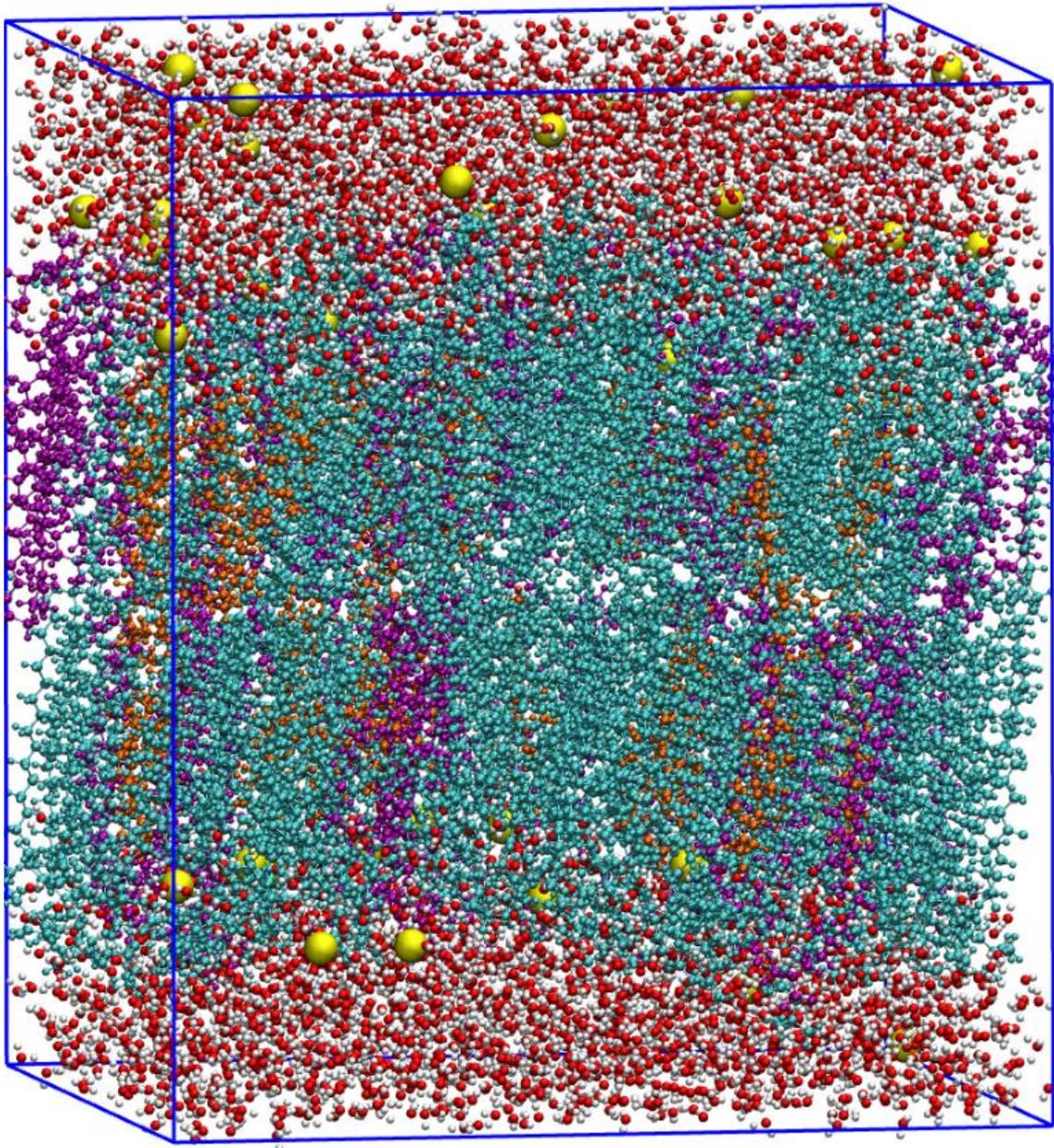
Se realizó una producción de 1ns (500 000 ps) con 9 extensiones de tiempo de 1 ns reuniendo como tal 10 ns de simulación. En cada extensión se creó un archivo de punto de control (.cpt). Estos archivos guardaron el estado de la simulación, incluyendo las variables extendidas de termostato / barostato, trayectorias, entre otras.

A continuación, se muestran las estructuras obtenidas al final de la simulación, las moléculas de agua se encuentran en la parte superior e inferior de la bicapa lipídica, los iones de Na están representados por el color amarillo, las moléculas de DPPC de celeste, las moléculas de DPPS de morado, las moléculas de CHL1 de marrón.



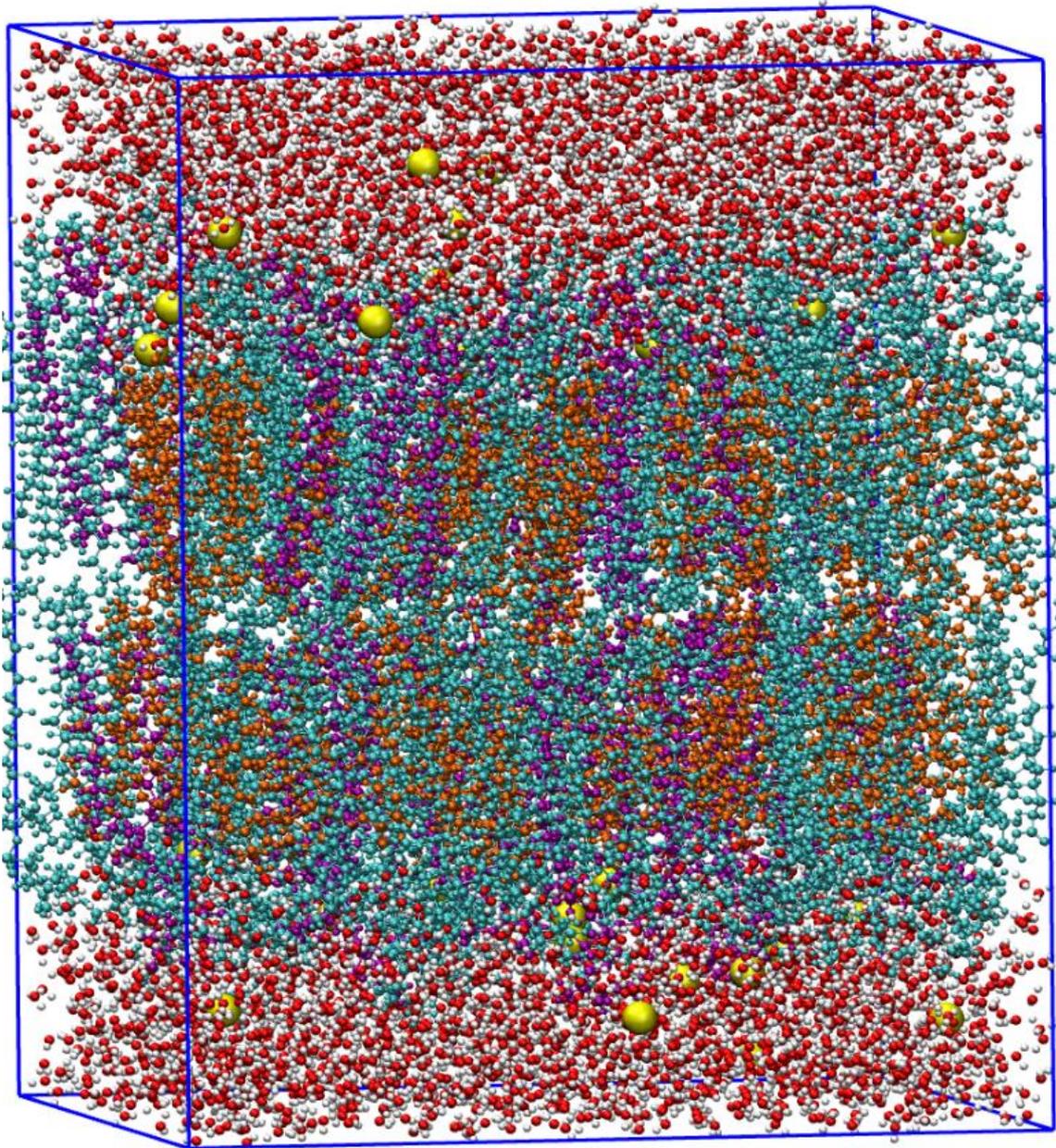
**Figura 4-4:** Representación molecular del sistema 80% DPPC – 20% DPPS después de 10 ns de simulación.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.



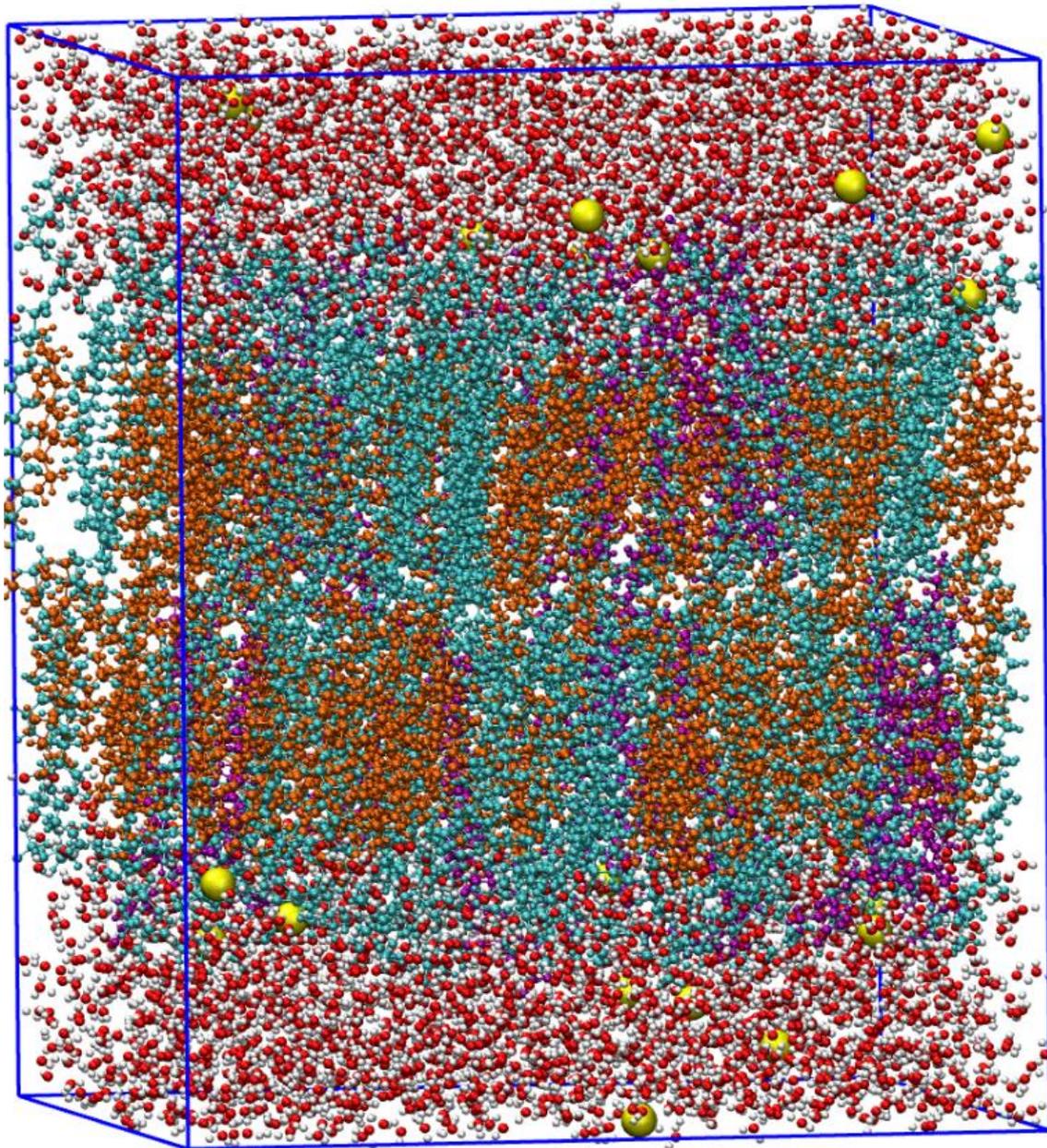
**Figura 5-4:** Representación del sistema molecular 68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1 después de 10 ns de simulación.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.



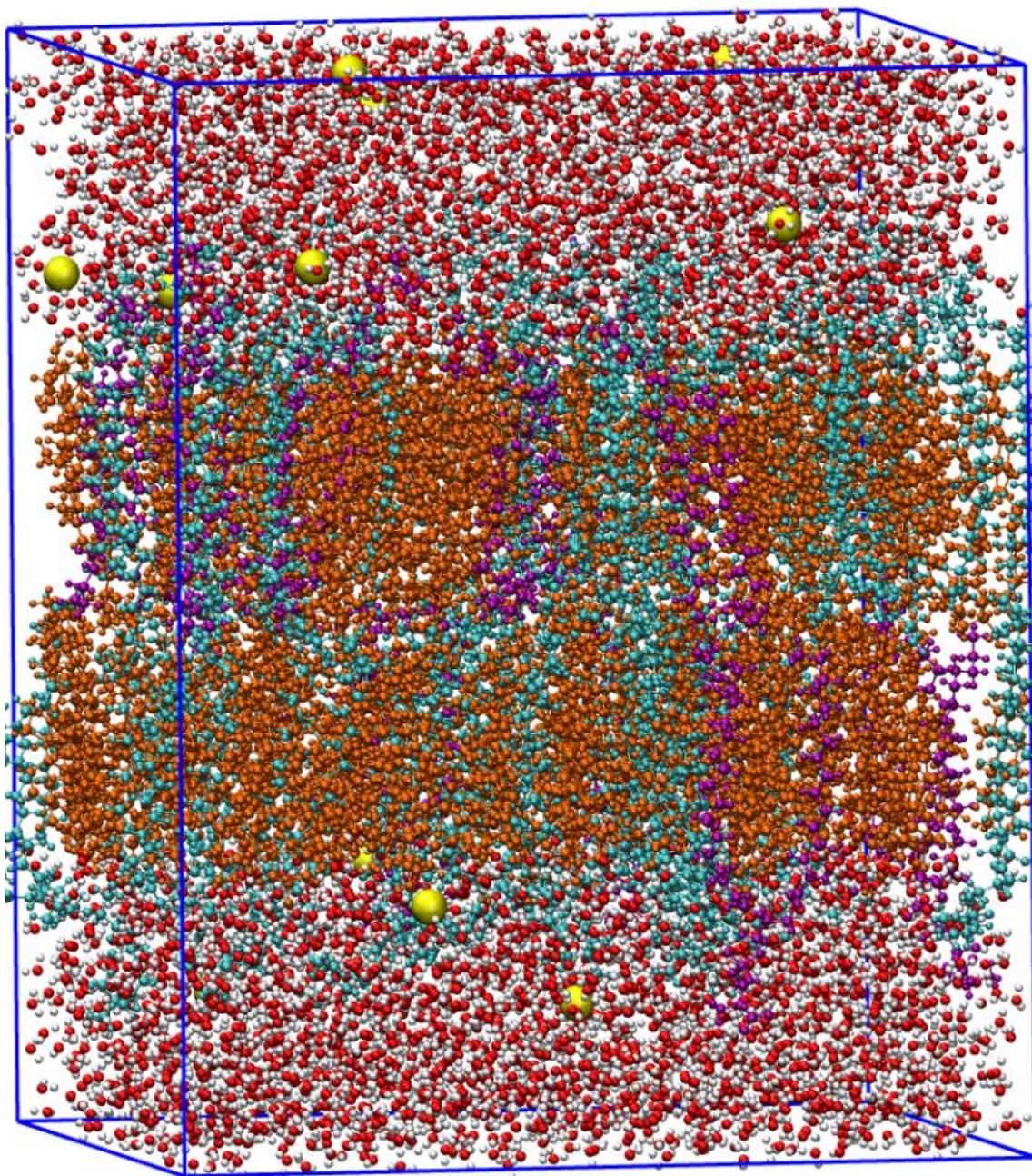
**Figura 6-4:** Representación molecular del sistema 56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1 después de 10 ns de simulación.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.



**Figura 7-4:** Representación molecular del sistema 40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1 después de 10 ns de simulación.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.



**Figura 8-4:** Representación molecular del sistema 24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1 después de 10 ns de simulación.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.

## 4.2 Cálculo de área molecular, tensión superficial y elasticidad de Gibbs

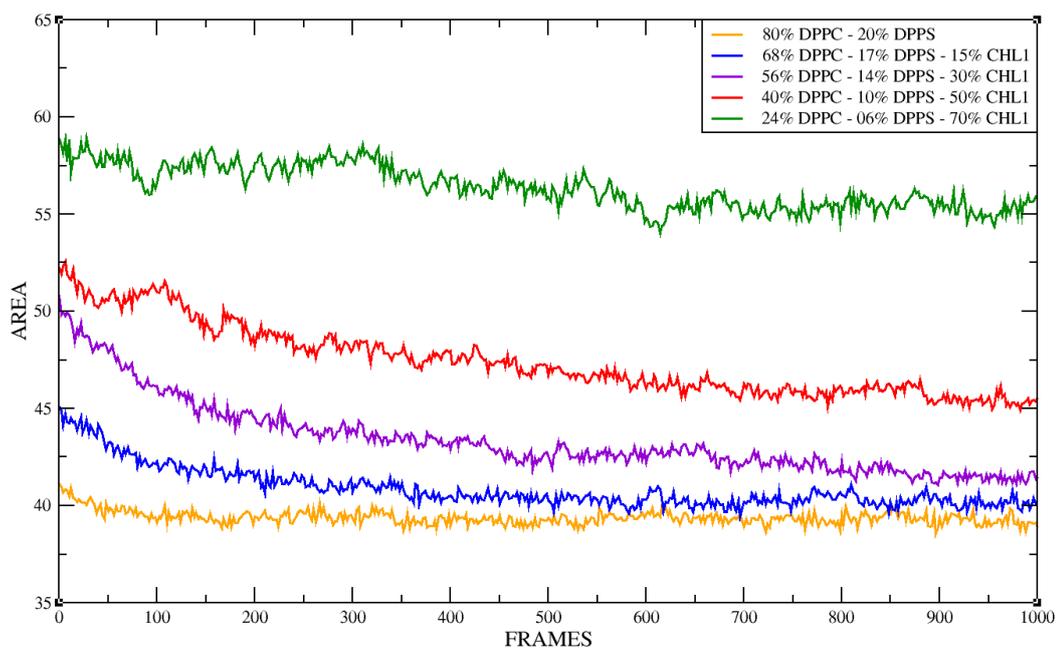
### 4.2.1 Área molecular

**Tabla 2-4:** Valores promedio del área molecular de cada una de las simulaciones.

	<b>DPPC</b> ( $\text{\AA}^2$ )	<b>DPPS</b> ( $\text{\AA}^2$ )	<b>CHL1</b> ( $\text{\AA}^2$ )	<b>Total</b> ( $\text{\AA}^2$ )
<b>80% DPPC – 20% DPPS</b>	57,477 $\pm$ 1,077	52,005 $\pm$ 2,090	-	56,383 $\pm$ 1,096
<b>68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1</b>	51,911 $\pm$ 0,947	47,511 $\pm$ 1,801	27,070 $\pm$ 1,644	47,438 $\pm$ 1,804
<b>56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1</b>	51,074 $\pm$ 0,994	46,241 $\pm$ 1,803	27,749 $\pm$ 1,130	43,400 $\pm$ 1,904
<b>40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1</b>	52,292 $\pm$ 1,439	49,220 $\pm$ 2,356	30,071 $\pm$ 1,097	40,874 $\pm$ 1,038
<b>24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1</b>	54,961 $\pm$ 1,538	53,308 $\pm$ 3,740	32,861 $\pm$ 0,725	39,392 $\pm$ 0,353

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

Los resultados obtenidos de área molecular mediante Memplugin se muestran en la Tabla 2-4. Se observó que a medida que aumenta la concentración de colesterol el área molecular total disminuye (Gráfico 12-4). Esto se debe a la ubicación del colesterol junto fosfolípidos. Los anillos de esteroide del colesterol interactúan con las colas de los lípidos provocando una condensación de la bicapa.



**Gráfico 12-4:** Área molecular de las 5 simulaciones de bicapas lipídicas a los 10 ns.

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

#### 4.2.2 Tensión Superficial

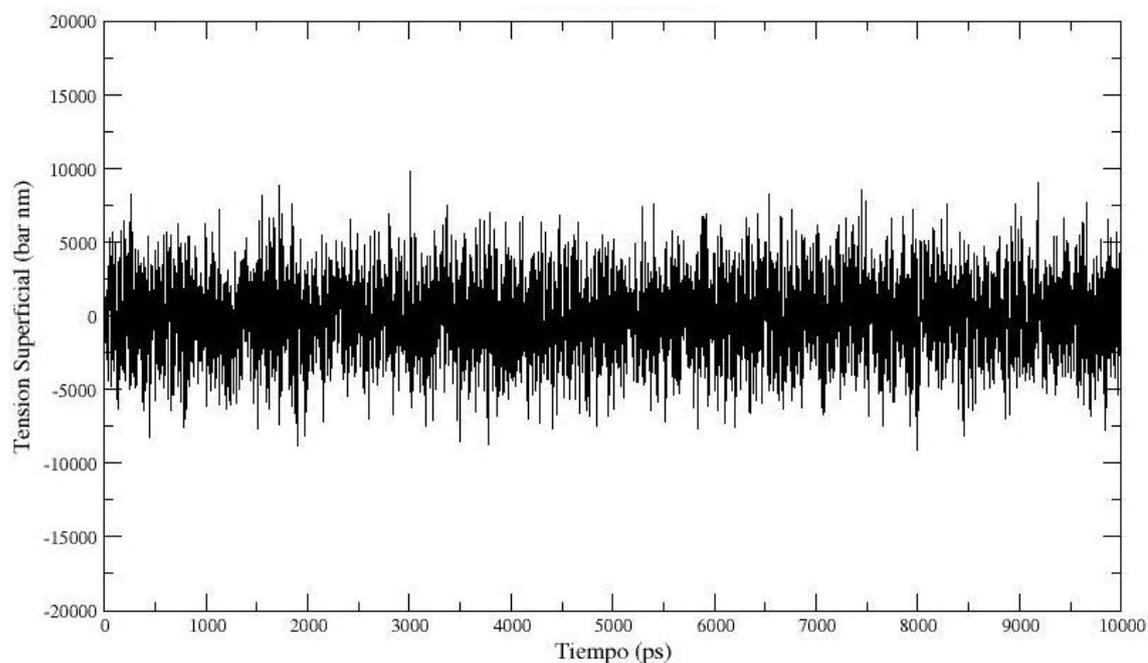
Las tensiones superficiales obtenidas para las 5 simulaciones se muestran en la Tabla 3-4. El comportamiento ideal al aumentar la concentración de colesterol es que la tensión superficial aumente significativamente. No obstante, sucede un comportamiento no ideal, ya que los resultados muestran una fluctuación de la tensión superficial a medida que aumenta la concentración de colesterol.

**Tabla 3-4:** Valores de tensión superficial promedio  $\gamma_s$  de cada una de las simulaciones.

Bicapas lipídicas	$\gamma_s$ (bar · nm)	$\gamma_s$ (mN / m)
80% DPPC – 20% DPPS	$-55,916 \pm 43,589$	$-5,591 \pm 4,359$
68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1	$-27,258 \pm 48,004$	$-2,726 \pm 4,800$
56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1	$75,646 \pm 51,337$	$7,565 \pm 5,134$
40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1	$-23,764 \pm 54,421$	$-2,376 \pm 5,442$
24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1	$24,859 \pm 55,896$	$2,486 \pm 5,589$

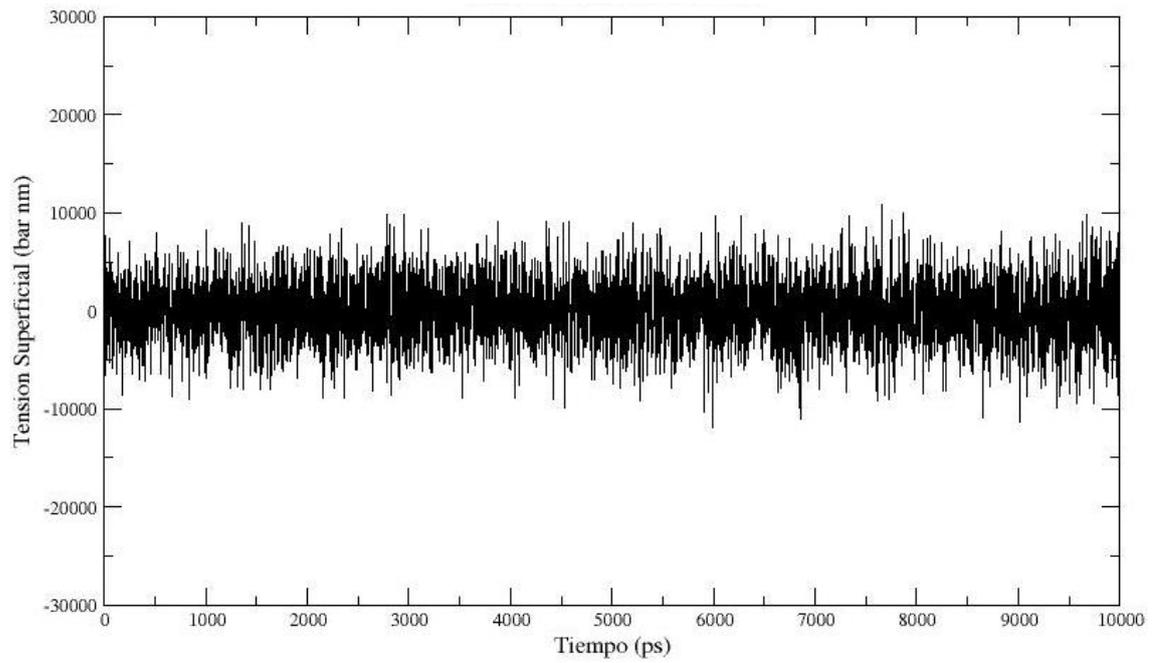
Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

A continuación, se muestran gráficas de la tensión superficial de cada una de las simulaciones durante 10 ns. En cada caso se aprecia una tensión superficial constante debido a que no actúan fuerzas externas para alterar estos valores.



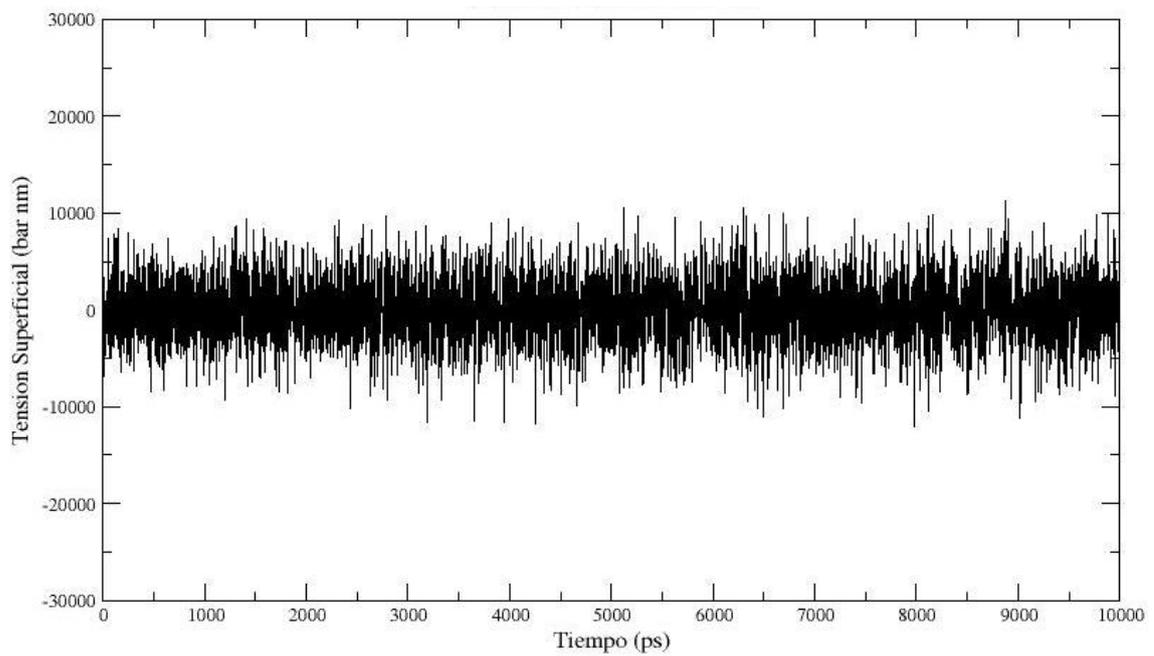
**Gráfico 13-4:** Tensión superficial de la simulación de 80% DPPC – 20% DPPS.

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.



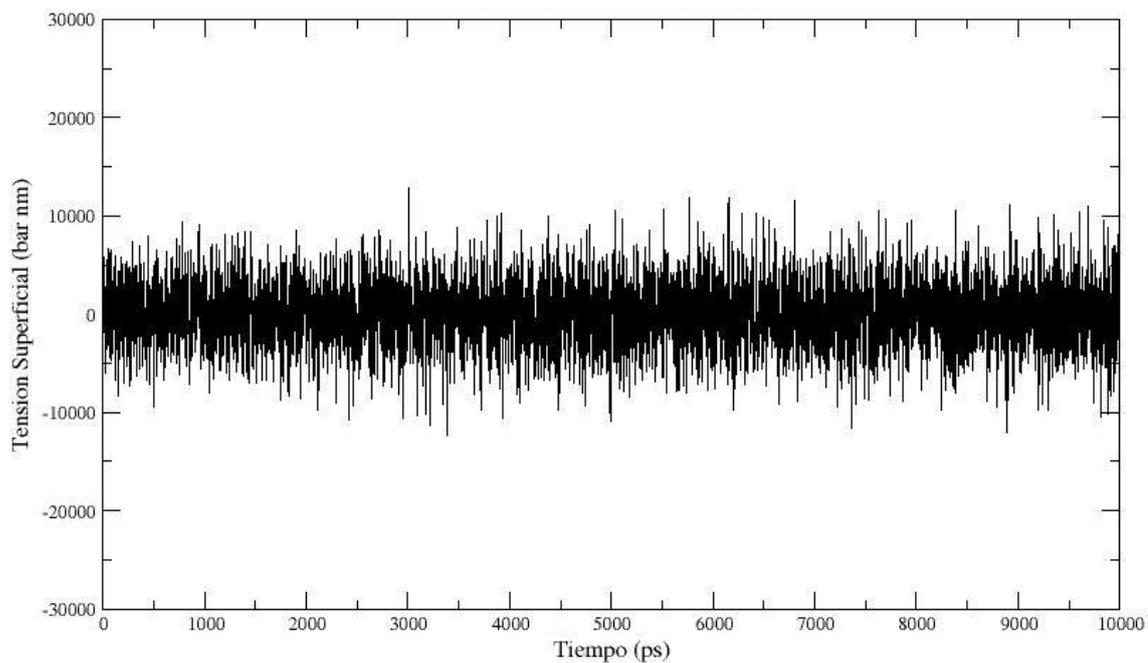
**Gráfico 14-4:** Tensión superficial de la simulación de 68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.



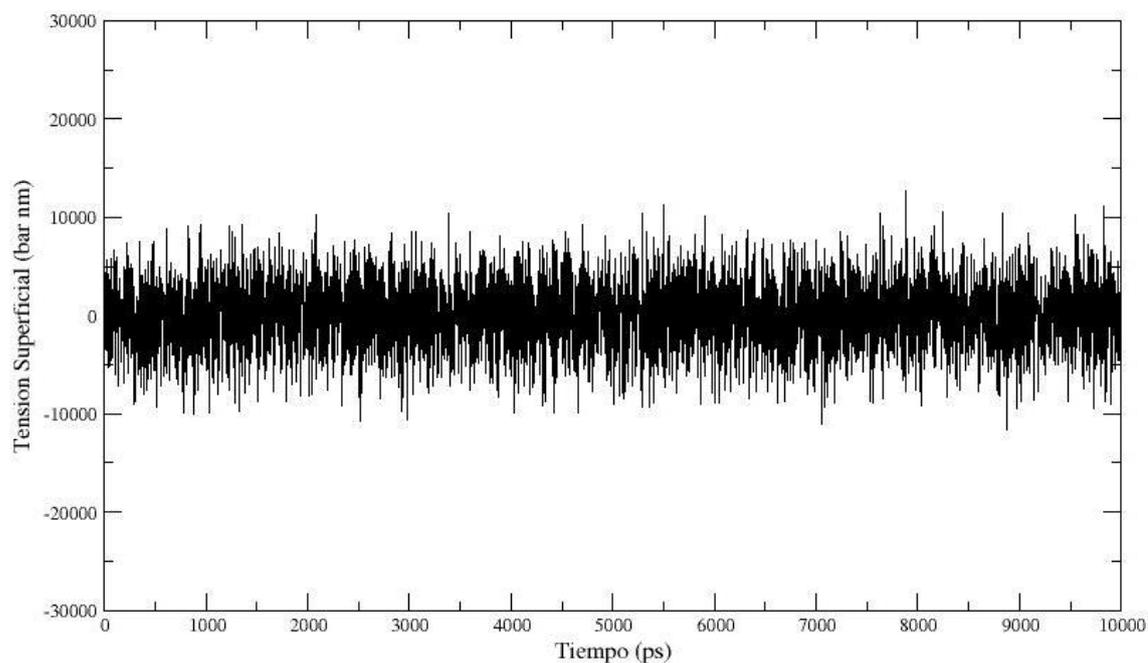
**Gráfico 15-4:** Tensión superficial de la simulación de 56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.



**Gráfico 16-4:** Tensión superficial de la simulación de 40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.



**Gráfico 17-4:** Tensión superficial de la simulación de 24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1.

**Realizado por:** Katherine Venegas, 2018.

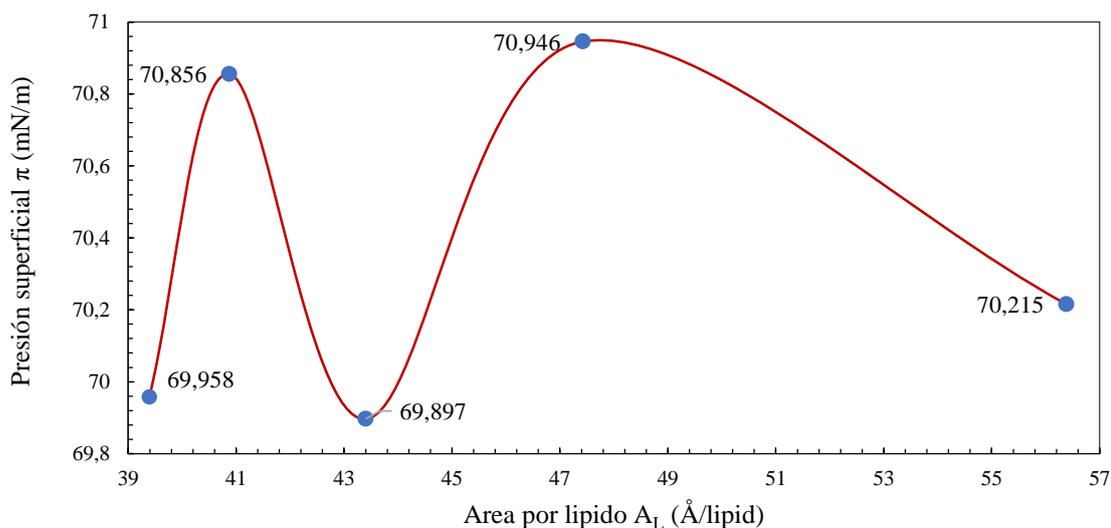
El cálculo de la presión superficial con los resultados obtenidos de la tensión superficial se obtuvo los valores de la Tabla 4-4.

**Tabla 4-4:** Valores de la isoterma presión superficial  $\pi$  – y el área por lípido  $A_L$ .

Bicapas lipídicas	Área por lípido ( $\text{\AA}^2/\text{lipid}$ )	Presión superficial $\pi$ (mN / m)
80% DPPC – 20% DPPS	$56,383 \pm 1,096$	$70,215 \pm 2,810$
68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1	$47,438 \pm 1,804$	$70,946 \pm 3,760$
56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1	$43,400 \pm 1,904$	$69,897 \pm 3,660$
40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1	$40,874 \pm 1,038$	$70,856 \pm 4,200$
24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1	$39,392 \pm 0,353$	$69,958 \pm 4,670$

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

Con los valores promedios obtenidos del área molecular y la presión superficial mostrados en la Tabla 4-4 se hizo una isoterma  $\pi - A_L$  que nos describe el comportamiento de la presión superficial en función del área por lípido (Gráfico 18-4). Se observó cambios mínimos a los 10 ns de las simulaciones.

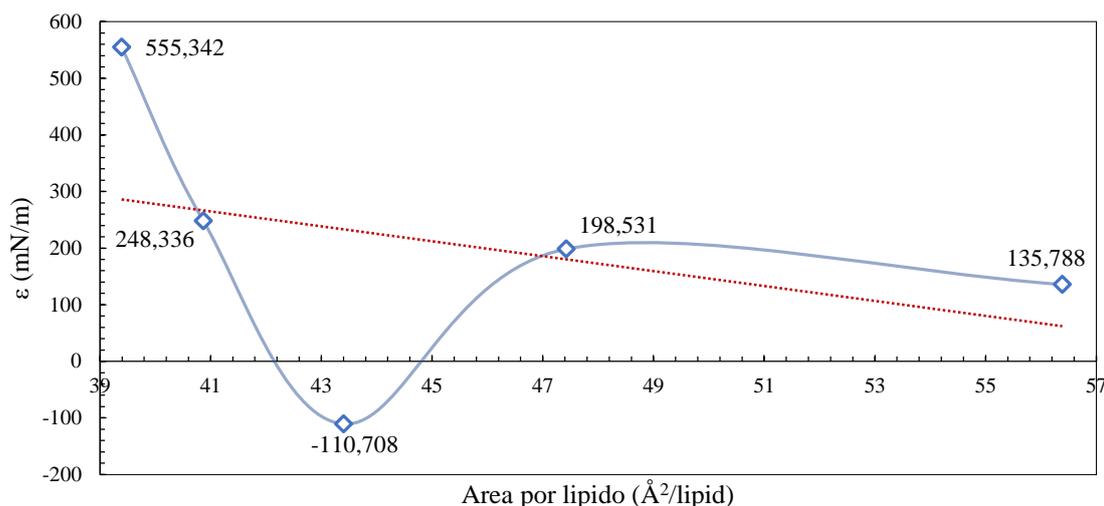


**Gráfico 18-4:** Isoterma  $\pi - A_L$ .

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

### 4.2.3 Elasticidad de Gibbs

Los resultados obtenidos de la elasticidad de Gibbs son los que se muestran en el Gráfico 19-4. Se corroboró como la elasticidad de Gibbs fluctúa mientras cambia el área por lípido.



**Gráfico 19-4:** Elasticidad de Gibbs  $\epsilon$  con respecto al área por lípido.

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

Los valores promedios de elasticidad de Gibbs mostrados en la Tabla 5-4 son los resultados obtenidos de los promedios del área total de las bicapas lipídicas y de las tensiones superficiales en cada nanosegundo de las simulaciones.

**Tabla 5-4:** Valores de la elasticidad de Gibbs promedio  $\epsilon$  y el área por lípido.

Bicapas lipídicas	Área por lípido (Å²/lípido)	$\epsilon$ (mN / m)
<b>80% DPPC – 20% DPPS</b>	56,383 ± 1,096	135,788 ± 0,697
<b>68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1</b>	47,438 ± 1,804	198,531 ± 1,887
<b>56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1</b>	43,400 ± 1,904	-110,708 ± 0,357
<b>40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1</b>	40,874 ± 1,038	248,336 ± 0,160
<b>24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1</b>	39,392 ± 0,353	555,342 ± 0,342

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

Las bicapas lipídicas son flexibles cuando  $\epsilon < 50$  mN/m y rígidas cuando  $\epsilon > 50$  mN/m. La bicapa lipídica simulada que mostró mayor rigidez es la que contiene 70% de colesterol; y se presentó una capa lipídica con mayor flexibilidad cuando contiene 30% de colesterol.

#### 4.3 Comparación de resultados obtenidos con resultados experimentales

Las comparaciones de los resultados obtenidos se realizaron con tres trabajos experimentales. El primero se trata de un estudio de monocapas de fosfolípidos en interfase agua-aire con diferentes concentraciones de colesterol, además se calculó propiedades tales como la presión superficial  $\pi$ ,

área molecular y la elasticidad de Gibbs mediante la balanza de Langmuir. Este dispositivo permite medir la presión superficial  $\pi$  en función del área molecular  $A$  (Yang, 2014). Las monocapas elaboradas fueron de DPPC y DPPS sin iones presentes.

El segundo trabajo se trata de una tesis de maestría sobre el estudio de las moléculas anfifílicas sobre la tensión superficial del agua. Además, se calculó el efecto de los iones sobre la elasticidad de Gibbs de la monocapa de adsorción, se midió la tensión superficial de soluciones preparadas de dodecil sulfato sódico (SDS) aumentando la fuerza iónica de la solución con Cloruro de Sodio (NaCl). El SDS es un tensoactivo de gran importancia en la industria de productos de aseo y debido a su importancia en la industria se realizó tal estudio (Arteaga, 2014).

La relación que tienen los resultados obtenidos con el segundo trabajo experimental es debido a las propiedades de sistemas coloidales. Al igual que los tensoactivos, las bicapas lipídicas pueden ser evaluadas con estas propiedades como es la elasticidad de Gibbs.

El tercer trabajo se trata de un estudio de la interacción fosfolípido-colesterol en interfase aire-agua, obteniendo resultados de área molecular, presión superficial y elasticidad de Gibbs. Este trabajo se realizó con una balanza de Langmuir (Quingatuña, 2016).

#### 4.3.1 Comparación del área molecular con resultados experimentales

En comparación con los resultados de Yang no se vieron diferencias significativas. La disminución del área molecular a medida que aumenta la concentración de colesterol es evidente en ambos casos (Tabla 6-4). Además, los resultados de Yang experimentan fuerzas externas que permiten al usuario influir en la densidad molecular del lípido en la superficie.

**Tabla 6-4:** Comparación del Área molecular.

Bicapas lipídicas	Área molecular ( $\text{Å}^2$ )	
	Obtenidos	Yang, 2014
<b>80% DPPC – 20% DPPS</b>	56,383 $\pm$ 1,096	59,10 $\pm$ 0,30
<b>68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1</b>	47,438 $\pm$ 1,804	-
<b>56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1</b>	43,400 $\pm$ 1,904	41,20 $\pm$ 0,30
<b>40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1</b>	40,874 $\pm$ 1,038	-
<b>24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1</b>	39,392 $\pm$ 0,353	37,01 $\pm$ 0,30

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

### 4.3.2 Comparación de la presión superficial con resultados experimentales

El comportamiento de la presión superficial es igual en ambos casos, no obstante, los resultados obtenidos tienen diferencias debido a que los resultados experimentales ejercen una compresión por fuerzas externas a diferencias de las simulaciones computacionales de esta investigación. A medida que se ejerce esta presión sobre las muestras las moléculas vecinas empiezan a ejercer fuerzas de repulsión entre ellas dando como resultado los datos experimentales mostrados en la Tabla 7-4.

Las interfases utilizadas en ambos casos también influyen en las diferencias de la presión superficial.

**Tabla 7-4:** Comparación de la Presión superficial  $\pi$ .

Bicapas lipídicas	Presión superficial $\pi$ (mN / m)	
	Obtenidos	Quingatuña, 2016
<b>80% DPPC – 20% DPPS</b>	70,215 $\pm$ 2,810	53 $\pm$ 0,02
<b>68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1</b>	70,946 $\pm$ 3,760	-
<b>56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1</b>	69,897 $\pm$ 3,660	44,410 $\pm$ 0,02
<b>40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1</b>	70,856 $\pm$ 4,200	-
<b>24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1</b>	69,958 $\pm$ 4,670	46,760 $\pm$ 0,02

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

### 4.3.3 Comparación de la elasticidad de Gibbs con resultados experimentales

Se comprobó que el comportamiento de la elasticidad de Gibbs es el mismo en los dos casos. Sin embargo, existen diferencias en los resultados obtenidos debido a la presencia de iones en las simulaciones. Los resultados de Yang son menores que los obtenidos en este trabajo debido a la ausencia de iones en su composición (Tabla 8-4).

**Tabla 8-4:** Comparación de la elasticidad de Gibbs  $\epsilon$ .

Bicapas lipídicas	Elasticidad de Gibbs $\epsilon$ (mN / m)	
	Resultados	Yang, 2014
<b>80% DPPC – 20% DPPS</b>	135,788 $\pm$ 0,697	116 $\pm$ 7
<b>68% DPPC – 17% DPPS – 15% CHL1</b>	198,531 $\pm$ 1,887	-
<b>56% DPPC – 14% DPPS – 30% CHL1</b>	-110,708 $\pm$ 0,357	77 $\pm$ 12
<b>40% DPPC – 10% DPPS – 50% CHL1</b>	248,336 $\pm$ 0,160	-
<b>24% DPPC – 06% DPPS – 70% CHL1</b>	555,342 $\pm$ 0,342	85 $\pm$ 15

Realizado por: Katherine Venegas, 2018.

En el trabajo de Arteaga con SDS se muestran valores de la elasticidad de Gibbs de 98,9 mN/m con 0,1 mM de NaCl; y 827,41 mN/m con 100mM de NaCl. Por lo tanto, los resultados obtenidos tienen sentido, debido a los iones presentes en cada una de las simulaciones, también por el cambio del área de superficie en cada bicapa y por la dependencia de la elasticidad de Gibbs con la tensión superficial.

## CONCLUSIONES

Las simulaciones en MD de los cinco modelos moleculares construidos brindaron información útil y confiable a una escala atomística de los efectos que tienen el colesterol sobre los fosfolípidos en las bicapas lipídicas. Cada modelo se construyó con diferentes concentraciones de colesterol dando como resultado simulaciones de 10 ns en equilibrio térmico respetando el comportamiento de las bicapas lipídicas, por tal motivo se pueden validar los resultados obtenidos en un contexto biofísico y termodinámico.

El efecto de condensación de los fosfolípidos frente a la presencia del colesterol se evaluó mediante los valores de área molecular de las 5 simulaciones computacionales. El área molecular disminuyó a medida que la concentración de colesterol aumenta.

Las cinco bicapas lipídicas no experimentaron cambios en la tensión superficial durante el tiempo de cada simulación. No obstante, se observó fluctuaciones en la tensión superficial a medida que la concentración de colesterol aumenta demostrando el comportamiento no ideal del colesterol frente a los fosfolípidos de membrana.

Los valores obtenidos de la elasticidad de Gibbs evidenciaron que existe mayor rigidez en la bicapa con 70% de colesterol en su composición. En membranas biológicas esta rigidez implicaría el impedimento del transporte de sustancias fuera y dentro de la célula por ende afectaría al funcionamiento total del sistema. La bicapa con mayor flexibilidad fue la bicapa lipídica con 30% de colesterol.

Las comparaciones del área molecular con resultados experimentales demostraron las similitudes de los resultados obtenidos con los resultados experimentales. En los dos casos se verificó que mientras la concentración de colesterol es mayor, el área molecular disminuye.

Al comparar la presión superficial de los resultados obtenidos con los experimentales se corroboró el comportamiento que tienen las capas lipídicas con mayor concentración de colesterol. En cuanto a los valores se hallaron discrepancias debido a que las interfases de las capas simuladas y las capas hechas experimentalmente son diferentes. Las primeras son de tipo agua/lípido y agua/aire, mientras que las segundas son interfases agua/aire.

Se comparó la elasticidad de Gibbs, coincidiendo en el comportamiento de ambos casos. Se evidenció que las variaciones en los resultados no solo dependen del área de superficie de la

bicapa y de la tensión superficial, sino también de la concentración de iones en los sistemas. Las interfaces de ambos casos también influyeron en estas diferencias.

## **RECOMENDACIONES**

Tomar como referencia la presente investigación para posteriores estudios en el campo de la biofísica de membranas. Además, profundizar el análisis de diferentes parámetros que evalúan el comportamiento no ideal del colesterol frente a los fosfolípidos en las bicapas lipídicas.

Se recomienda realizar simulaciones de membranas biológicas lo más reales posibles. Esto implica trabajar con sistemas moleculares complejos y procesadores que puedan soportar la producción de las simulaciones.

Se recomienda utilizar software más sofisticados para el análisis biofísico de las membranas.

Se recomienda realizar un análisis estadístico para la comparación de las simulaciones con trabajos experimentales publicados.

## BIBLIOGRAFÍA

**ABRAHAM, M., et al.,** *GROMACS User Manual version 5.0.4* [en línea]. 2014. Disponible en: [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org).

**ALBERTS, B., et al.,** "The Lipid Bilayer". *Molecular Biology of the Cell* [en línea].(2002) 4. New York: Garland Science, pp. 1392. [Consulta: 7 enero 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/>.

**ALWARAWRAH, M., et al.,** "A molecular view of the cholesterol condensing effect in DOPC lipid bilayers". *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 114, n° 22, (2010), pp. 7516-7523. ISSN 15205207.

**ARGÜESO ARMESTO, R., et al.,** "Lípidos , colesterol y lipoproteínas". *Galicia Clínica / Sociedade Galega de Medicina Interna* [en línea], vol. 72, (2011), pp. 7,17. ISSN 1989-3922. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i1953s.pdf>.

**ARTEAGA, A.,** *Tensión superficial y elasticidad de Gibbs de la superficie libre de una solución iónica en presencia de moléculas anfífilas* [en línea]. (2014). (Tesis). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Disponible en: <http://benem-mt.iii.com/iii/cpro/DigitalItemPdfViewerPage.external?id=6930839063974242&itemId=1001350&lang=spi&file=%2Fiii%2Fpro%2Fapp%3Fid%3D6930839063974242%26itemId%3D1001350%26lang%3Dspi%26nopassword%3Dtrue%26service%3Dblob%26suite%3Ddef#page=1&zom=>.

**BARBER, et al.,** "The quickhull algorithm for convex hulls". *ACM Transactions on Mathematical Software* [en línea], vol. 22, n° 4, (1996), pp. 469-483. ISSN 00983500. Disponible en: <http://portal.acm.org/citation.cfm?doid=235815.235821>.

**BARRAGÁN, D.,** *Evaluación del campo de fuerza CHARMM27 implementado en NAMD para la simulación de ADN G-cuádruple tetramoleculares y paralelos*. (Tesis). (Pregado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador, 2015, pp. 6,9-10.

**BROWN, B.,** *Biological Membranes* [en línea]. (1996). pp.1-12. Manchester: Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012382163800013X>.

**CAI, W., LI, J.; YIP, S.,** "Molecular dynamics". *Comprehensive Nuclear Materials*, vol. 1, (2012), pp. 249-265. ISSN 047001590X.

**CAI, W.,** Introduction to Statistical Mechanics [en línea]. (2011). Stanford University. [Consulta: 7 enero 2018]. Disponible en: [http://micro.stanford.edu/~caiwei/me334/Chap9\\_NPT\\_Grand\\_Canonical\\_Ensemble\\_v04.pdf](http://micro.stanford.edu/~caiwei/me334/Chap9_NPT_Grand_Canonical_Ensemble_v04.pdf).

**DE MEYER, F.; SMIT, B.,** "Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer". *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en línea], vol. 106, nº 10, (2009), pp. 3654-3658. ISSN 0027-8424.

**DEMEL, R.A., et al.,** "Monolayer interactions of phospholipids and cholesterol". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [en línea], vol. 135, nº 1, (1967), pp. 11-19. [Consulta: 18 junio 2018]. ISSN 0005-2736. DOI 10.1016/0005-2736(67)90003-X. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000527366790003X>.

**ECHELON BIOSCIENCES INCORPORATED,** "DPPC". [en línea]. [Consulta: 5 febrero 2018 a]. Disponible en: <http://www.echelon-inc.com/index.php?module=Products&func=detail&id=617>.

**ECHELON BIOSCIENCES INCORPORATED,** "DPPS". [en línea]. [Consulta: 5 febrero 2018 b]. Disponible en: <http://www.echelon-inc.com/index.php?module=Products&func=detail&id=623>.

**EDHOLM, O.; NAGLE, J.F.,** "Areas of molecules in membranes consisting of mixtures". *Biophysical journal* [en línea], vol. 89, nº 3, (2005), pp. 1827-32. [Consulta: 18 junio 2018]. ISSN 0006-3495. DOI 10.1529/biophysj.105.064329. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994905>.

**EEMAN, M.; DELEU, M.,** "From biological membranes to biomimetic model membranes". *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* [en línea], vol. 14, nº 4, (2010), pp. 719-736. ISSN 1370-6233. Disponible en: <http://popups.ulg.ac.be/Base/document.php?id=6568>.

**GRIMA, C.,** "El diagrama de Voronoi, la forma matemática de dividir el mundo". [en línea]. (2017). [Consulta: 18 junio 2018]. Disponible en: [http://www.abc.es/ciencia/abci-diagrama-voronoi-forma-matematica-dividir-mundo-201704241101\\_noticia.html](http://www.abc.es/ciencia/abci-diagrama-voronoi-forma-matematica-dividir-mundo-201704241101_noticia.html).

- GUIXÀ-GONZÁLEZ, et al.**, "MEMBPLUGIN: studying membrane complexity in VMD". *Bioinformatics* [en línea], vol. 30, n° 10, (2014), pp. 1478-1480. [Consulta: 18 junio 2018]. ISSN 1460-2059. Disponible en: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btu037>.
- HOFSAË, C., et al.**, "Molecular Dynamics Simulations of Phospholipid Bilayers with Cholesterol". *Biophysical Journal* [en línea], vol. 84, n° 4, (2003), pp. 2192-2206. ISSN 00063495. DOI 10.1016/S0006-3495(03)75025-5. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349503750255>.
- HUNG, W., et al.**, "The Condensing Effect of Cholesterol in Lipid Bilayers". *Biophysical Journal* [en línea], vol. 92, n° 11, (2007), pp. 3960-3967. ISSN 0006-3495. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.099234>.
- KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.**, *Histología y biología celular : introducción a la anatomía patológica*. (2012). Elsevier España. ISBN 9788490220085.
- LEATHES, J.B.**, "Croonian Lectures on the role of fats in vital phenomena". *The Lancet* [en línea], vol. 205, n° 5304, (1925), pp. 853-856. ISSN 01406736. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673601223101>.
- LEE, J., et al.**, "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° 1, (2016), pp. 405-413. ISSN 15499626. DOI 10.1021/acs.jctc.5b00935.
- LOZANO APONTE, J.; SCIOR, T.**, "¿Qué sabe usted acerca de Dinámica Molecular? What do you know about ... Molecular Dynamics ?". *45* [en línea], vol. 1, (2014), pp. 86-88. ISSN 1870-0195. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57932293010>.
- MCCONNELL, H.M.; RADHAKRISHNAN, A.**, "Condensed complexes of cholesterol and phospholipids". *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1610, n° 2, (2003), pp. 159-173. ISSN 00052736. DOI 10.1016/S0005-2736(03)00015-4.
- MÜLLER, P.; HERRMANN, A.**, "Rapid transbilayer movement of spin-labeled steroids in human erythrocytes and in liposomes". *Biophysical Journal*, vol. 82, n° 3, (2002), pp. 1418-1428. ISSN 00063495. DOI 10.1016/S0006-3495(02)75496-9.

- PHILLIPS, M.C.**, "The Physical State of Phospholipids and Cholesterol in Monolayers, Bilayers, and Membranes". *Progress in Surface and Membrane Science* [en línea], vol. 5, (1972), pp. 139-221. [Consulta: 18 junio 2018]. ISSN 0096-4298. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125718059500099>.
- QUEMBA, L.; GAMBA, W.**, "Bio - Membranas: Una Aproximación Via Simulaciones Computacionales". [en línea], (2015), pp. 1-88. Disponible en: <http://repository.udistrital.edu.co/bitstream/11349/2526/1/QuembaAlejandroGambaWalther2015.pdf>.
- QUINGATUÑA, D.**, *Interacción de fosfolípidos-colesterol en interfases aire/agua*. (Tesis). (Maestría). Universidad de Granada, España, 2016, pp. 1-29.
- RAMÍREZ, E.**, *Mecánica de membranas basadas en esfingolípidos*. (Tesis). (Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España, 2014, pp. 24-25.
- REDONDO-MORATA, L., et al.**, "Influence of Cholesterol on the Phase Transition of Lipid Bilayers: A Temperature-Controlled Force Spectroscopy Study". *Langmuir* [en línea], vol. 28, n° 35, (2012), pp. 12851-12860. DOI 10.1021/la302620t. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/la302620t>.
- RODRÍGUEZ, I., et al.**, "MEMBPLUGIN tutorial: A hands-on introduction 1 Summary 2 Conditions for use of the MEMBPLUGIN tools". , (2013).
- ROSE, D., RENDELL, et al.**, "Molecular dynamics simulations of lung surfactant lipid monolayers". *Biophysical Chemistry* [en línea], vol. 138, n° 3, (2008), pp. 67-77. ISSN 03014622. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2008.08.006>.
- SERRANO, M.**, Implementación e integración en GROMACS de un algoritmo eficiente y preciso para imponer ligaduras en simulaciones de dinámica molecular. (Tesis). (Pregrado). Universidad de Zaragoza, España, 2013, pp. 8-9.
- SHINODA, W.; OKAZAKI, S.**, "A Voronoi analysis of lipid area fluctuation in a bilayer". *Journal of Chemical Physics*, vol. 109, n° 4, (1998), pp. 1517-1521. ISSN 00219606.
- SOLOMON, E., et al.**, "Biological Membranes". *Biology* [en línea]. (2007). pp. 106-109. [Consulta: 2 febrero 2018]. Disponible en: [http://profs.hsu.ac.ir/vaezi/files/2012/01/Biological-Texts\\_-Homework\\_-5.pdf](http://profs.hsu.ac.ir/vaezi/files/2012/01/Biological-Texts_-Homework_-5.pdf).

**TOUKMAJI, A.Y.; BOARD, J.A.**, "Ewald summation techniques in perspective: a survey". *Computer Physics Communications* [en línea], vol. 95, n° 2-3, (1996), pp. 73-92. ISSN 00104655. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0010465596000161>.

**TU, K., et al.**, "Constant-pressure molecular dynamics investigation of cholesterol effects in a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer". *Biophysical Journal* [en línea], vol. 75, n° 5, (1998), pp. 2147-2156. ISSN 00063495. DOI 10.1016/S0006-3495(98)77657-X. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77657-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77657-X).

**VESELY, F.**, "*Statistical Thermodynamics*". [en línea]. (2015). [Consulta: 7 enero 2018]. Disponible en: [http://homepage.univie.ac.at/franz.vesely/sp\\_english/sp/node17.html](http://homepage.univie.ac.at/franz.vesely/sp_english/sp/node17.html).

**VOLKENSHTEIN, M.V.**, *Biofísica*. (1985), (Moscú). p.361.

**YANG, Y.**, "Materiales Nanoestructurados Biomédicos". (2014).

## ANEXOS

**Anexo A:** Input step6.0\_minimization.mdp para la minimización de energía.

```
define                = -DREST_ON -DSTEP6_0
integrator            = steep
emtol                 = 1000.0
nsteps                = 5000
nstlist               = 10
cutoff-scheme         = Verlet
rlist                 = 1.2
vdwtype               = Cut-off
vdw-modifier          = Force-switch
rvdw_switch           = 1.0
rvdw                  = 1.2
coulombtype           = pme
rcoulomb              = 1.2
;
constraints           = h-bonds
constraint_algorithm  = LINCS
```

**Anexo B:** Inputs step6. [1-2] \_equilibration.mdp para el equilibrio NVT.

**;**step6.1\_equilibration.mdp****

```
define                = -DREST_ON -DSTEP6_1
integrator            = md
dt                   = 0.001
nsteps               = 25000
nstlog               = 1000
nstxout              = 1000
nstvout              = 1000
nstfout              = 1000
nstcalcenergy        = 100
nstenergy            = 1000
;
cutoff-scheme        = Verlet
nstlist              = 20
rlist                = 1.2
coulombtype          = pme
rcoulomb             = 1.2
vdwtype              = Cut-off
vdw-modifier         = Force-switch
rvdw_switch          = 1.0
rvdw                 = 1.2
;
tcoupl               = V-rescale
tc_grps              = MEMB SOL_ION
tau_t                = 1.0 1.0
ref_t                = 315 315
;
constraints          = h-bonds
constraint_algorithm = LINCS
;
nstcomm              = 100
comm_mode            = linear
comm_grps            = MEMB SOL_ION
;
gen-vel              = yes
gen-temp             = 315
gen-seed             = -1
;
refcoord_scaling     = com
```

**;step6.2\_equilibration.mdp**

```
define                = -DREST_ON -DSTEP6_2
integrator            = md
dt                    = 0.001
nsteps                = 25000
nstlog                = 1000
nstxout                = 1000
nstvout                = 1000
nstfout                = 1000
nstcalcenergy         = 100
nstenergy             = 1000
;
cutoff-scheme         = Verlet
nstlist                = 20
rlist                 = 1.2
coulombtype           = pme
rcoulomb               = 1.2
vdwtype                = Cut-off
vdw-modifier           = Force-switch
rvdw_switch           = 1.0
rvdw                  = 1.2
;
tcoupl                = V-rescale
tc_grps                = MEMB SOL_ION
tau_t                 = 1.0 1.0
ref_t                 = 315 315
;
constraints           = h-bonds
constraint_algorithm   = LINCS
continuation           = yes
;
nstcomm                = 100
comm_mode              = linear
comm_grps              = MEMB SOL_ION
;
refcoord_scaling      = com
```

**Anexo C: Inputs step6. [3-6]\_equilibration.mdp para el equilibrio NPT.**

```
;step6.3_equilibration.mdp
define                = -DREST_ON -DSTEP6_3
integrator            = md
dt                    = 0.001
nsteps                = 25000
nstlog                = 1000
nstxout                = 1000
nstvout                = 1000
nstfout                = 1000
nstcalcenergy         = 100
nstenergy             = 1000
;
cutoff-scheme         = Verlet
nstlist                = 20
rlist                 = 1.2
coulombtype           = pme
rcoulomb               = 1.2
vdwtype                = Cut-off
vdw-modifier           = Force-switch
rvdw_switch           = 1.0
rvdw                   = 1.2
;
tcoupl                = V-rescale
tc_grps                = MEMB    SOL_ION
tau_t                 = 1.0    1.0
ref_t                  = 315    315
;
pcoupl                = Parrinello-Rahman
pcoupltype            = semiisotropic
tau_p                  = 5.0
compressibility         = 4.5e-5
ref_p                   = 1.0    1.0
;
constraints            = h-bonds
constraint_algorithm    = LINCS
continuation           = yes
;
nstcomm                = 100
comm_mode              = linear
comm_grps               = MEMB    SOL_ION
;
refcoord_scaling       = com
```

```

;step6.4_equilibration.mdp
define                = -DREST_ON -DSTEP6_4
integrator            = md
dt                   = 0.002
nsteps               = 50000
nstlog               = 1000
nstxout              = 1000
nstvout              = 1000
nstfout              = 1000
nstcalcenergy        = 100
nstenergy            = 1000
;
cutoff-scheme         = Verlet
nstlist              = 20
rlist                = 1.2
coulombtype          = pme
rcoulomb              = 1.2
vdwtype              = Cut-off
vdw-modifier          = Force-switch
rvdw_switch          = 1.0
rvdw                 = 1.2
;
tcoupl                = V-rescale
tc_grps              = MEMB    SOL_ION
tau_t                = 1.0    1.0
ref_t                 = 315    315
;
pcoupl                = Parrinello-Rahman
pcoupltype           = semiisotropic
tau_p                 = 5.0
compressibility       = 4.5e-5
ref_p                 = 1.0    1.0
;
constraints           = h-bonds
constraint_algorithm  = LINCS
continuation          = yes
;
nstcomm               = 100
comm_mode             = linear
comm_grps             = MEMB    SOL_ION
;
refcoord_scaling      = com

```

```

;step6.5_equilibration.mdp
define                = -DREST_ON -DSTEP6_5
integrator            = md
dt                    = 0.002
nsteps                = 50000
nstlog                = 1000
nstxout                = 1000
nstvout                = 1000
nstfout                = 1000
nstcalcenergy        = 100
nstenergy             = 1000
;
cutoff-scheme         = Verlet
nstlist                = 20
rlist                 = 1.2
coulombtype           = pme
rcoulomb               = 1.2
vdwtype                = Cut-off
vdw-modifier           = Force-switch
rvdw_switch           = 1.0
rvdw                  = 1.2
;
tcoupl                = V-rescale
tc_grps                = MEMB    SOL_ION
tau_t                 = 1.0    1.0
ref_t                  = 315    315
;
pcoupl                = Parrinello-Rahman
pcoupltype            = semiisotropic
tau_p                 = 5.0
compressibility        = 4.5e-5
ref_p                  = 1.0    1.0
;
constraints            = h-bonds
constraint_algorithm   = LINCS
continuation           = yes
;
nstcomm                = 100
comm_mode              = linear
comm_grps              = MEMB    SOL_ION
;
refcoord_scaling       = com

```

```

'
;step6.6_equilibration.mdp
integrator          = md
dt                  = 0.002
nsteps              = 50000
nstlog              = 1000
nstxout             = 1000
nstvout             = 1000
nstfout             = 1000
nstcalcenergy       = 100
nstenergy           = 1000
;
cutoff-scheme       = Verlet
nstlist             = 20
rlist               = 1.2
coulombtype         = pme
rcoulomb            = 1.2
vdwtype             = Cut-off
vdw-modifier        = Force-switch
rvdw_switch         = 1.0
rvdw                = 1.2
;
tcoupl              = V-rescale
tc_grps             = MEMB    SOL_ION
tau_t               = 1.0    1.0
ref_t               = 315    315
;
pcoupl              = Parrinello-Rahman
pcoupltype          = semiisotropic
tau_p               = 5.0
compressibility     = 4.5e-5
ref_p               = 1.0    1.0
;
constraints         = h-bonds
constraint_algorithm = LINCS
continuation        = yes
;
nstcomm             = 100
comm_mode           = linear
comm_grps           = MEMB    SOL_ION
;
refcoord_scaling    = com

```

**Anexo D:** Input step7\_production.mdp para la producción.

```
integrator           = md
dt                  = 0.002
nsteps              = 500000
nstlog              = 1000
nstxout             = 5000
nstvout            = 5000
nstfout            = 5000
nstcalcenergy      = 100
nstenergy          = 1000
;
cutoff-scheme       = Verlet
nstlist            = 20
rlist              = 1.2
coulombtype        = pme
rcoulomb           = 1.2
vdwtype            = Cut-off
vdw-modifier       = Force-switch
rvdw_switch        = 1.0
rvdw               = 1.2
;
tcoupl             = Nose-Hoover
tc_grps            = MEMB SOL_ION
tau_t              = 1.0 1.0
ref_t              = 315 315
;
pcoupl             = Parrinello-Rahman
pcoupltype        = semiisotropic
tau_p              = 5.0
compressibility    = 4.5e-5
ref_p              = 1.0 1.0
;
constraints        = h-bonds
constraint_algorithm = LINCS
continuation       = yes
;
nstcomm            = 100
comm_mode          = linear
comm_grps         = MEMB SOL_ION
;
refcoord_scaling   = com
```

**Anexo E:** Archivos de topología topol.top de los modelos moleculares.

```
;; 80% DPPC - 20% DPPS
;;
;; Generated by CHARMM-GUI (http://www.charmm-gui.org) v1.7
;;
;; psf2itp.py
;;
;; Correspondance:
;; jul316@lehigh.edu or wonpil@lehigh.edu
;;
;; The main GROMACS topology file
;;

; Include forcefield parameters
#include "toppar/charmm36.itp"
#include "toppar/DPPC.itp"
#include "toppar/DPPS.itp"
#include "toppar/SOD.itp"
#include "toppar/TIP3.itp"

[ system ]
; Name
Title

[ molecules ]
; Compound #mols
DPPC                160
DPPS                 40
TIP3                 5000
SOD                  40
```

```
;; 68% DPPC - 17% DPPS - 15% CHL1
;;
;; Generated by CHARMM-GUI (http://www.charmm-gui.org) v1.7
;;
;; psf2itp.py
;;
;; Correspondance:
;; jul316@lehigh.edu or wonpil@lehigh.edu
;;
;; The main GROMACS topology file
;;

; Include forcefield parameters
#include "toppar/charmm36.itp"
#include "toppar/DPPC.itp"
#include "toppar/DPPS.itp"
#include "toppar/CHL1.itp"
#include "toppar/SOD.itp"
#include "toppar/TIP3.itp"

[ system ]
; Name
Title

[ molecules ]
; Compound #mols
DPPC                136
DPPS                 34
CHL1                 30
TIP3                 5000
SOD                  34
```

```
;; 56% DPPC - 14% DPPS - 30% CHL1
;;
;; Generated by CHARMM-GUI (http://www.charmm-gui.org) v1.7
;;
;; psf2itp.py
;;
;; Correspondance:
;; jul316@lehigh.edu or wonpil@lehigh.edu
;;
;; The main GROMACS topology file
;;

; Include forcefield parameters
#include "toppar/charmm36.itp"
#include "toppar/DPPS.itp"
#include "toppar/CHL1.itp"
#include "toppar/DPPC.itp"
#include "toppar/SOD.itp"
#include "toppar/TIP3.itp"

[ system ]
; Name
Title

[ molecules ]
; Compound #mols
DPPS                28
CHL1                 60
DPPC                 112
TIP3                 5000
SOD                  28
```

```
;; 40% DPPC - 10% DPPS - 50% CHL1
;;
;; Generated by CHARMM-GUI (http://www.charmm-gui.org) v1.7
;;
;; psf2itp.py
;;
;; Correspondance:
;; jul316@lehigh.edu or wonpil@lehigh.edu
;;
;; The main GROMACS topology file
;;

; Include forcefield parameters
#include "toppar/charmm36.itp"
#include "toppar/DPPC.itp"
#include "toppar/CHL1.itp"
#include "toppar/DPPS.itp"
#include "toppar/SOD.itp"
#include "toppar/TIP3.itp

[ system ]
; Name
Title

[ molecules ]
; Compound #mols
DPPC                80
CHL1                 100
DPPS                 20
TIP3                 5000
SOD                  20
```

```
;; 24% DPPC - 06% DPPS - 70% CHL1
;;
;; Generated by CHARMM-GUI (http://www.charmm-gui.org) v1.7
;;
;; psf2itp.py
;;
;; Correspondance:
;; jul316@lehigh.edu or wonpil@lehigh.edu
;;
;; The main GROMACS topology file
;;

; Include forcefield parameters
#include "toppar/charmm36.itp"
#include "toppar/DPPC.itp"
#include "toppar/CHL1.itp"
#include "toppar/DPPS.itp"
#include "toppar/SOD.itp"
#include "toppar/TIP3.itp"

[ system ]
; Name
Title

[ molecules ]
; Compound #mols
DPPC                48
CHL1                 140
DPPS                 12
TIP3                 5000
SOD                  12
```