



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

ESTUDIOS COMPUTACIONALES DE LA ACCIÓN DE
DIVERSOS EFECTORES SOBRE LA BICAPA LIPÍDICA DE
MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Alejandro Raúl Verde

Bahía Blanca, Argentina

2022

*Dedico esta tesis a todos los que,
de alguna manera,
participaron en su realización.*

*El mayor enemigo del
conocimiento no es la
ignorancia, es la ilusión del
conocimiento.*

Stephen Hawking

PREFACIO

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar por el grado académico de Doctor en Química de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el área IV (Fisicoquímica), Departamento de Química, dependiente de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y en el Instituto de Química del Sur (INQUISUR), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre abril de 2017 y Diciembre de 2021, bajo la dirección del Dr. Gustavo Adrián Appignanesi, Profesor Titular del Dpto. de Química de la UNS e investigador principal del CONICET y la codirección del Dr. Laureano Martín Alarcón, Asistente de docencia con dedicación exclusiva del Dpto. de Química de la UNS e investigador adjunto del CONICET.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Firma del director

Firma del codirector

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p> <p>La presente tesis ha sido aprobada el/..../..... , mercediendo la calificación de(.....)</p>
---	--

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar gracias a Dios por la oportunidad de poder aprender de una manera muy especial sobre algunos aspectos de la naturaleza, y a través de ella, y todo lo que su estudio implica, conocerme a mi mismo (práctica que trasciende el trabajo de tesis y es para toda la vida).

Quiero hacer extensivo el agradecimiento a mis padres, por haberme dado la vida y todo lo necesario para emprender este camino. A mi esposa Carolina, que cada día con su alegría me ha acompañado y apoyado incondicionalmente en la realización de esta tesis. A mi hermano Marco, por ser mi confidente de toda la vida, y a todas esas personas maravillosas que forman parte de mi día a día. A todos ellos les agradezco su amor.

Agradezco también a mis directores Gustavo y Laureano, por crear con su calidez y humildad un ambiente de trabajo sumamente agradable, donde además del estudio, se priorizan las buenas relaciones interpersonales. Por darme la libertad para estudiar diversos temas, siempre guiándome a buen puerto. A mis compañeros Joan y Cintia por su paciencia y por estar siempre dispuestos a ayudarme, a Sebastián por todas las horas programando juntos, y a Marcela, Viviana y Belén por la buena predisposición de siempre para trabajar y aprender juntos. Gracias a todos ellos ir a trabajar cada día fue una alegría.

Por último, quiero agradecer a la Universidad Nacional del Sur, especialmente al Departamento de Química, y a CONICET por las becas otorgadas para realizar este trabajo de tesis. Pero por sobre todo, les agradezco haber tenido la oportunidad de conocer, en todos estos años de formación académica, a tantas personas que llevare siempre en mi corazón.

RESUMEN

En este trabajo de tesis estudiamos mediante simulaciones de dinámica molecular, la interacción de ciertos efectores de interés sobre membranas lipídicas modelo, concentrándonos principalmente en propiedades dinámicas y estructurales. Luego ampliamos nuestra perspectiva para aprender también sobre el agua de hidratación de dichas membranas.

En una primera instancia, prestamos interés particularmente al efecto de los ácidos grasos Omega-3, motivados principalmente por la enorme cantidad de evidencia sobre los efectos que estas pequeñas moléculas tienen en la prevención del desarrollo temprano de enfermedades como el Alzheimer. Nuestros resultados muestran que la membrana lipídica se torna más fluida en presencia de dichos efectores. Luego extendimos nuestro estudio hacia membranas modelo más “reales”, ya que incluimos el colesterol (una molécula de crucial importancia en las membranas biológicas). En tal contexto determinamos que los efectos producidos por el colesterol pueden ser revertidos por la presencia de ciertos ácidos grasos Omega-3, restaurando la dinámica y la estructura de la membrana lipídica pura. Adicionalmente, analizamos el efecto de ciertas moléculas de gran interés por su potencial terapéutico, como las xantonas, constituidas por una estructura privilegiada de heterociclos tricíclicos fusionados. Nuestros resultados muestran que las xantonas alteran el orden estructural en la membrana induciendo efectos que no muestran una correlación trivial entre la compresibilidad y fluidez de la membrana.

Por su parte, en la búsqueda de profundizar nuestro entendimiento sobre las interacciones ligando-membrana resulta de vital importancia incluir el agua de hidratación, ya que el nuevo paradigma que describe a las membranas biológicas incluye al agua como un elemento constitutivo fundamental de las mismas y no meramente como el medio natural para su autoensamble y para llevar a cabo su función biológica. En tal sentido, estudiamos el modo en que diferentes lípidos en presencia y ausencia de colesterol organizan al agua de hidratación. Podemos decir que la presencia de colesterol en membranas de lípidos (con y sin grupos carbonilos)

modifica la distribución de las moléculas de agua disminuyendo la relajación dipolar de los lípidos de la interfase y generando un aumento en la población no relajable. Asimismo, analizamos los efectos que la incorporación de colesterol produce sobre las membranas modelo, determinando que el mismo produce un aumento en la hidrofobicidad local y, por ende, en la propensión a la deshidratación local. En este contexto, encontramos que el agregado de ácidos grasos Omega-3 también permite revertir parcialmente dicho efecto.

Finalmente, en pos de sentar las bases de una descripción molecular del agua de hidratación de membranas lipídicas, aprovechamos nuestros conocimientos previos en sistemas de agua sobreenfriada y agua vítrea, dado que el agua nanoconfinada (como es el caso del agua de hidratación de membranas) exhibe ciertas reminiscencias vítreas. Sin embargo, para poder estudiar el agua de hidratación, particularmente su estructura, es necesario contar con un índice de estructura que resulte apropiado en dicho contexto ya que los índices actuales no resultan aplicables. Por lo tanto, en una primera instancia mostramos algunas de las limitaciones de los índices desarrollados hasta la fecha, de modo de evidenciar los ingredientes esenciales a tener en cuenta. Ello nos llevó al desarrollo de un nuevo índice de estructura, libre de preconceptos estructurales y basado en consideraciones energéticas, que no sólo corrige los errores en que incurrían los indicadores previos sino que es factible de adecuar a contextos de nanoconfinamiento. A pesar de que recorrimos un largo camino para llegar a este índice, en esta tesis lo aplicamos sólo de manera preliminar en el contexto de la hidratación de membranas lipídicas, ya que su adaptación específica a este campo constituye una tarea más ambiciosa que requerirá y propiciará estudios futuros.

ABSTRACT

In this thesis work we study, by means of molecular dynamics simulations, the interaction of certain effectors of interest with model lipid membranes, making focus mainly on dynamic and structural properties. Then we extend our perspective to also learn on the behavior of the hydration water of such membranes.

At first, we were particularly interested in the study of Omega-3 fatty acids, mostly motivated by the enormous amount of evidence on the effect of these small molecules preventing the early development of disorders such as Alzheimer's disease. Our results make evident the fact that these effectors enhance membrane fluidity. We then extended our study to more "real" model membranes by including cholesterol (a crucially important molecule in biological membranes). In this context, we determine that the effects produced by cholesterol can be reversed by the presence of certain Omega-3 fatty acids, restoring the dynamics and structure of the pure lipid membrane. Additionally, we analyze the effect of certain molecules of great interest due to their therapeutic potential, such as xanthenes, constituted by a privileged structure of fused tricyclic heterocycles. Our results show that xanthenes alter membrane structural order inducing effects that do not follow a trivial correlation between membrane compressibility and fluidity.

In turn, in order to deepen our understanding of ligand-membrane interactions, it is vitally important to include hydration water, since the new paradigm that describes biological membranes includes water as a fundamental constituent element instead of merely considering it as the natural environment for its self-assembly and for carrying out its biological function. In this sense, we study the way in which different lipids, in the presence and absence of cholesterol, organize hydration water. Our results reveal the fact that the presence of cholesterol in lipid membranes (with and without carbonyl groups) modifies the distribution of hydration water, decreasing the dipolar relaxation of the lipid interface and generating an increase in the non-relaxable population. Likewise, we analyze the effects that the incorporation of cholesterol

produces on model membranes, determining the occurrence of an increase in local hydrophobicity and, therefore, in the propensity for local dehydration. However, we find that the addition of Omega-3 fatty acids also allows to partially reverse such effect.

Finally, in order to lay the foundations for a molecular description of lipid membrane hydration water, we take advantage of our previous knowledge in supercooled and glassy water, since nanoconfined water (as is the case of membrane hydration water) exhibits certain vitreous reminiscences. However, in order to study lipid hydration water, particularly its structure, it is necessary to have a structure index appropriate for this context, since the current indexes are not applicable. Therefore, as a first step we evidence some of the limitations of the indexes developed to date, in order to highlight the essential ingredients to take into account. This leads us to the development of a new structure index, free from structural preconceptions and based on energy considerations, that not only corrects the errors in which previous indicators incurred, but which is also feasible to adapt to nanoconfinement contexts. Although we came a long way to arrive at this index, in this thesis we apply it only preliminarily in the context of lipid membrane hydration, since its specific adaptation to this field constitutes a more ambitious task that will require and favor future studies.

PUBLICACIONES SUSCITADAS POR LA TESIS:

El presente trabajo de tesis dió lugar a los siguientes trabajos de investigación en revistas profesionales de circulación internacional:

1. *“Structural aspects of an energy-based water classification index and the structure-dynamics link in glassy relaxation.”*
A. R. Verde, J. M. Montes de Oca, S. R. Accordino, L. M. Alarcón, G. A. Appignanesi.
Eur. Phys. J. E 44:47 (2021).
2. *“A certain proportion of docosahexaenoic acid tends to revert structural and dynamical effects of cholesterol on lipid membranes.”*
V. I. Pedroni, M. B. Sierra, L. M. Alarcón, A. R. Verde, G. A. Appignanesi, M. A. Morini.
Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes 1863, 183584 (2021).
3. *“Effect of cholesterol on the hydration properties of ester and ether lipid membrane interphases.”*
H. A. Pérez, L. M. Alarcón, A. R. Verde, G. A. Appignanesi, R. E. Giménez, E. A. Disalvo, M. A. Frías.
Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes 1863, 183489 (2021) .
4. *“Interaction of hydroxy-xanthenes with phosphatidylcholines: The effector decreases compressibility and increases the fluidity of membranes.”*
M. A. Morini, V. I. Pedroni, L. M. Alarcón, A. R. Verde, P. Mendioroz, G. A. Appignanesi, M. B. Sierra.
Chemistry and Physics of Lipids 231, 104938 (2020).
5. *“Comparing the performance of two structural indicators for different water models while seeking for connections between structure and dynamics in the glassy regime.”*

- A. R. Verde, J. M. Montes de Oca, S. R. Accordino, L. M. Alarcón, G. A. Appignanesi.
J. Chem. Phys. 150, 244504 (2019).
6. *“Structural features of high-local-density water molecules: Insights from structure indicators based on the translational order between the first two molecular shells.”*
J. M. Montes de Oca, S. R. Accordino, A. R. Verde, L. M. Alarcón, G. A. Appignanesi.
Physical Review E 99, 062601 (2019).
7. *“Experimental and computational studies of the effects of free DHA on a model phosphatidylcholine membrane.”*
A. R. Verde, M. B. Sierra, L. M. Alarcón, V. I. Pedroni, G. A. Appignanesi, M. A. Morini.
Chemistry and Physics of Lipids 21, 12 (2018).
8. *“Influence of docosahexaenoic acid on the hydration properties of cholesterol-containing lipid membranes.”*
A. R. Verde, L. M. Alarcón, C. A. Menéndez, S. R. Accordino, G. A. Appignanesi.
Enviado para su publicación.

Índice general

1. Introducción, objetivos y metodología	19
1.1. La membrana lipídica y su interacción con efectores	19
1.1.1. La bicapa lipídica	19
1.1.2. Efectores de interés para esta tesis	22
1.2. Agua de hidratación de membranas	28
1.2.1. Agua pura o bulk	28
1.2.2. Agua de hidratación de membranas lipídicas modelo	35
1.3. Metodología	38
2. Interacción de membranas lipídicas con efectores de interés como ácidos grasos Omega-3 y xantonas	45
2.1. Ácidos grasos Omega-3	46
2.2. Ácidos grasos Omega-3 y colesterol	56
2.3. Estructuras moleculares privilegiadas: heterociclos tricíclicos fusionados (xantonas)	67
3. Agua de hidratación de membranas lipídicas modelo	85
3.1. Estudios de casos específicos de hidratación de membranas	86
3.1.1. Estudio del efecto de la naturaleza de los lípidos sobre el agua de hidratación de membranas que contienen colesterol	86
3.1.2. Estudio de la influencia del colesterol y del DHA en el agua de hidratación de membranas lipídicas modelo	99

3.2. Hacia una caracterización más completa del agua de hidratación de membranas	105
3.2.1. Aspectos estructurales de moléculas de agua de alta densidad local	105
3.2.2. Índices de estructura para diferentes modelos de agua y conexión entre estructura-dinámica	114
3.2.3. Desarrollo de un nuevo índice de estructura para agua basado en consideraciones energéticas. Aspectos estructurales y el vínculo estructura- dinámica en la relajación vítrea del agua	117
3.2.4. Aplicaciones preliminares del nuevo índice en membranas lipídicas	124
4. Conclusiones	129

Capítulo 1

Introducción, objetivos y metodología

1.1. La membrana lipídica y su interacción con efectores

1.1.1. La bicapa lipídica

En la vida de todo organismo vivo las membranas celulares son un componente fundamental, no sólo por su función estructural sino también por su rol en la interacción entre células, el intercambio de información y los procesos de transporte [1, 2]. Estas membranas están constituidas en su mayor parte por lípidos y más específicamente hablando por fosfolípidos, los cuales forman una bicapa compuesta por dos regiones hidrofílicas y una región central hidrofóbica. En 1972 Singer y Nicholson [3] propusieron el modelo de mosaico fluido [Figura 1.1](#), el cual establece que los fosfolípidos se encuentran ordenados en forma de bicapa y sobre ella se encuentran insertadas los demás componentes de la membrana como los glucolípidos, los esteroides y proteínas entre otros.

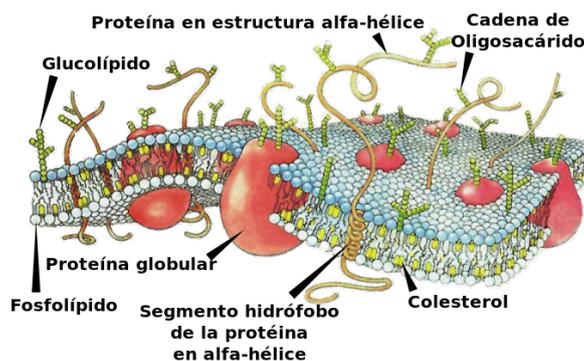


Figura 1.1: Modelo del mosaico fluido propuesto en 1972 por Singer y Nicholson.

Los lípidos que conforman las bicapas lipídicas son tensoactivos con una o varias cadenas hidrocarbonadas que presentan uno o varios grupos polares iónicos en un extremo de la molécula. Los lípidos no sólo cumplen una función estructural sino que actúan, entre otras cosas, como moléculas de señalización y almacenamiento de energía [4]. Al ser moléculas anfifílicas, los lípidos pueden clasificarse según su cabeza polar como aniónicos (cabeza polar negativa) o catiónicos (cabeza polar positiva), zwitterionicos (del alemán *Zwitter*, que significa híbrido) y no iónicos (cabeza polar sin carga). La cabeza polar del fosfolípido le otorga el valor de carga al agregado formado [5]. En la [Figura 1.2](#) podemos observar dos de los fosfolípidos que utilizaremos en este trabajo de tesis: el dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y el dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). Ambos comparten la misma cabeza polar, la fosfatidilcolina (PC) pero tienen diferentes colas hidrocarbonadas las cuales difieren en su longitud.

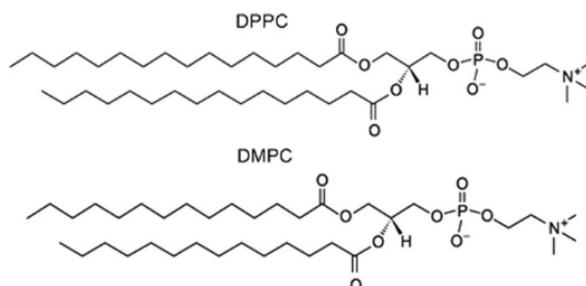


Figura 1.2: Moléculas de DPPC y DMPC

La flexibilidad de la membrana está marcada por la longitud y el grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada del fosfolípido [6, 7], por lo que cadenas más largas dan como

resultado una mayor rigidez la cual disminuye al aumentar el número de insaturaciones [8, 9]. Los lípidos presentan diferentes fases lipídicas [10] dependiendo de la estructura del lípido, el tipo de disolvente y la temperatura de trabajo [11, 12, 13, 14], de forma tal que a baja temperatura los lípidos se encuentran, en el agua, en la fase sólido cristalina (o fase gel) y a altas temperaturas en la fase líquido cristalina (o fase líquida). La temperatura de transición (T_m) es la temperatura a la cual el sistema pasa de una fase a otra y es característica de cada lípido ya que depende de varios factores como el tamaño de la/s cadena/s, el número de insaturación y de las características de la cabeza polar. Cuanto mayor es la longitud de la cadena, mayor es la energía necesaria para realizar el cambio de fase y la temperatura de transición es mayor [15]. A su vez, la presencia de dobles enlaces dificulta el empaquetamiento de la bicapa por lo que la temperatura de transición disminuye como podemos observar de manera ilustrativa en la [Figura 1.3](#).

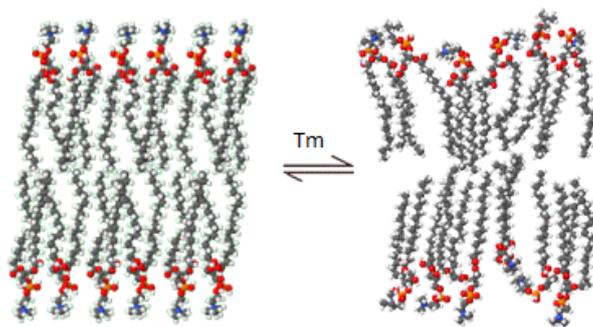


Figura 1.3: Transición de una bicapa lipídica desde una fase sólido cristalina (izquierda) a una fase líquido cristalina (derecha).

Como indicamos anteriormente, las membranas biológicas son sistemas de una gran complejidad que se forman en base a bicapas lipídicas de constitución mixta y diversas macromoléculas que se insertan en la misma. El primer paso para modelarlas y comprender algunos de sus comportamientos consiste en estudiar bicapas modelo de fosfolípidos simples, ya que modelos de mayor complejidad (y algo más cercanos al sistema real) implican el empleo de bicapas compuestas por mezclas de distintos fosfolípidos y el agregado de otros constituyentes naturales como el colesterol. La ventaja del uso de sistemas modelo, más allá de cuestiones técnicas vinculadas a las simulaciones, es que el manejo de una limitada cantidad de parámetros

permite un mayor control sobre el efecto que cada uno ejerce sobre las propiedades de la membrana. Al trabajar con sistemas modelo (menos realistas) es importante disponer también de experimentos sobre sistemas modelo equivalentes, tal como será el caso de esta tesis.

1.1.2. Efectores de interés para esta tesis

Además de los componentes principales presentes en las membranas lipídicas, algunas membranas celulares, principalmente en las células cerebrales, contienen ácidos grasos Omega-3 que juegan un rol muy importante en la fluidez, estructura, tipo de fase lipídica y permeabilidad de la membrana [16, 17, 18]. El ácido docosahexanoico (DHA) es uno de los ácidos grasos de tipo Omega-3 más comunes con 22 átomos de carbono y 6 dobles enlaces, siendo el primero en el carbono 3 lo que le da su nomenclatura 22:6, n-3. La principal fuente exógena de DHA se obtiene a través de los aceites de pescado comercialmente disponibles, aunque en general contienen mayores cantidades de ácido eicosapentaenoico (EPA) que de DHA [19]. Se ha sintetizado a través de procesos de fermentación controlada usando dos microalgas, *Cryptocodinium cohnii* y otra especie del género *Schizochytrium*, lo que ha permitido agregarlo en formulas lácteas, así como otros alimentos de consumo habitual [20]. El DHA que no es consumido en la dieta se sintetiza a través de la conversión de EPA a ácido docosapentaenoico (DPA) y a su vez convertido a DHA. También puede obtenerse cantidades significativas de ácido α -linoleico a través de alimentos de origen vegetal (como nueces, semillas chía y porotos de soja, entre otros), el cual posee la nomenclatura 18:3, n-3 y a partir de él los seres humanos podemos sintetizar DHA y EPA [21]. El DHA constituye alrededor de 40% de los ácidos grasos poliinsaturados contenidos en el cerebro y 60% en la retina. Los ácidos grasos funcionan tanto como sustratos de energía como componentes integrales de la membrana celular. La incorporación de ácidos grasos poliinsaturados disminuye la fracción de colesterol total, lo que lleva a un incremento en la afinidad de receptores y la mejoría de los procesos de las distintas funciones cerebrales superiores. La concentración de DHA cerebral parece ser más dependiente del obtenido por vía plasmática respecto de la capacidad celular para sintetizarlo [19].

Los ácidos grasos Omega-3 como el DHA (Figura 1.4) se han popularizado debido a su importante papel en la salud humana y en el desarrollo [22]. Hay evidencia de la utilización de DHA en la prevención de cáncer de colon [23] y enfermedad de Alzheimer [24]. Los ácidos grasos libres tienen efectos marcados tanto en las membranas modelos [25, 26, 27, 28, 29] como en las membranas biológicas [30, 31, 32] y también aparecen como un constituyente menor en la membrana plasmática [33]. El DHA en las células cerebrales se encuentra principalmente esterificado [34], siendo transportado desde el hígado a través de la sangre por medio de lipoproteínas, pero también se encuentra como ácido graso libre [35, 36]. Como el DHA libre no necesita la presencia de una proteína transportadora que penetre las membranas celulares cerebrales, este modo representa una vía muy apropiada para su incorporación [35, 37, 38, 39, 40]. Muchas investigaciones han encontrado que individuos con enfermedad de Alzheimer (EA) y Parkinson contenían menores concentraciones de DHA [41, 42]. La falta de DHA durante el desarrollo infantil lleva a una disminución de las funciones mentales y agudeza visual [43, 44]. Además, los niveles alterados de ácidos grasos libres han sido asociados con enfermedades como la obesidad, hipertensión, diabetes, enfermedades coronarias, alcoholismo, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis y cáncer [45].

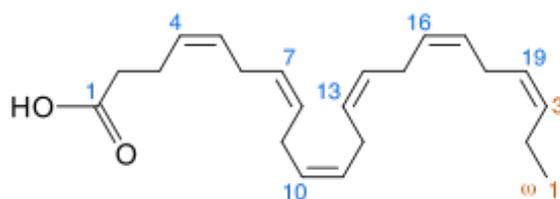


Figura 1.4: Molécula de DHA.

Los ácidos grasos ejercen efectos estructurales en las membranas lipídicas, tanto cuando se encuentran libres como cuando se encuentran enlazados a moléculas como fosfolípidos y triglicéridos. La rápida inserción de los ácidos grasos libres en las membranas y su incorporación en moléculas más complejas da como resultado cambios estructurales en las bicapas lipídicas. Desde los años 70, los efectos de los ácidos grasos sobre las membranas modelos han sido estudiados utilizando una amplia variedad de técnicas, incluidas calorimetría diferencial de

barrido (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) [46, 47, 48, 49], espectroscopía de fluorescencia [50, 51, 52], resonancia de espín electrónico [53, 54], dispersión de luz [55], electroforesis [56], resonancia magnética nuclear (RMN) [57], densitometría [58] y análisis térmico diferencial [59]. Estos estudios han demostrado que los ácidos grasos saturados de cadena larga aumentan la T_m de la fase gel a fase fluida de los fosfolípidos de la membrana, mientras que los ácidos grasos de cadena corta o cis-insaturados disminuyen la T_m . Por lo tanto, queda a la vista que tanto el largo como el grado de insaturación de los ácidos grasos libres tiene un impacto en la estructura de la membrana [60]. Estas perturbaciones inducidas por los ácidos grasos sobre la estructura de las membranas lipídicas involucran cambios en la fluidez de la membrana, en el cambio de fase, permeabilidad, fusión de membranas, presión lateral y en la dinámica *flip-flop*. El agregado de ácidos grasos insaturados a liposomas formados a partir de DPPC también ha sido estudiado, particularmente el DHA y el EPA quienes producen un ensanchamiento y un cambio en los valores de T_m a bajas temperaturas [61]. Esta información sugiere que el empaquetamiento de la bicapa de DPPC se vuelve más desordenada y fluida cuando contiene DHA y EPA [62], siendo la fluidez una pieza fundamental en las funciones celulares ya que la actividad de las proteínas de membrana es modulada por su entorno lipídico. Además, los lípidos influyen en la configuración para la actividad catalítica de las proteínas ya que modifican las propiedades biofísicas de la membrana [63]. Simulaciones de dinámica molecular confirman el efecto del ácido 2-hidroxioléico (2-OHOA) en los parámetros estructurales de membranas de dielaidoilfosfatidiletanolamina (DEPE) [64]. Trabajos realizados por Ehringer et al [65] y Onuki et al [62] reportaron un aumento en la fluidez de membrana luego de la incorporación de DHA. De la misma forma, Mason et al [66] usaron difracción de rayos X de bajo ángulo para evaluar los efectos de los ácidos grasos DHA y EPA en la estructura de membranas lipídicas de palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC) con colesterol. Fodor et al. [58] mostraron con estudios de fluorescencia con pireno como molécula de prueba, así como con DSC, que los ácidos grasos inducen una variedad de cambios en las propiedades de las membranas fosfolipídicas dependiendo de la naturaleza química del ácido graso [50].

En base a todo lo anterior surge como primer objetivo de este trabajo de tesis estudiar el efecto de la presencia de DHA sobre membranas modelos de DPPC a través de experimentos realizados por la sub-línea experimental de nuestro grupo de investigación. Posteriormente, expondremos las simulaciones computacionales correspondientes que llevamos a cabo, cuyos resultados serán contrastados con dichos experimentos y nos permitirán dilucidar los aspectos microscópicos de los efectos observados. Dado que las membranas biológicas son estructuras sumamente complejas, resulta interesante estudiar los efectos de los ácidos grasos sobre modelos simplificados de biomembranas a un nivel molecular. Por este motivo utilizamos liposomas de DPPC, uno de los fosfolípidos utilizado en modelos de membranas lipídicas.

En la [Figura 1.5](#) podemos observar la molécula de colesterol (Chol) que si bien muchas veces es considerada como un efector de membrana, lo consideraremos un componente mayoritario (no sólo por el alto contenido en las membranas celulares cerebrales) ya que juega un papel muy importante en las membranas biológicas como ya se ha reportado en los últimas décadas tanto en estudios experimentales como computacionales [[67](#), [68](#), [69](#), [70](#), [71](#), [72](#)]. Además, el ensamblado de dominios de colesterol y su composición dependen del tipo de célula y puede verse afectado por la presencia de ácidos grasos involucrados en la dieta [[67](#), [68](#)]. Ciertos estudios muestran que el colesterol, cuando esta presente en concentraciones elevadas, puede autoensamblarse y formar dominios inmiscibles en las membranas plasmáticas, un fenómeno que participa tanto de los procesos celulares patológicos como fisiológicos [[69](#)] como en la enfermedad de Alzheimer [[70](#), [71](#), [72](#)].

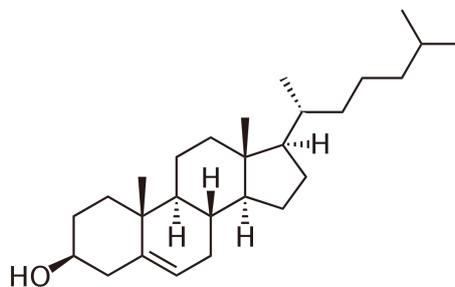


Figura 1.5: Molécula de colesterol.

Tanto el colesterol como el DHA tienen efectos claramente diferentes sobre las propiedades mecánicas y dinámicas de las membranas lipídicas. Un claro ejemplo lo podemos observar en la fluidez de la membrana, una propiedad importante [73], cuyo valor es significativamente reducido al agregar colesterol, mientras que el DHA produce el efecto contrario (como veremos más adelante). Por lo tanto, el siguiente objetivo de este trabajo tesis es dar un paso hacia adelante en lo que a complejidad respecta, estudiando ahora un modelo ternario de membrana con DPPC-Chol-DHA para observar los efectos de estos dos efectores juntos en membranas lipídicas y buscar si en alguna proporción el DHA podría revertir los efectos estructurales y dinámicos causados por el colesterol.

Otro efector de gran interés en esta tesis debido a su gran potencial terapéutico son las familias de las xantonas, moléculas disponibles en la naturaleza como producto natural, por ejemplo, en el pericarpio de la fruta tropical mangostán o diseñadas por síntesis orgánica [74, 75, 76, 77, 78, 79, 80]. Estas moléculas poseen una estructura plana privilegiada con tres heterociclos fusionados [81] que han atraído a la comunidad científica por sus propiedades antifúngicas, antibacterianas, antimalarias, antiaterogénicas, anticancerígenas y por su rol como neuroprotector en la enfermedad de Alzheimer [74, 75, 76, 77, 78, 79, 80]. Dicho esqueleto puede ser funcionalizado de diferente manera para adquirir diversas propiedades.



Figura 1.6: Estructuras de xantonas hidroxiladas. 1-Hidroxixantona (XA₁) a la izquierda y 1,3,6-Trihidroxixantona (XA_{1,3,6}) a la derecha.

Dado que las xantonas son altamente seguras y farmacológicamente relevantes, y que además tienen propiedades similares a otras drogas en cuanto a la penetración de la membrana celular o la interacción con la misma, han sido señaladas como agentes terapéuticos prometedores [74, 75, 76, 77, 78, 79, 80], por lo que resulta relevante estudiar la interacción de los componentes

derivados del mangostán, en particular las hidroxixantonas (Figura 1.6), con membranas modelo de DPPC. En un trabajo previo de nuestro grupo [82] estudiamos la interacción de xantonas con DPPC utilizando técnicas experimentales (particularmente medidas de conductividad, potencial zeta y DSC) y simulaciones de dinámica molecular. Las xantonas estudiadas aumentaron la fluidez de la membrana, por lo que es esperable que las hidroxixantonas puedan también alterar tanto las propiedades dinámicas como mecánicas de la membrana. Rybar et al. [83] indicaron que la velocimetría de ultrasonido y la densimetría aportan más información física detallada sobre las vesículas en comparación con métodos tradicionales como DSC, mientras que también aportan evidencia sobre la compresibilidad de la membrana. Otro beneficio de la velocimetría de ultrasonido (comparado con los llamados métodos microscópicos como ESR, RMN o espectroscopía de fluorescencia) consiste en el hecho de que la compresibilidad representa una variable macroscópica derivada de propiedades físicas de la membrana considerada como un todo, por lo que propiedades mecánicas permiten una apreciación en los cambios de las propiedades físicas en regiones grandes de la membrana siendo ésta menos afectada por perturbaciones locales [84].

Motivados por el contexto arriba señalado, más adelante estudiaremos propiedades termodinámicas y mecánicas de membranas de DPPC y DMPC con hidroxixantonas evaluadas tanto de forma experimental como computacional. Aquí el objetivo es contrastar las medidas de compresibilidad y de fluidez para poder responder a la siguiente pregunta: ¿Los cambios en el orden estructural, se correlacionan de una manera directa con la compresibilidad y fluidez? Usualmente el concepto que se tiene de los efectores sobre la membrana es que al intercalarse entre las cadenas lipídicas producen un desorden estructural que disminuye la fluidez y baja la temperatura de transición. Esto se debe a que debilita las interacciones laterales entre las colas hidrocarbonadas de los lípidos y a su vez este desorden incrementa la compresibilidad. En el caso de efectores con una geometría e hidrofobicidad peculiar como las xantonas estudiadas en este trabajo, presumimos que el comportamiento puede ser superior al esperado en dicho escenario.

1.2. Agua de hidratación de membranas

1.2.1. Agua pura o bulk

El agua (quizás el líquido más familiar para la especie humana) no sólo es un sistema de enorme relevancia intrínseca, sino que resulta indispensable para la estructuración, dinámica y función de sistemas biológicos (como las membranas lipídicas, las proteínas, etc.) y de varios sistemas de ciencia de materiales. Como muestra de la relevancia del problema podemos ver el siguiente par de *reviews* sobre agua nanoconfinada [85] y agua sobreenfriada [86]. En particular, los paradigmas modernos establecen que el agua de hidratación resulta una parte constitutiva de las membranas biológicas, de modo que una plena comprensión de la estructura y función de las mismas requiere de un entendimiento del comportamiento del agua biológica. Es por ello, que una parte de esta tesis se centra en esta cuestión.

A pesar de la aparente simpleza de su fórmula química, el agua presenta una enorme cantidad de anomalías termodinámicas y dinámicas: por ejemplo, presencia de un máximo en la densidad en función de la temperatura, comportamiento no-monótono de los órdenes traslacional y rotacional, incremento de la capacidad calorífica isobárica, incremento de la compresibilidad isotérmica y disminución del coeficiente de dilatación térmica a baja temperatura, máximo en el coeficiente de difusión traslacional, *crossover* dinámico a bajas temperaturas, etc. Por lo tanto el modelado teórico del agua reviste la difícil tarea de reproducir estas anomalías. Hasta la fecha, no existe un modelo tan complejo que reproduzca todas las particularidades del agua (o por lo menos no es viable computacionalmente). Por esta razón surgen distintos modelos de agua, cada uno de ellos con algunos aciertos y algunas falencias en intentar reproducir las propiedades de esta sustancia tan particular ([87], pag. 54). A lo largo de este trabajo de tesis utilizaremos los modelos clásicos de agua explícita SPC/E [88], TIP3P [89] y TIP5P [89]. Los tres modelos son rígidos, es decir que cada molécula de agua es tratada como un set rígido de masas puntuales. Los modelos SPC/E y TIP3P poseen tres puntos de interacción correspondientes a los tres átomos de cada molécula de agua, por lo que se conocen como modelos de tres sitios (Figura 1.7). Cada sitio posee una carga puntual, y el sitio correspondiente al átomo de oxígeno posee también los

correspondientes parámetros de Lennard-Jones. Dado que los modelos de tres sitios logran una gran eficiencia computacional, son usados ampliamente en simulaciones de dinámica molecular. Por otro lado el modelo TIP5P posee cinco puntos de interacción (Figura 1.8). Los dos puntos de interacción adicionales corresponden a los dos pares de electrones libres del átomo de oxígeno, los cuales se modelan como dos átomos ficticios con carga negativa enlazados al átomo de oxígeno con una geometría tetraédrica. El modelo TIP5P posee mejoras en la geometría de dímeros de agua, una estructura más tetraédrica que reproduce mejor las funciones de distribución radial, experimentales, de difracción de neutrones, como así también logra reproducir mejor la temperatura de máxima densidad del agua.

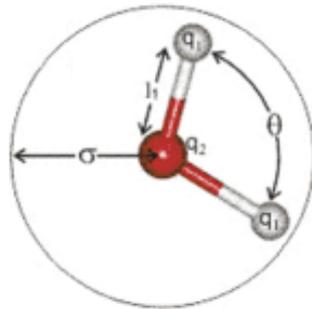


Figura 1.7: Diagrama de la geometría de los modelos de tres sitios SPC/E y TIP3P, los valores de los parámetros q_1 , q_2 , θ , l_1 y σ están detallados para cada modelo en la Tabla 1.1. Adaptado de [90].

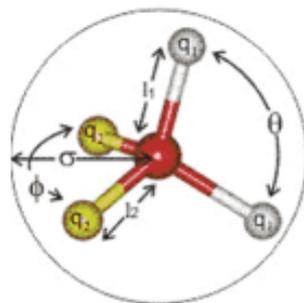


Figura 1.8: Diagrama de la geometría del modelo de cinco sitios TIP5P, los valores de los parámetros q_1 , q_2 , θ , l_1, l_2 , σ y ϕ están detallados para cada modelo en la Tabla 1.2. Adaptado de [90].

Tabla 1.1: Parámetros de los modelos de tres sitios SPC/E y TIP3P, el detalle de la geometría del modelo y de los parámetros enumerados en esta tabla los podemos observar en la [Figura 1.7](#). Los parámetros σ y ϵ son los correspondientes al potencial de Lennard-Jones para la interacción entre los átomos de oxígeno de las moléculas de agua. La cargas eléctricas parciales, q_1 y q_2 , coinciden con los centros de los átomos correspondientes ([Figura 1.7](#)). La magnitud de estas cargas es q_1 veces la carga elemental (la carga eléctrica del electrón) para cada uno de los átomos de hidrógeno, mientras que para cada uno de los átomos de oxígeno la carga es -2 veces la carga parcial de un hidrógeno, $q_2 = -2q_1$. Adaptado de [90].

Modelo	σ [Å]	ϵ [Å]	l_1 [Å]	q_1	q_2	θ
SPC/E	3.166	0.650	1.000	0.4238	-0,8476	109.47 °
TIP3P	3.15061	0.6364	0.9572	0.4170	-0,8340	104.52 °

Tabla 1.2: Parámetros del modelo de cinco sitios TIP5P, el detalle de la geometría del modelo y de los parámetros enumerados en esta tabla los podemos observar en la [Figura 1.8](#). Los parámetros σ y ϵ son los correspondientes al potencial de Lennard-Jones para la interacción entre los átomos de oxígeno de las moléculas de agua. La cargas eléctricas parciales, q_1 y q_2 , coinciden con los centros de los átomos correspondientes ([Figura 1.8](#)). La magnitud de estas cargas es q_1 veces la carga elemental (la carga eléctrica del electrón) para cada uno de los átomos de hidrógeno. En este caso la carga parcial negativa no se encuentra sobre el átomo de oxígeno sino que se encuentra equitativamente distribuida en los dos átomos ficticios enlazados al átomo de oxígeno central. Estos últimos poseen la carga parcial $q_2 = -q_1$. Adaptado de [90].

Modelo	σ [Å]	ϵ [Å]	l_1 [Å]	l_2 [Å]	q_1	q_2	θ	ϕ
TIP5P	3.12	0.6694	0.9572	0.7	0.241	-0,241	104.52 °	109.47 °

En contextos biológicos (donde se la considera como la “matriz de la vida”), el agua resulta esencial e irremplazable por otros líquidos “normales” precisamente por presentar características distintivas o anómalas. Estas anomalías resultan más evidentes a medida que baja la temperatura y, en particular, al adentrarse en el régimen sobreenfriado (es decir, cuando al agua líquida se la enfría por debajo de su temperatura de fusión evitando su cristalización). Es por ello que, más allá de la relevancia propia del estado metaestable, resulta muy importante estudiar el agua en dicho régimen por este motivo. Ello se debe a que las fluctuaciones moleculares en la densidad y en las distintas magnitudes termodinámicas (que determinan, por ejemplo, la capacidad calorífica, dada por las fluctuaciones $\langle \Delta S^2 \rangle$ o $\langle \Delta H^2 \rangle$, el coeficiente de dilatación térmica, $\langle \Delta V \Delta S \rangle$, o la compresibilidad, $\langle \Delta V^2 \rangle$) crecen con el sobreenfriamiento y divergen a medida que nos aproximamos al segundo punto crítico líquido-líquido que presenta el agua en dicha región. Dicha hipótesis de un segundo punto crítico, es decir, de la existencia de dos formas líquidas del agua, fue propuesta hace casi 30 años por un colaborador de nuestro grupo en la Universidad de Roma, el Prof. Francesco Sciortino (con el Prof. Gene Stanley de Boston University) en un trabajo fundacional [91]. Dado que el agua en el estado vítreo (sólido amorfo) presenta dos fases que coexisten [92, 93] (hielo amorfo de alta densidad, HDA, y hielo amorfo de baja densidad, LDA), esta descripción plantea que la línea de coexistencia se extiende a la región líquida (línea de Widom) culminando en un punto crítico. De tal modo, existe una competencia entre dos formas de agua líquida o estructuras locales preferenciales, de alta y baja densidad local (HDL y LDL) de modo que se habla de manera genérica de tipos de arreglos estructurales preferenciales locales o dos “clases” de moléculas de agua. El principal inconveniente en este contexto ha sido la imposibilidad de acceder experimentalmente a la región del punto crítico, pues si bien los experimentos llegan a vislumbrar la inminencia de la presencia de una transición de fase (con enormes fluctuaciones en la densidad a nivel molecular reflejo de la competencia entre dos estados líquidos), no ha resultado posible alcanzar el grado de sobreenfriamiento necesario debido a la inevitable interferencia de la cristalización por nucleación homogénea. Por lo tanto, esta “tierra de nadie” (*no man’s land*) sólo ha admitido el escrutinio por

medio de simulaciones computacionales. En tal sentido, y más allá de que el trabajo de diversos grupos ha permitido acumular una gran cantidad de evidencias a su favor a lo largo del tiempo, sólo muy recientemente (en 2020) el Prof. Francesco Sciortino ha logrado finalmente obtener la comprobación definitiva de su teoría [94] a partir de simulaciones computacionales de gran escala y largo aliento, trabajando en conjunto con el Prof. Pablo Debenedetti de Princeton University, con quien también colaboramos en nuestro grupo. Por lo tanto, dichas simulaciones muestran que (tanto por encima de la temperatura de fusión como en el régimen sobreenfriado) efectivamente existe una mezcla de dos tipos de “clases” de moléculas de agua: moléculas de baja densidad local (LDL, bien estructuradas y menos móviles) y moléculas de alta densidad local (HDL o desestructuradas y de mayor movilidad). Los defectos de estructuración locales determinados por la presencia de moléculas HDL resultan además fundamentales en la reestructuración de la red de puentes de hidrógeno (*Hydrogen Bonds*, HBs) del agua y, por ende, de su dinámica.

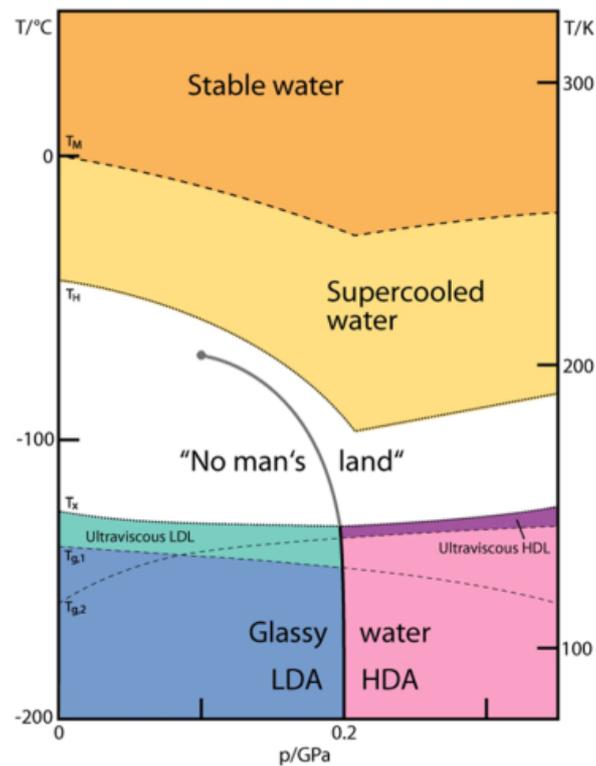


Figura 1.9: Diagrama de fases de agua no cristalina (tomado de [95]). La “tierra de nadie” (*no man's land*) indica la región en la cual solo el hielo cristalino ha sido observado. Se encuentra encerrado por las líneas de cristalización homogénea T_H por arriba y por la línea de cristalización T_X por debajo. Los dos dominios de líquido ultraviscoso, baja y alta densidad (LDL y HDL), se encuentran justo por debajo de T_X . Las dos temperaturas de transición vítrea $T_{g,1}$ y $T_{g,2}$ que separan los sólidos LDA y HDA de los líquidos ultraviscosos LDL y HDL son adaptados de [96] y [97] respectivamente. Es importante notar la extensión metaestable de $T_{g,1}$ en la región estable de HDA y de $T_{g,2}$ en la región estable de LDA/LDL. La primera línea de transición de fase líquido-líquido (*liquid-liquid phase transition*, LLPT) termina en el punto crítico líquido-líquido (*liquid-liquid critical point*, LLCP).

En virtud de la descripción anterior, a lo largo del tiempo se han desarrollado varios índices para identificar las dos “clases” de moléculas de agua. Uno de dichos indicadores es el índice de estructura local (*Local Structure Index*, LSI) [98, 99] combinado con minimizaciones de energía potencial o estructuras inherentes (IS) ([100, 101]), estrategia propuesta hace un tiempo por nuestro grupo de investigación en colaboración con el Prof. Francesco Sciortino

y que ha sido utilizada por varios grupos internacionales. Finalmente, como veremos más adelante, dentro del marco de este trabajo de tesis hemos desarrollado un nuevo índice que, al partir de consideraciones energéticas y evitar preconceptos estructurales, corrige la tendencia a sobreestimar la población del estado desestructurado que han mostrado todos los índices anteriores. Por lo tanto, este indicador es el primero que permite no sólo una apropiada cuantificación de la fracción de ambos arreglos moleculares locales o “clases” de moléculas corrigiendo a los índices anteriores, sino que habilita una adecuada clasificación de las mismas, algo hasta ahora inaccesible. En otras palabras, sólo ahora es posible caracterizar de modo no ambiguo la fracción de ambas “clases” de moléculas (como veremos luego: moléculas de baja densidad local, tetraédricas, que llamamos moléculas T, y moléculas de alta densidad local, con su coordinación de HB distorsionada, que llamamos D) y, más aun, clasificarlas apropiadamente [102, 103]. Otra cuestión importante en este sentido es el hecho de que (tal como hemos mostrado recientemente [102, 103]) los estados de alta y baja densidad deben caracterizarse al nivel de los arreglos multi-moleculares y no al nivel de molécula simple (tal como se ha hecho usualmente). Ello es debido a que, a bajas temperaturas, las moléculas desestructuradas o de alta densidad local (defectos) resultan muy minoritarias (su población había sido sobreestimada por los métodos anteriores) además de mostrar cierta tendencia a clusterizarse, y el sistema se debe particionar entre moléculas estructuradas, T, rodeadas por otras de su misma clase y por regiones localmente desestructuradas, defectos, en que moléculas desestructuradas, D, se encuentran rodeados mayormente de moléculas estructuradas, T. Esta capacidad de caracterizar apropiadamente a los defectos estructurales del agua y de disponer de un índice de estructura capaz de ser reformulado para contextos de superficies y nanoconfinamiento (tal como es posible ahora, dado que los índices anteriores no lo eran [102, 103]) podría resultar de gran relevancia en diversos campos, como en la comprensión de la estructura y de la dinámica de la hidratación y del comportamiento del agua de hidratación de membranas. Por ejemplo, ello nos permitiría caracterizar en simulaciones moleculares las distintas “clases” de moléculas de agua que se observan por espectroscopía infrarroja (IR) como ya indicado (con una distribución mucho

más rica que la del agua pura o bulk), y permitiría mapear distintas regiones de la membrana (incluso en regiones con presencia de efectores como colesterol y otros) de acuerdo al valor del índice y detectar regiones reactivas, es decir, con agua desestructurada, defectuosa y, por ende, fácilmente removible. Por supuesto que todo esto es algo muy ambicioso y de largo aliento. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo de tesis es mostrar el camino transitado para llegar al nuevo índice de estructura indicado. Pero más allá de mostrar que el índice tal cual desarrollado ya permite, por ejemplo, determinar la extensión espacial en que el agua de hidratación muestra su comportamiento anómalo hasta recuperar el comportamiento bulk, la extensión y aplicación al contexto específico de la hidratación de membranas lipídicas del índice quedará como un trabajo futuro.

1.2.2. Agua de hidratación de membranas lipídicas modelo

Como dicho, el paradigma moderno que describe a las membranas biológicas considera que el agua de hidratación es una parte insustituible y constitutiva de la membrana. En tal sentido, el agua de hidratación se encuentra tanto hidratando a los grupos polares de la membrana (en general vinculándose por puente de hidrógeno con los carbonilos y fosfatos de los fosfolípidos), como así también es capaz de penetrar o atravesar la región apolar constituida por las cadenas alquílicas, por lo que resulta fundamental para modular las interacciones entre la membrana y sus diversos efectores. En este trabajo de tesis nos interesará abordar, en una primera instancia, una de las varias cuestiones vinculadas a la descripción anterior mostrando como variaciones en la química de los lípidos de las membranas con y sin colesterol, produce respuestas diferentes en el agua de hidratación. En la [Subsección 1.1.2](#) ya comentamos la importancia del colesterol en las membranas lipídicas. Adicionalmente, los lípidos con grupos éter (sin carbonilo) están involucrados como plasmalógenos en el tráfico de colesterol [104, 105], por lo que estudios de la interacción del Chol y los lípidos con éter PC son requeridos. A diferencia del DMPC, el 14:0 Dieter PC posee igual número de átomos de carbono en sus cadenas hidrocarbonadas pero carece de los grupos carbonilos y posee dos grupos éter. Como veremos más adelante, el Chol

afecta las propiedades de las membranas lipídicas tanto en la fase líquido cristalina como en la fase sólido cristalina. En la fase líquido cristalina ocurre una compresión de la membrana y una disminución de la cooperatividad en la temperatura de transición, la cual no se modifica [106, 107] y expande la fase sólido cristalina. A concentraciones altas de colesterol, la transición de fase tiende a desaparecer, lo cual afecta el grado de libertad de los isómeros rotaciones de las cadenas alquílicas [108, 109, 110].

La acción del Chol también ha sido vinculada con el estado de hidratación de las membranas lipídicas. En este sentido, se han reportado cambios en las propiedades del agua en su vecindad inmediata utilizando Laurdan como sonda fluorescente. Por encima de la T_m el Chol produce un aumento del GP (*Generalized Polarization*, GP) de la membrana, un parámetro relacionado indirectamente con la disminución de agua en la membrana [110, 111]. Esta disminución del contenido de agua ha sido considerada una consecuencia del aumento del empaquetamiento del Chol por encima de T_m . Sin embargo, un estudio reciente ha mostrado que el mismo cambio en GP puede obtenerse cuando el octanol es privado del agua, indicando que no es necesario un cambio estructural en la fase para producir una disminución de GP [112], por lo que el Chol modula el contenido de agua en las membranas independientemente del empaquetamiento y el Laurdan es la sonda apropiada para medirlo. Los niveles de hidratación en las membranas lipídicas se pueden definir en tres regiones: alrededor de los grupos fosfatos, los grupos carbonilos y las cadenas alquílicas.

En estudios de dinámica molecular y de espectroscopía de generación de sumas de frecuencias vibracionales (*Vibrational Sum Frequency Generation*, VSFG) también se ha detectado población alrededor de los grupos colina [113], de hecho la hidratación de cada región esta correlacionada. La interacción agua-fosfato se ve mejorada cuando los grupos carbonilos están ausentes [114, 115]. Utilizando combinaciones de espectroscopía de fluorescencia, análisis FTIR-ATR e isothermas de presión/área en la superficie de monocapas, se ha observado que la población de agua relajable aumenta en sistemas con éter PC en comparación con ester PC [116]. Esto ha sido explicado con la formación de los puentes de agua entre los grupos fosfatos (POs) y carbonilos (COs) de las

PCs que dificulta los grados de libertad rotacional que se ganan cuando las moléculas de agua están unidas solo a los POs de los lípidos con éter [116, 117, 118].

Como ya ha sido reportado, la ausencia de grupos COs fortalece los enlaces de puente de hidrógeno con los grupos POs [115, 119, 120] formando una primera esfera de hidratación más compactada y una segunda esfera de hidratación menos compacta. Esta situación particular que se genera en ausencia de grupos COs podría ser modificada por el Chol dado que podría cambiar la propensión a desplazar agua en procesos donde hay involucradas interfases (penetración de péptidos, fusión, etc.), por lo que sería relevante determinar si el Chol modula a las membranas de éter PC y, además si él mismo constituye un centro de hidratación. En este sentido, en un trabajo en colaboración con el grupo del Prof. Aníbal Disalvo, que realiza estudios utilizando las propiedades fluorescentes del Laurdan, llevamos a cabo simulaciones de dinámica molecular para modelar la distribución de las poblaciones de moléculas de agua y de los HBs para cada sistema.

Por otra parte, se ha encontrado que el colesterol labiliza localmente el agua de hidratación [121, 122], lo cual podría ser relevante en términos de la reactividad de la membrana a la luz de una descripción actual en el contexto de la unión de ligandos a macromoléculas que nuestro grupo de trabajo ha contribuido a establecer [123, 124, 125, 126, 127, 128]. Una fuerza impulsora para el proceso de unión lo constituye el reemplazo por el ligando de agua lábil (comparada con la significativamente más lenta agua de hidratación global) o fácilmente removible (es decir, implicaría un bajo trabajo termodinámico de remoción). Por ejemplo, dado que el colesterol parece estar involucrado en la agregación catalítica mediada por la membrana de péptidos beta amiloides que producen la enfermedad de Alzheimer [129], la modulación del agua de hidratación puede ser una cuestión sumamente relevante en este contexto.

Finalmente, desde una perspectiva más general existen varias cuestiones que aún no han sido dilucidadas en el contexto del agua de hidratación de membranas. Por un lado, el agua de hidratación suele presentar, incluso a temperatura ambiente, una dinámica lenta característica del agua sobreenfriada (o comportamiento vítreo). Dicho comportamiento se extiende a una

distancia importante de la membrana, de alrededor de 1 nm o más (incluso existen resultados recientes que hablan de una longitud de escala sumamente anómala, más para la estructura que para la dinámica [130]). Por otro lado, los experimentos del grupo del Prof. Aníbal Disalvo (como ser, por ejemplo, por medio de espectroscopía infrarroja, IR, [131]) han detectado la existencia de una gran riqueza estructural, con diversos “tipos de aguas”. Por lo tanto, poder disponer de un índice de estructura que caracterice microscópicamente al agua de hidratación de membranas sería sumamente relevante y permitiría “mapear” regiones con distinta reactividad local.

A partir de todo lo anterior, queda de manifiesto la importancia de considerar el efecto del agua de hidratación, a diferencia de viejos paradigmas en que el agua era un mero medio en el que se encontraba la membrana (más allá de inducir su autoensamble). Es por ello que el estudio del agua resulta fundamental para entender no sólo la estructuración y dinámica de la membrana sino su reactividad y función.

1.3. Metodología

En esta sección seguiremos uno de los textos clásicos de técnicas de simulación computacional [132]. La dinámica molecular (DM) es una técnica que permite calcular propiedades de transporte y de equilibrio de sistemas clásicos de muchos cuerpos. El término “clásicos” significa que el movimiento de los núcleos de las partículas que componen el sistema obedecen las leyes de la mecánica clásica. Esta es una muy buena aproximación para una gran cantidad de materiales, donde los efectos cuánticos pueden no ser tenidos en cuenta para su estudio. Básicamente, se trata de “ver” como evoluciona un sistema en el tiempo dadas ciertas condiciones iniciales y cambios impuestos durante la simulación.

Para preparar la muestra, elegimos un sistema modelo que consiste en un cierto número de partículas que interaccionan según un campo de fuerzas apropiado, y luego resolvemos las ecuaciones de movimiento de Newton hasta que las propiedades del sistema ya no varíen con el tiempo, en este estado decimos que el sistema ha alcanzado el equilibrio. Luego de equilibrado, realizamos la medida en sí, siguiendo esta estructura básica de un programa de DM:

1. Leemos los parámetros que especifican las condiciones de la simulación, por ejemplo: temperatura inicial, número de partículas, densidad, paso de tiempo (*time step*).

2. Iniciamos el sistema, es decir, asignamos posiciones (sin que las mismas se superpongan) y velocidades iniciales a cada una de las partículas que lo forman según alguna distribución (uniforme, Boltzmann, entre otras), teniendo en cuenta la temperatura promedio del sistema o de manera equivalente, su energía cinética media.

3. Luego calculamos las fuerzas que actúan sobre todas las partículas. En la mayoría de los casos, la cantidad de partículas que forman el sistema es grande lo cual implica un gran costo computacional si para cada partícula la fuerza fuera a calcularse respecto de todas las demás partículas del sistema (un cálculo innecesario dado que la interacción disminuye rápidamente con la distancia), por lo que las calculamos de manera aproximada según algunos criterios.

4. Luego integramos las ecuaciones de movimiento de Newton. Este paso y el anterior son el núcleo de la simulación y se repiten hasta que calculamos la evolución temporal del sistema para el intervalo deseado. El algoritmo más utilizado para realizar este paso es el de Verlet [133], que realiza una expansión de Taylor de las posiciones (\vec{r}) de las partículas a tiempos t entre $t + \Delta t$ y $t - \Delta t$:

$$\begin{aligned}\vec{r}(t + \Delta t) &= \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{\vec{f}(t)}{2m}\Delta t^2 + \frac{\Delta t^3}{m}\ddot{\vec{r}} + O(\Delta t^4)\dots \\ \vec{r}(t - \Delta t) &= \vec{r}(t) - \vec{v}(t)\Delta t + \frac{\vec{f}(t)}{2m}\Delta t^2 - \frac{\Delta t^3}{m}\ddot{\vec{r}} + O(\Delta t^4)\dots\end{aligned}\tag{1.1}$$

donde la primera derivada de \vec{r} es la velocidad y la segunda está determinada por la fuerza (\vec{f}). Combinando las ecuaciones anteriores y despreciando los términos de orden superior a 3 obtenemos:

$$\vec{r}(t + \Delta t) \approx 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \Delta t) + \frac{\vec{f}(t)}{m}\Delta t^2\tag{1.2}$$

El estimado de la nueva posición contiene un error de orden Δt^4 , donde Δt es el paso de tiempo elegido para la DM. Es importante notar que el algoritmo de Verlet no utiliza la velocidad para calcular las nuevas posiciones y se logra una precisión de orden Δt^3 considerando términos

Δt^2 . Reemplazamos las posiciones anteriores por las nuevas y se repite el paso 3.

5. Luego de completado el *loop* anterior, calculamos y almacenamos los promedios de las cantidades medidas (temperaturas, energía potencial, energía total, etcétera), y termina la simulación.

En este trabajo de tesis utilizamos el programa de Amber que realiza simulaciones de dinámica que permite simular los sistemas de membranas modelo de interés. Para el estudio de membranas de DPPC con DHA (Sección 2.1) utilizamos el paquete de simulación Amber14 [134] para simular membranas con un total de 128 moléculas, donde cada monocapa presenta 64 moléculas de lípido en un arreglo de 8 x 8. En las membranas mixtas de DPPC y DHA removimos 18 moléculas de DPPC y colocamos moléculas de DHA en su lugar. Trabajamos también con menores concentraciones de DHA pero dado que los resultados son cualitativamente similares solo mostramos los resultados para la concentración más alta. Las membranas las estabilizamos a 323 K, una temperatura a la cual la membrana de DPPC se encuentra en su estado fluido ya que la temperatura de transición de fase es 314 K para este lípido.

Para estudiar los efectos del DHA en membranas de DPPC y colesterol (Sección 2.2 y Subsección 3.1.2) utilizamos CHARMM-GUI Membrane Builder [135] para armar 5 membranas diferentes. Aquí utilizamos el paquete actualizado Amber16 [136] y los campos de fuerza Lipid17 [137] y GAFF [138]. Todos los parámetros de los campos de fuerza de Amber y Lipid17 se pueden obtener a partir del paquete AmberTools20 [139]. Las membranas puras de DPPC (utilizadas también en la Subsección 3.2.4) consisten en un arreglo de lípidos de 8 x 8 a cada lado de la bicapa. La membrana de DPPC-Chol la preparamos con 45 moléculas de DPPC y 19 moléculas de colesterol por monocapa, dando como resultado una concentración de colesterol del 30%. Luego agregamos moléculas de DHA hasta llegar a una concentración del 30% manteniendo fija la proporción lípido/colesterol (70:30). Al igual que en la sección Sección 2.1, realizamos simulaciones con menores concentraciones de DHA (que tampoco mostramos) y la temperatura fue de 323 K.

Para el estudio de xantonas en membranas de DPPC y DMPC (Sección 2.3) tanto el

paquete de simulación, el campo de fuerza y los parámetros de enlace, ángulos, torsiones y Lennard-Jones son los mismos que los utilizados en los sistemas de DPPC-Chol y DPPC-Chol-DHA y se construyeron con 64 lípidos por monocapa en un arreglo de 8 x 8. Luego removimos 9 lípidos en cada monocapa y en su lugar introdujimos moléculas de hidroxixantona orientadas de forma aleatoria, pero cercana a la posición de equilibrio para acortar los tiempos de simulación (colocamos 18 xantonas por monocapa). Realizamos otras simulaciones con las xantonas posicionadas en el medio acuoso y luego de un largo período de simulación llegaron a la posición de equilibrio dentro de la membrana. Las membranas las estabilizamos a 293 K y a 323 K para los sistemas con DPPC y a 283 K y 303 K para DMPC respectivamente, para las fases gel y fluida respectivamente. La temperatura de transición de fase para el DMPC es de 297 K.

Todas las membranas simuladas durante la tesis las solvamos con suficientes moléculas de agua TIP3P de forma tal de garantizar la hidratación completa del sistema, asegurándonos que en cada sistema la relación agua-lípido sea como mínimo 50:1. La solvatación la realizamos a lo largo del eje Z y en las direcciones (X,Y) del plano aplicamos condiciones periódicas de contorno. Realizamos 2 pasos de minimización a volumen constante. Primero se minimizó el solvente manteniendo la membrana y el sistema entero fijos. Luego de que la temperatura haya estabilizado utilizando el termostato de Langevin [140], las dimensiones y la densidad del sistema se equilibraron hasta establecer las distancias de equilibrio entre lípidos. En todos los casos realizamos más dinámicas de equilibración de al menos 600 ns para asegurarnos de obtener membranas equilibradas, según el tipo de membrana y la cantidad de componentes de la misma. Las dinámicas de equilibrio y las dinámicas finales las realizamos con el ensamble NPT, con SHAKE activado para los enlaces de hidrógeno. De todos los sistemas generamos varias réplicas para tener estadística suficiente.

Los experimentos de potencial zeta, densitometría, conductividad y la preparación de los liposomas correspondientes al [Capítulo 2](#) fueron realizados por la sub-línea experimental de nuestro grupo de investigación formado por las Dras. Marcela Ana Morini, Viviana Isabel

Pedroni, Maria Belén Sierra y la Lic. Pamela Mendioroz.

Las membranas de DMPC y de 14:0 Dieter PC puras y con un 30 % de Chol estudiadas en la [Subsección 3.1.1](#), las preparamos de la misma forma que las membranas en la [Sección 2.2](#) y en la [Sección 2.3](#) descriptas anteriormente, utilizando el CHARMM-GUI Membrane Builder [135], con un arreglo de 8x8 moléculas de lípido y para los sistemas mixtos con 45 moléculas de lípido y 19 moléculas de Chol en cada monocapa. El paquete de simulación, los parámetros de enlace, ángulo, torsión y Lennard-Jones y los campos de fuerza son los mismos que los utilizados en el [Capítulo 2](#), al igual que los procedimientos de hidratación, equilibración y simulación de las membranas.

Los experimentos de espectroscopía de fluorescencia con la sonda Laurdan y VSFM fueron realizados por el grupo colaborador de los licenciados H. A. Perez y R. E. Giménez a cargo de la Dra. M. A. Frías y el Dr. E. A. Disalvo. en el Centro de Investigaciones en Biofísica Aplicada y Alimentos, CIBAAL, Universidad Nacional de Santiago del Estero y CONICET (RN 9 - Km 1125, 4206 Santiago del Estero, Argentina).

En el [Capítulo 3](#) realizamos simulaciones de DM para los modelos de agua SPC/E y TIP5P utilizando el programa de simulación GRoningen Machine for Chemical Simulations (GROMACS) version 5.0.2 [141]. Todos los enlaces fueron constreñidos utilizando el algoritmo LINear Constraint Solver (LINCS) y las interacciones electrostáticas de largo alcance fueron evaluadas utilizando el método de malla de partículas de Ewald (*particle mesh Ewald, PME*). El paso de simulación que utilizamos fue de 2 fs. Usamos un termostato de Berendsen modificado y el barostato de Parrinello-Rahman a 1 bar como presión de referencia. Todas las simulaciones las realizamos en cajas cubicas con un tamaño apropiado con condiciones periódicas de contorno y con un *cutoff* de 1 nm para las fuerzas de corto alcance. En todos los casos los sistemas fueron equilibrados por tiempos mucho mayores al tiempo de relajación estructural del sistema o relajación α , realizamos las dinámicas de producción de datos por al menos 30 ns en cada caso. En la [Subsección 3.2.1](#) el sistema de SPC/E lo preparamos con 216 moléculas de agua y el sistema de TIP5P con 512 moléculas. En la [Subsección 3.2.2](#) y en la [Subsección 3.2.3](#) el sistema de SPC/E

lo preparamos con 1050 moléculas de agua, mientras que los sistemas de TIP4P/2005 y TIP5P con 1010 y 1087 moléculas de agua respectivamente. Estos tamaños son apropiados para el enfoque sobre las propiedades dinámicas donde se demanda un número grande de realizaciones diferentes dentro del ensamble isoconfiguracional (utilizamos 1000 dinámicas isoconfiguraciones para cada temperatura).

Capítulo 2

Interacción de membranas lipídicas con efectores de interés como ácidos grasos Omega-3 y xantonas

El objetivo de este capítulo consiste en llevar a cabo simulaciones computacionales de modo de aportar una visión molecular de la estructura y la dinámica de bicapas lipídicas modelo interactuando con diversos efectores, como el colesterol, los ácidos grasos Omega-3, presentes principalmente en las membranas de las células neuronales (en particular, el DHA) y heterociclos tricíclicos fusionados (xantonas). Pretendemos determinar las diversas modificaciones que dichos efectores producen en distintos parámetros de membrana, como por ejemplo su fluidez. Específicamente, en el caso de los ácidos grasos Omega-3, cuya relevancia crece día a día tanto desde una perspectiva nutriceútica como terapéutica, suponemos que los mismos pueden afectar la fluidez de la membrana lipídica, revirtiendo los efectos que el colesterol produce sobre la misma al rigidizar las cadenas alifáticas. Por su parte, suponemos que las xantonas, pequeñas moléculas de origen natural que constituyen estructuras moleculares privilegiadas, con un gran espectro de actividades biológicas y terapéuticas, pueden interactuar con la membrana lipídica debido a su conformación planar y a su esqueleto apolar que a su vez puede acomodar diversos sustituyentes que le otorguen características anfífilas. El objetivo de nuestras simulaciones

computacionales consiste en determinar los aspectos moleculares responsables de respuestas macroscópicas significativas en la estructura y dinámica de la membrana.

2.1. Ácidos grasos Omega-3

En esta sección mostraremos un trabajo experimental desarrollado por la sub-línea experimental de nuestro grupo, en el cual utilizamos potencial zeta, densitometría y simulaciones de dinámica molecular para investigar las interacciones del DHA libre con membranas lipídicas de DPPC [142] con la finalidad de estudiar los cambios en la fluidez de membrana y en la estructura luego de la incorporación de DHA.

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación [143] mostramos que la carga superficial del liposoma depende del tipo de lípido y de condiciones como la temperatura o el estado de fase del liposoma, por lo que mediciones de potencial zeta en función de la temperatura pueden ser utilizadas para detectar la temperatura de transición de fase y de pre-transición de los lípidos [144]. Esta técnica nos permite la apreciación de los cambios de fase en los sistemas lipídicos estudiados, así como su carga superficial y, junto con otros estudios, el análisis del cambio del potencial zeta en función de la temperatura otorga información sobre el arreglo estructural de los lípidos en estudio. El DPPC muestra valores negativos de potencial zeta para DPPC en la fase líquido cristalino y positivos en la fase sólido cristalino. Este comportamiento lo explicamos en nuestro trabajo [143] en términos de la conformación molecular adquirida por el DPPC, ya sea exponiendo el grupo fosfato en la fase fluida o exponiendo el grupo colina en la fase gel. La reorientación de la dirección de los grupos de las cabezas polares en PC por la transición de fase es conocida en la literatura, especialmente en el campo de resonancia magnética nuclear (RMN) con ^{31}P y difracción de rayos X [145, 146, 147].

En la [Figura 2.1](#) mostramos los valores obtenidos de potencial zeta con enfriamiento continuo para DPPC y DPPC-DHA donde las diferentes mezclas de DPPC-DHA con agua como solvente muestran una carga superficial. Este resultado es similar al obtenido en nuestro trabajo previo recién mencionados para el DPPC (valores negativos de potencial zeta en la fase líquido cristalina

y valores positivos en la fase sólido cristalina) y observamos el mismo escenario en el sistema de DPPC con 10% de DHA [Figura 2.1](#). En contrapartida, la mezcla con 30% de DHA arroja valores negativos de potencial zeta en todo el rango de temperaturas, pasando por las fases sólido cristalina y líquido cristalina, como podemos ver en la [Figura 2.1](#).

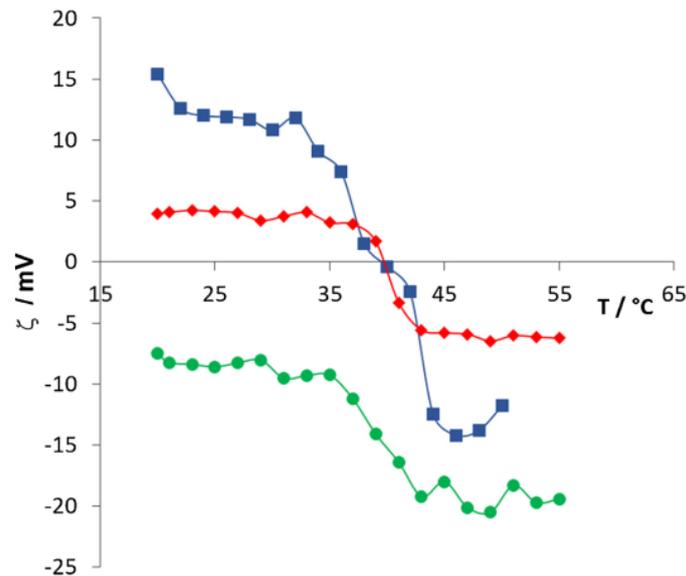


Figura 2.1: Potencial Zeta en función de la temperatura para los sistemas de DPPC (cuadrados azules) y DPPC con 10 y 30% de DHA (rombos rojos y círculos verdes respectivamente) preparados y dispersados en agua. En todos los casos la desviación fue menor al 10%, no introducida en el gráfico para una mejor visualización. Los datos reportados son el promedio de tres grupos de liposomas diferentes.

Para los liposomas de DPPC el gráfico de potencial zeta dependiente de la temperatura nos muestra que la transición de fase ocurre con un cambio abrupto en los valores de potencial zeta [Figura 2.1](#), siendo la transición menos brusca para las mezclas de DPPC-DHA [Figura 2.1](#). Podemos observar también que la temperatura de transición de los sistemas de DPPC-DHA al 10% está más cercana a la del DPPC puro que la del sistema DPPC-DHA al 30% que se mueve hacia valores más bajos. Si consideramos el signo y la magnitud del potencial zeta en la fase fluida para las mezclas de DPPC-DHA, encontramos que para las membranas con un contenido de 10% de DHA la carga superficial es un poco menos negativa que para el caso de DPPC puro. Estas modificaciones pueden deberse a cambios en la localización u orientación de las

grupos polares de las cadenas de DPPC por la presencia vecina de las moléculas de DHA. Estas últimas ubican su zona polar en la región de las cabezas de los lípidos mientras que sus cadenas hidrofóbicas, usualmente no extendidas en su totalidad, se ubican junto a las colas no polares. Este arreglo resulta en una menor exposición de los grupos fosfato de los lípidos en comparación con las membranas de DPPC puro. Para el caso de membranas con un contenido de DHA del 30 %, los valores de potencial zeta se vuelven significativamente más negativos que aquellos para las membranas de puras de DPPC. Esto además nos indica que no sólo la contribución del fosfato esta presente en la carga de la superficie si no también la contribución de la disociación de las moléculas de DHA, una hipótesis apoyada en los grandes aumentos de conductividad que observamos en los sistemas de DPPC-30%DHA (datos no mostrados).

Las propiedades termodinámicas de los liposomas de DPPC las derivamos en su mayoría del estudio del volumen específico, que lo podemos calcular luego de realizar medidas de densidad utilizando la siguiente ecuación:

$$\varphi_v = \left[1 - \frac{\rho - \rho_0}{c}\right] \frac{1}{\rho_0} \quad (2.1)$$

donde φ_v es el volumen específico, ρ es la densidad de la solución, ρ_0 es la densidad del solvente puro y c es concentración de soluto (el lípido) en mg/mL. El φ_v en función de la temperatura lo podemos observar en la [Figura 2.2](#), donde los valores de φ_v aumentan a medida que la temperatura se incrementa, como era de esperar. El incremento más notorio se da en la región de temperaturas cercanas a T_m , indicando un aumento del volumen de los fosfolípidos mientras se da la transición de la fase sólido cristalina a la fase líquido cristalina. Si bien la forma de las curvas del gráfico son similares, las vesículas que contenían DHA dan valores más bajos con respecto a las de membranas de DPPC puras en todas las temperaturas lo que podría significar que las membranas con DHA son más compactas en comparación con las membranas sin modificar. Además, a medida que la concentración de DHA aumenta la T_m se desplaza hacia valores más bajos [Tabla 2.1](#). Estos resultados poseen errores experimentales que coinciden muy bien con los errores obtenidos por potencial zeta y densidad mostrados en la [Tabla 2.1](#).

Tabla 2.1: Temperaturas de transición obtenidas por Potencial Zeta y medidas de densidad para DPPC y mezclas de DPPC-DHA en agua. La información contiene la media \pm SD.

Sistema	Potencial Zeta	Densidad
DPPC	41.4 ± 0.8	41.25 ± 1.00
DPPC-DHA10%	40.5 ± 1.2	40.00 ± 1.20
DPPC-DHA30%	37.9 ± 0.9	37.50 ± 0.80

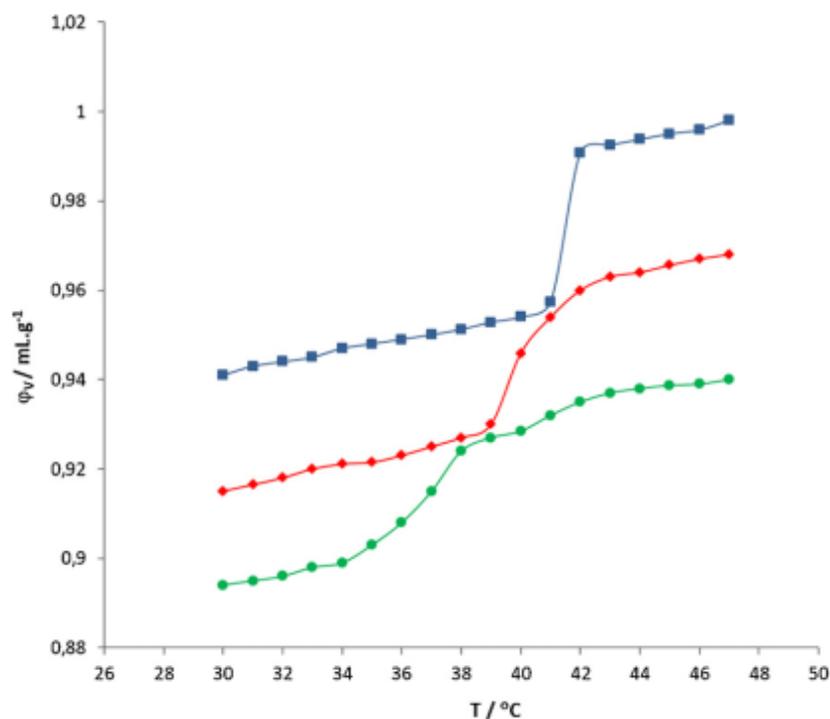


Figura 2.2: Volumen específico, φ_v en función de la temperatura para membranas de DPPC (cuadrados azules) y DPPC con 10 y 30% de DHA (rombos rojos y círculos verdes respectivamente). En todos los casos la desviación fue menor al 10%, no introducida en el gráfico para una mejor visualización. Los datos reportados son el promedio de tres grupos de liposomas diferentes.

La dependencia de φ_v versus temperatura nos permite derivar el parámetro de transición de medio pico (*half-width transition*), ΔT_m , el cambio de volumen a esta temperatura, $\Delta\varphi_v$,

y la expansibilidad térmica, α_m , ($\alpha_m = (\delta V/\delta T)$) a la temperatura de transición [144]. Estos valores los podemos apreciar en la [Tabla 2.2](#) para los sistemas de DPPC y de los sistemas mixtos DPPC-DHA, donde los valores de α_m para los sistemas mixtos concuerdan muy bien con los reportados anteriormente [148].

Tabla 2.2: Valores de Temperaturas de transición principal, T_m , transición de medio pico, ΔT_m , cambios de volumen, $\Delta\varphi_v$, y la expansibilidad térmica, α_m , a la temperatura de transición principal para DPPC y mezclas de DPPC-DHA en agua.

Sistema	$T_m/^\circ C$	$\Delta T_m/^\circ C$	$\Delta\varphi_v$ $10^5/\text{mL.g}^{-1}$	α_m $10^5/\text{mL.g}^{-1}$
DPPC	41.25	0.35	3100	8857
DPPC-DHA10 %	40.00	0.90	4050	4500
DPPC-DHA30 %	37.50	1.10	4500	4090

A continuación mostramos los cálculos realizados a partir de las simulaciones de dinámica molecular comenzando por la [Figura 2.3](#) donde mostramos el desplazamiento cuadrático medio en dos dimensiones, 2D-MSD (el MSD dentro del plano de la membrana), para las membranas de DPPC puro y de DPPC-DHA. El MSD es una medida de la diferencia promedio en la posición de las partículas respecto a su posición de referencia (desplazamiento) en el tiempo. El MSD se define como:

$$MSD = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N (x_n(t) - x_n(0))^2 \quad (2.2)$$

donde N es el número de átomos del lípido (consideramos todos los átomos pesados del lípido), $x_n(0) = x_0$ es la referencia o posición de cada átomo y $x_n(t)$ es la posición de cada átomo a un tiempo t determinado (mostramos los resultados para un período de 100 ns). El desplazamiento luego lo promediamos sobre todos los fosfolípidos de la membrana. De la [Figura 2.3](#) podemos aprender que, en mezclas de DPPC-DHA, las moléculas de DHA muestran valores más grandes

de MSD comparado con las cadenas de DPPC a $T = 323$ K, mientras que a $T = 293$ K observamos la misma tendencia (datos no mostrados), pero las desviaciones del comportamiento respecto a la membrana de DPPC puro son menores. Al mismo tiempo, la presencia de DHA también fluidifica la membrana ya que las cadenas de los lípidos de DPPC en las membranas mixtas muestran una movilidad mayor comparado con el comportamiento de las membranas de DPPC puro (también mostrado en la [Figura 2.3](#)).

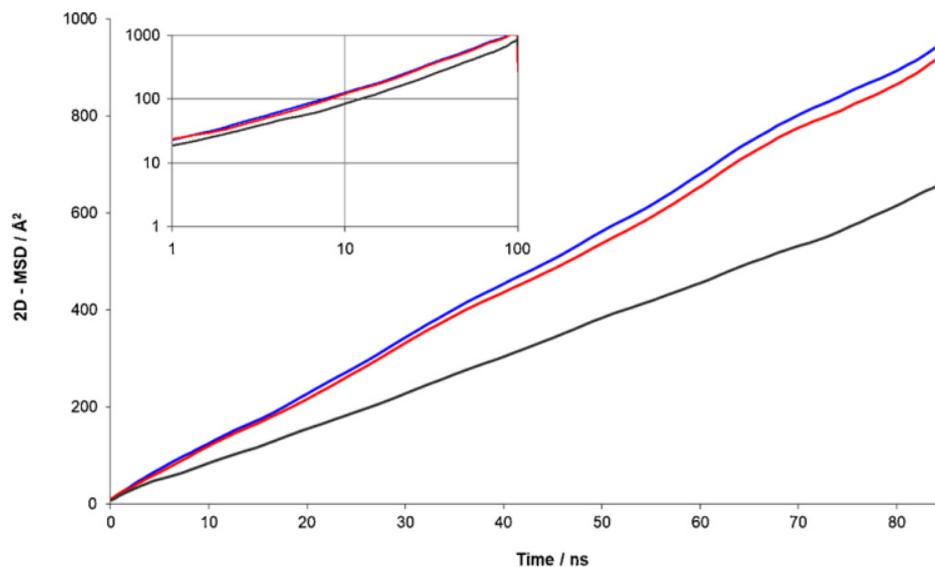


Figura 2.3: MSD en dos dimensiones en función del tiempo para DPPC puro (negro), DPPC vecinos a DHA (rojo) y DHA (azul) en una membrana mixta de DPPC-30%DHA para $T = 323$ K. En el recuadro se muestra la misma información pero en escala log-log.

A su vez, la [Figura 2.4](#) muestra los perfiles de densidad para los diferentes grupos de membrana y los grupos carbonilos del DHA a $T = 323$ K. En dicho gráfico podemos observar que los grupos carboxilos de las moléculas de DHA se ubican a la altura de las cabezas polares de los lípidos, cerca de los grupos carbonilo, fosfato y colina, mientras que la parte hidrocarbonada del DHA se encuentra enterrada en las cadenas no polares de los lípidos.

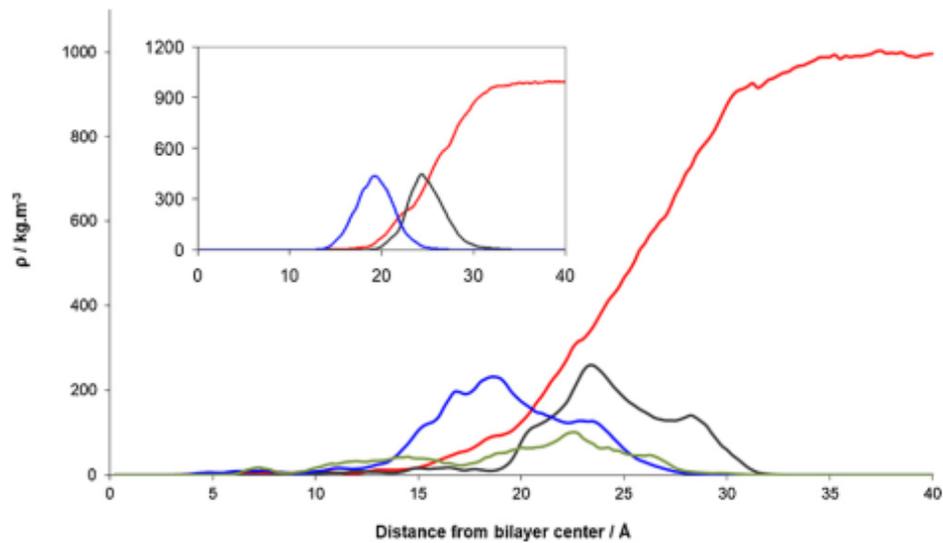


Figura 2.4: Perfil de densidad a lo largo del eje Z para agua (rojo), grupos carbonilo del DPPC (negro), grupos fosfato del DPPC (azul), y el grupo hidrofílico del DHA (verde) para $T = 323$ K. En el recuadro mostramos el perfil de densidad de la membrana de DPPC puro a la misma temperatura.

De la figura podemos observar que la presencia de DHA ensancha significativamente los picos en la región correspondiente a las cabezas de los lípidos, al comparar con el caso de las membranas de DPPC puro mostrada en el recuadro de la figura. En particular el DHA arrastra las posiciones de los carbonilos más cerca de los grupos fosfatos y colinas. Esta incorporación del DHA en la región de los grupos carbonilos de los lípidos puede ser la responsable de los valores negativos encontrados en las medidas de potencial zeta. Los resultados a $T = 293$ K (datos no mostrados) son similares pero los picos son un poco más estrechos comparados con el caso a $T = 323$ K. Adicionalmente en la figura [Figura 2.5](#) mostramos el perfil de densidad electrónica para membrana mixta de DPPC-DHA y para las membranas de DPPC pura a $T = 323$ K.

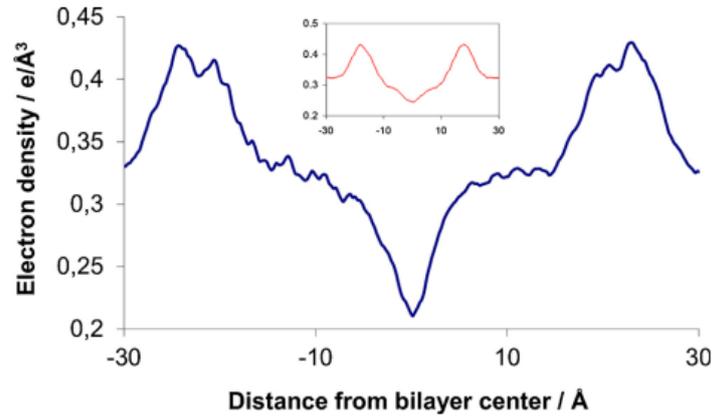


Figura 2.5: Perfil de densidad electrónica total de la membrana mixta de DPPC-DHA. En el recuadro mostramos el perfil de densidad electrónica total para la membrana de DPPC pura.

El ordenamiento de las cadenas alquílicas de los lípidos lo determinamos calculando el parámetro de orden S_{cd} . Este parámetro de orden es una medida relativa de la orientación de los enlaces C–D con respecto a la normal de la membrana, calculado como:

$$S_{cd} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle \quad (2.3)$$

donde θ es el ángulo entre un enlace C–H de una cadena en particular y la normal a la membrana donde la reorientación de la membrana es axialmente simétrica y los paréntesis angulares representan el promedio en el ensamble. En la [Figura 2.6](#) mostramos el perfil del parámetro de orden obtenido de simulaciones a lo largo de las cadenas hidrofóbicas del DPPC en la membrana mixta de DPPC-DHA y de la membrana pura de DPPC (siendo el valor de S_{cd} el promedio de las cadenas alquílicas sn-1 y sn-2). La mitad superior de las cadenas muestran un valor de S_{cd} más elevado, mientras que esta cantidad disminuye progresivamente en la segunda mitad hacia los grupos alquílicos terminales, cerca del centro de la membrana. Esto se debe a las mayores restricciones al empaquetamiento en la región superior a medida que las cadenas se anclan en la interfaz hidrofílica, mientras que la porción inferior esta sujeta a una menor restricción a la movilidad. Cabe destacar que el parámetro de orden lo calculamos con respecto a la normal a la superficie (eje Z) mientras que el MSD en dos dimensiones lo calculamos en el plano a la superficie (coordenadas XY). La membrana de DPPC en presencia de DHA nos

muestra valores más altos de S_{cd} que la membrana pura, siendo este incremento cualitativamente similar al compararlo con la membrana de DPPC con DHA esterificado [149]. Esta similitud en el comportamiento estructural entre el DHA libre y el esterificado en membranas con DHA es consistente a su vez con la situación para las propiedades dinámicas como el MSD lateral (XY), donde observamos un aumento en las membranas de DPPC con DHA esterificado, de la misma manera que nuestros resultados lo muestran en la Figura 2.3.

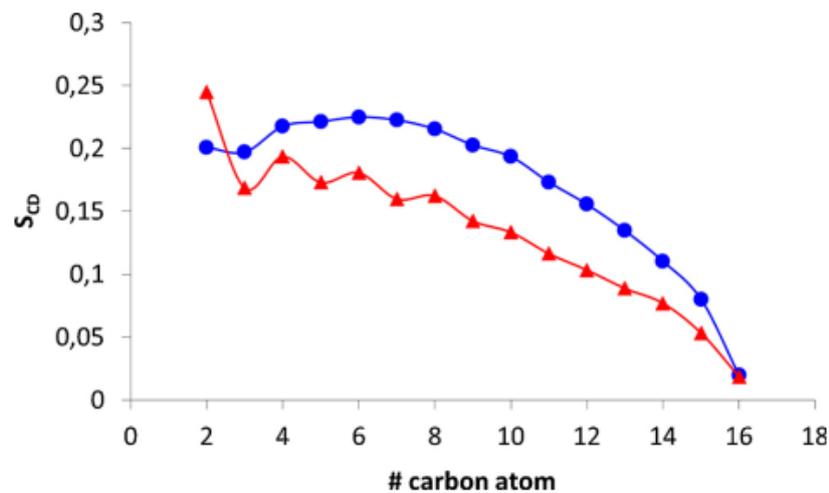


Figura 2.6: Parámetro de orden S_{cd} para las cadenas alquílicas de DPPC en la membrana de DPPC puro (triángulos rojo), en la membrana mixta DPPC-DHA (círculos azul) a $T = 323$ K. Los valores de S_{cd} corresponden al promedio de las cadenas alquílicas sn-1 y sn-2.

Recapitulando, podemos decir que la presencia de DHA suaviza la transición de fase tanto para la concentración de 10 % como para el 30 % mostrando gráficos de potencial zeta con formas muy diferentes a las del DPPC puro, siendo la forma de las curvas de DPPC-DHA muy similar una con la otra solo que la concentración más alta de DHA presenta valores más negativos mostrando así la contribución de las cargas negativas del DHA a la superficie. Los resultados de las medidas de potencial zeta nos indican que las moléculas de DHA ubican sus grupos carboxílicos junto a las cabezas polares de los lípidos, situación que podemos corroborar observando los perfiles de densidad obtenidos por simulaciones de dinámica molecular. Además son consistentes con los resultados publicados de rayos X en membranas de POPC-DHA, mientras que para sistemas de POPC-EPA se encontró que el EPA adopta una posición diferente

al ubicarse más profundo en la membrana, siendo este hecho la explicación a sus diferencias en su actividad biológica [66]. La ubicación del DHA en la membrana de DPPC es la que produce cambios estructurales en la organización de las cabezas polares de los lípidos, como observamos en los perfiles de densidad que mostramos en nuestras simulaciones donde los picos de los carbonilos y fosfatos son considerablemente más anchos en comparación con la membrana pura de DPPC. El aumento en la fluidez producido por el DHA (medido experimentalmente y confirmado por cálculos de MSD) arrastra a los grupos lipídicos, especialmente a los carbonilos.

En cuanto a las propiedades termodinámicas de las vesículas de DPPC, las derivamos en su mayoría del estudio del volumen específico, el cual fue similar al que obtuvimos por medidas de potencial zeta en función de la temperatura [82]. En dicho estudio observamos una disminución de la temperatura de transición y un aumento en el ancho de la transición de fase, los cuales atribuimos al efecto indirecto de la incorporación de efectores en la membranas lipídica actuando como impurezas [150]. Observamos que a mayor concentración de DHA, disminuye la temperatura de transición y, por lo tanto, la membrana se torna más fluida. Además de la disminución del valor de T_m , el ancho de la transición de fase aumenta cuando incrementamos la proporción de DHA. Este aumento de la fluidez de la membrana se da aun cuando el DHA produce un mayor ordenamiento de la misma. De todos modos, como veremos en una sección posterior, a veces no existe una relación trivial entre orden y fluidez. En cuanto a la expansión térmica observamos lo opuesto en la transición principal, lo cual deja en evidencia la disminución de la cooperatividad de la transición de fase en presencia de DHA. La temperatura de transición principal de los liposomas de DPPC en presencia de DHA disminuye. La disminución de la cooperatividad en los cambios estructurales de las bicapas lipídicas durante la transición de fase principal de los lípidos en presencia de DHA se ve reflejada también en los altos valores de $\Delta\varphi_v$ y α_m para el sistema puro de DPPC. Este efecto en los valores de la temperatura de transición y en la fluidez de la membrana los pudimos corroborar con los resultados de las simulaciones de dinámica molecular, donde podemos observar un aumento en el MSD para los sistemas mixtos de DPPC-DHA con respecto a el sistema puro de DPPC. En este sentido, las moléculas de DHA

no sólo son más móviles que las cadenas lipídicas del DPPC sino que su presencia mejora la movilidad de las cadenas de los lípidos, como podemos observar en el aumento de las curvas de MSD de dichas cadenas.

Dado que estos experimentos fueron realizados utilizando membranas modelo, es necesario profundizar el análisis para dilucidar como influyen los cambios lipídicos en la membrana de los diferentes tejidos a la actividad biológica. Por lo que a continuación (como ya descrito en el [Capítulo 1](#)) se extiende al estudio del mismo sistema en presencia de colesterol, para acercarnos más al comportamiento real de las membranas biológicas. La interacción de los ácidos grasos como el DHA con el colesterol es de fundamental importancia ya que la presencia de este último tiene efectos muy significativos en la estructura y en la función de las membranas celulares. En particular, el colesterol promueve un aumento de la rigidez de las cadenas alifáticas de los lípidos y, en vista de los resultados arriba expuestos, es posible que el DHA actúe revirtiendo o morigerando dicho efecto.

2.2. Ácidos grasos Omega-3 y colesterol

En esta sección de la tesis profundizaremos en el estudio de como el DHA modifica los efectos que produce el colesterol en la estructura y en la dinámica de las membranas de DPPC. Nuestros estudios revelan que el agregado de un 30% de DHA al sistema de DPPC-Chol tiende a revertir la acción del Chol en las membranas lipídicas modelo. Los resultados del trabajo que realizamos en esta sección dan señales del efecto de los ácidos grasos, particularmente del DHA, sobre las membranas lipídicas, con un potencial preventivo en enfermedades neuronales como la enfermedad de Alzheimer.

Comenzamos realizando medidas de potencial zeta con enfriamiento constante para los sistemas de DPPC, DPPC-Chol, DPPC-Chol-DHA con 10%, 20%, y 30% de DHA que podemos observar en la [Figura 2.7](#). Para el DPPC puro el gráfico de potencial zeta en función de la temperatura nos muestra que la transición de fase tiene un salto abrupto en los valores de potencial zeta (tal como en la obtuvimos anteriormente) y podemos apreciar la temperatura de

transición de 41 °C.

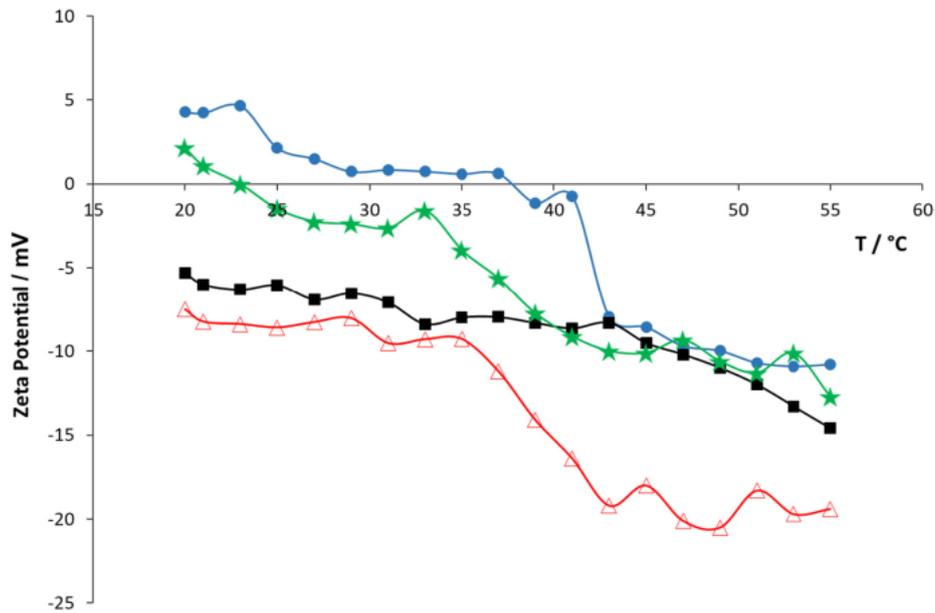


Figura 2.7: Potencial Zeta en función de la temperatura para los sistemas de DPPC (círculos azules), DPPC-Chol (cuadrados negros), DPPC-DHA 30% (triángulos rojos) y DPPC-Chol-DHA 30% (estrellas verdes) preparados y dispersos en agua. En todos los casos la desviación fue menor al 10%, no introducida en el gráfico para una mejor visualización. Los datos reportados son el promedio de tres grupos de liposomas diferentes.

El agregado de colesterol al DPPC hace que la transición de fase desaparezca. Es sabido que la presencia de colesterol en las membranas lipídicas fluidifica la fase gel y rigidiza la fase líquido cristalina, dando lugar a una nueva fase denominada fase líquido ordenada (Lo) [151]. Tanto al agregar un 10% como un 20% de DHA al sistema DPPC-Chol, la transición de fase no aparece. Sin embargo, al agregar una concentración del 30% de DHA la curva de potencial zeta muestra el típico cambio abrupto en la zona de la transición de fase principal y la temperatura de transición se mueve hacia valores más bajos [Tabla 2.3](#).

Tabla 2.3: Temperaturas de transición obtenidas por Potencial Zeta para DPPC y para mezclas de DPPC-DHA 30 % y de DPPC-Chol-DHA 30 % en agua. La información contiene la media \pm SD.

Sistema	$T_m/^\circ C$
DPPC	42.1 ± 0.9
DPPC-DHA30 %	37.9 ± 0.7
DPPC-Chol-DHA30 %	35.5 ± 1.1

Si comparamos el comportamiento del sistema ternario con el sistema binario de DPPC-DHA 30 % estudiado en la sección anterior podemos observar de la [Figura 2.7](#) que el comportamiento de las curvas de potencial zeta en función de la temperatura tiene la misma tendencia aunque muestra dos diferencias. En primer lugar la carga superficial del sistema sin colesterol es más negativa y en segundo lugar que la temperatura de transición del sistema ternario es más baja comparada con el sistema sin colesterol, siendo estas temperaturas 35.5 y 37.9 $^\circ C$ respectivamente, como podemos ver en la [Tabla 2.3](#).

La técnica de potencial zeta utilizada para realizar medidas en función de la temperatura, ha sido hasta la fecha escasamente explotada. En la sección anterior mostramos como esta técnica probó ser útil y un método simple para la obtención de la temperatura de transición de una muestra lípida. Ahora demostramos también que puede aportar información adicional sobre el sistema en estudio al combinarla con medidas de la carga superficial y fluidez. Los resultados de potencial zeta para el sistema de DPPC-Chol nos muestran que los valores decrecen en comparación con el sistema de DPPC puro, lo cual indica una carga superficial negativa. Considerando la estructura plana del colesterol que permite que el mismo se intercale en la región de las cadenas alquílicas de los fosfolípidos, Pandit et al. [152] propusieron que la formación de complejos entre el DPPC y el colesterol no era solamente la resultante entre la típica interacción

de puente de hidrógeno (donde el colesterol actúa como dador y el fosfolípido como aceptor) si no también entre los hidrógenos de los metilos en los grupos colinas y los átomos de oxígeno en los grupos hidroxilo del colesterol (siendo ahora el colesterol un aceptor y los fosfolípidos dadores). Estas interacciones exponen a los grupos fosfato de la superficie de forma tal que el potencial zeta del sistema DPPC-Chol se vuelva más negativo que en el sistema puro de DPPC. El signo del potencial zeta del DPPC en función de la disposición de los grupos de las cabezas de los lípidos en la superficie (y no por adsorción de iones del medio en la superficie) fue propuesta por nuestro grupo en [143]. Por lo que tanto para el sistema DPPC-Chol como para el sistema DPPC-Chol-DHA el signo del potencial zeta es considerado un resultado del reordenamiento de la superficie, incluyendo dominios, resultantes de las diferentes interacciones y afinidades entre los componentes de las membranas.

El efecto del colesterol sobre el estado de la fase lipídica lo podemos verificar en los registros del potencial zeta al ver la ausencia del cambio de pendiente en la zona de la temperatura de transición. Estudios de espectroscopía de emisión fluorescencia han reportado resultados similares [153]. La falta de pendiente es esperable ya que el esteroles desordena la fase sólida cristalina permitiendo la movilidad de las moléculas de DPPC en la membrana [154, 112], mientras que a altas temperaturas los esteroides ordenan la membrana [154]. En general, los grupos hidroxílicos del colesterol dan lugar a restricciones en el movimiento de las cadenas alquílicas y también retienen a los grupos amonio de las colinas [154]. Otra explicación es que el colesterol puede romper las interacción entre los fosfolípidos por lo que la diferencia en fluidez entre las diferentes fases sería menos marcada [155].

La adición de DHA al sistema de DPPC-Chol modifica el potencial zeta de la membrana a medida que se modifica la concentración de DHA, ya que el potencial zeta cambia de positivo a negativo de acuerdo con la concentración. Esto es relevante ya que la superficie de la membrana tiene papel muy importante en muchos procesos biológicos, como la interacción de una biomembrana con proteínas de membrana o liposomas transportadores de drogas con el sistema inmune [156]. Podemos observar que la adición de un 30 % de DHA al sistema de DPPC-

Chol promueve la aparición de la transición de fase. A estas concentraciones de DHA el sistema ternario tiene un comportamiento que se encuentra entre el DPPC-DHA 30% y el DPPC puro y también fluidifica la membrana como podemos ver por la disminución de la temperatura de transición.

La baja barrera energética de rotación sobre los enlaces C-C en la unidad repetitiva $-C=C-C-C=$ de las cadenas de los ácidos grasos poliinsaturados produce una multitud de rápidos cambios conformacionales [157, 158] que empujan al colesterol hacia una posición más superficial en la membrana. A su vez, las moléculas de DHA inducen un incremento en los movimientos isotrópicos en las regiones donde el DHA participa junto con el colesterol y se revierte el efecto de rigidez de la membrana producido por este, dando como resultado una mayor fluidez de membrana y restableciendo la transición de fase. Una propuesta similar sobre la formación de dominios utilizando membranas lipídicas modelo de POPC y a través de Rayos X y fluorescencia fue publicado en [159]. Dada esta distribución en la membrana y con nuestras medidas de conductividad en mente, es posible que una cierta parte del DHA no se haya podido ionizar y promovió la disrupción de los dominios de colesterol, como propusieron Williams et al. [160] usando espectroscopía de RMN 2H de estado sólido para explorar la organización moléculas de 1-[$^2H_{31}$] palmitoil-2-eicosapentaenoilfosfatidilcolina (PEPC-d31) y 1-[$^2H_{31}$] palmitoil-2-docosahexaenoilfosfatidilcolina (PDPC-d31) en mezclas con esfingomielina y colesterol.

En este trabajo [161], también estudiamos algunas propiedades estructurales de los sistemas DPPC-Chol y DPPC-Chol-DHA en función de la temperatura usando dilatometría y velocidad de ultrasonido. La disminución del volumen aparente de los sistemas mixtos comparado con los sistemas de DPPC puro indica la existencia de una contracción adicional a la fluctuación de volumen que las capas de fosfolípidos sufren por la presencia del colesterol, la cual se vuelve menos intensa al incorporar el DHA. Con un 30% de DHA el sistema ternario alcanza un volumen similar al de la membrana pura de DPPC. El efecto ordenador del colesterol en las cadenas alquílicas de DPPC se puede apreciar en técnicas como RMN, resonancia de spin electrónico y

espectroscopía de fluorescencia. Uno de sus efectos estudiados es la condensación que se origina como resultado del incremento de las interacciones de van der Waals entre las cadenas alquílicas debido al efecto ordenador [162]. También evaluamos la compresibilidad adiabática específica φ_K/β_0 , una propiedad mecánica de la membrana lipídica. Estos parámetros macroscópicos permiten evaluar la influencia del colesterol y del DHA en sus lípidos vecinos, cambiando así propiedades físicas de la membrana. De la [Figura 2.8](#) podemos observar que la respuesta mecánica de los sistemas mixtos es diferente a la del sistema de DPPC. La disminución de la compresibilidad específica revela la existencia de una disminución del desorden en los liposomas, principalmente en la parte hidrofóbica de la bicapa lipídica [163]. La adición de DHA de hasta 30% a los liposomas de DPPC-Chol hace a la membrana más compresible. Al igual que para el volumen aparente, la adición de 30% de DHA al sistema DPPC-Chol hace que tienda a comportarse como la membrana pura de DPPC.

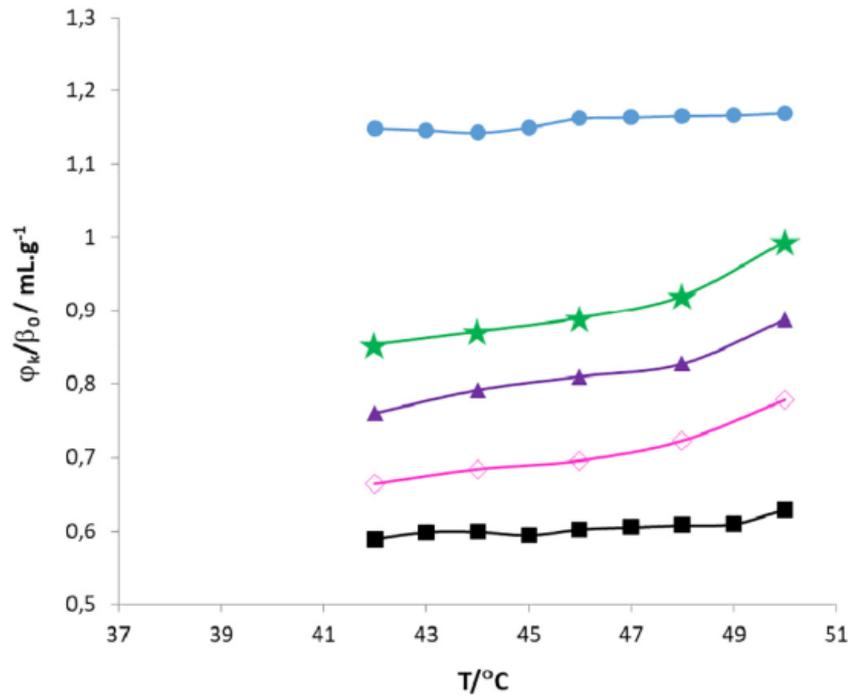


Figura 2.8: Compresibilidad adiabática específica, φ_K/β_0 , versus la temperatura para una suspensión de liposomas de DPPC (círculos azules), DPPC-Chol (cuadrados negros), DPPC-Chol-DHA 10 % (rombos rosas), DPPC-Chol-DHA 20 % (triángulos violetas) y DPPC-Chol-DHA 30 % (estrellas verdes) en la fase líquido cristalina. En todos los casos la desviación fue menor al 10 %, no introducida en el gráfico para una mejor visualización. Los datos reportados son el promedio de tres grupos de liposomas diferentes.

Luego de realizadas las simulaciones de dinámica molecular y los cálculos correspondientes, en la [Figura 2.9](#) mostramos el MSD en dos dimensiones para las membranas de DPPC, DPPC-DHA, DPPC-Chol y DPPC-Chol-DHA. Al comparar el DPPC (azul) con DPPC-Chol (negro) en estado fluido, es evidente que la presencia de Chol reduce el MSD de los lípidos tal como se ha observado anteriormente [164]. Por otro lado, el comparar la membrana pura de DPPC con DPPC-DHA (rojo) es similar al presentado en el trabajo anterior [142]. Al contrario que el Chol, el DHA aumenta la flexibilidad de la membrana significativamente. Es interesante que al incorporar DHA en la membrana de DPPC-Chol, el MSD es más grande que en la membrana pura de DPPC y se acerca al comportamiento de DPPC-DHA.

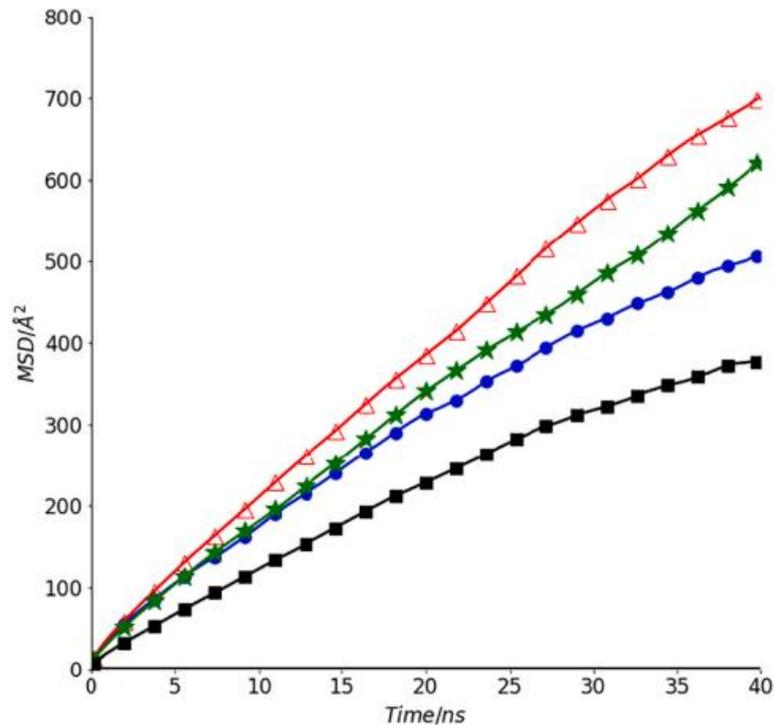


Figura 2.9: MSD en dos dimensiones en funciones del tiempo para DPPC en el sistema puro (círculos azules), DPPC en el sistema con Chol (cuadrados negros), DPPC en el sistema con DHA (triángulos rojos) y DPPC para el sistema con DHA y Chol (estrellas verdes).

En la [Figura 2.10](#) mostramos el perfil de densidad para la membrana de DPPC así como también para el DHA y el Chol a $T = 323$ K. Los efectos de la presencia del DHA y el Chol en la membrana de DPPC en el estado líquido cristalino ya son conocidos: El colesterol rigidiza la membrana lipídica (alargando las cadenas hidrocarbonadas) y el perfil de densidad se mueve hacia afuera del centro de la membrana, es decir, hacia valores más altos [165]. Por otro lado, la incorporación de DHA en la bicapa de DPPC pura torna el perfil de densidad considerablemente más ancho, lo cual interpretamos como una señal de mayor fluidez [142]. En cambio, ahora encontramos que al incorporar DHA a una mezcla de DPPC-Chol, el efecto del colesterol es nuevamente de alguna forma contrarrestado, ya que los picos de densidad se posicionan en un punto intermedio entre los dos casos.

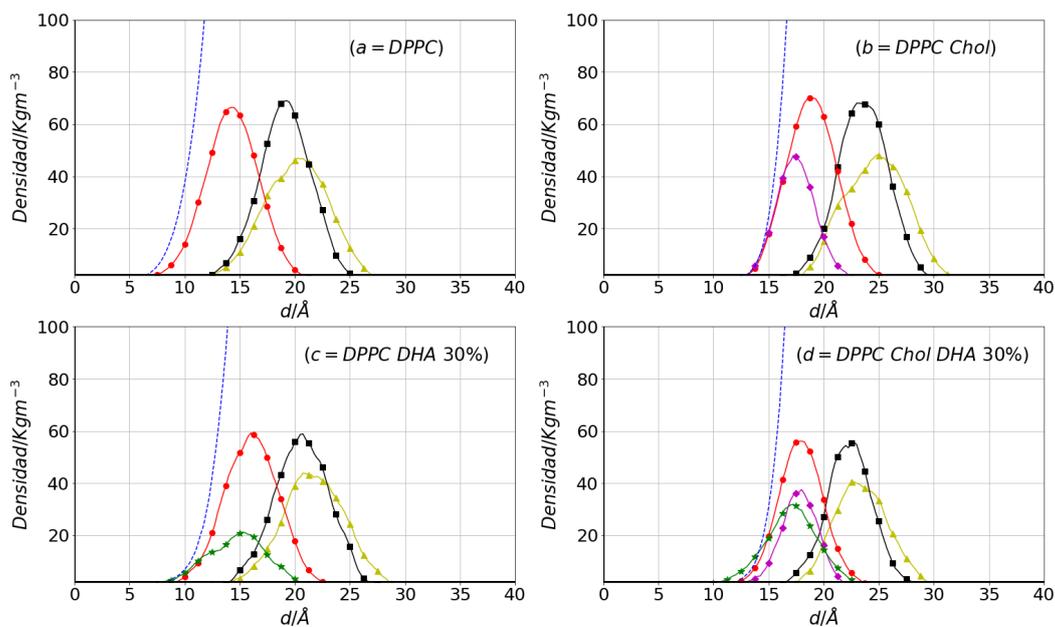


Figura 2.10: Perfil de densidad a lo largo del eje Z para agua (círculos azul), grupos carbonilo del DPPC (triángulos rojos), grupos fosfato del DPPC (cuadrados negros), el grupo hidrofílico del DHA (estrellas verdes) y el grupo hidroxilo del Chol (diamantes violetas) para $T = 323$ K. El valor cero corresponde al centro de la bicapa.

El parámetro de orden S_{cd} lo calculamos de la misma forma que en la sección anterior [Sección 2.1](#) y lo observamos en la [Figura 2.11](#), donde se compara el valor de S_{cd} para cinco membranas diferentes. Tanto las cadenas sn-1 como sn-2 mostraron la misma tendencia pero solo mostramos los valores de las cadenas sn-1. Los efectos del DHA sobre la bicapa de DPPC también los analizamos en el trabajo anterior [\[142\]](#), y los efectos de colesterol ya han sido previamente reportados [\[165\]](#). En la figura podemos observar la respuesta de la membrana de DPPC-Chol ante la presencia de DHA, apreciando como los valores de S_{cd} del sistema ternario se desplazan hacia los valores de la membrana de DPPC-DHA. Otra vez, podemos ver como el DHA revierte los efectos de rigidez del colesterol.

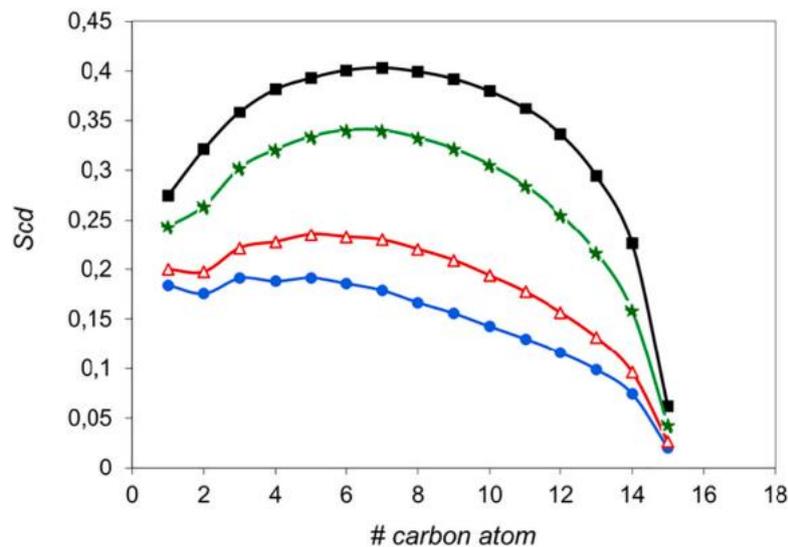


Figura 2.11: Parámetro de orden S_{cd} para las cadenas alquílicas de DPPC puro (círculos azules), DPPC-Chol (cuadrados negros), DPPC-DHA 30% (triángulos rojos) y DPPC-Chol-DHA 30% (estrellas verdes) a $T = 323$ K. Los valores de S_{cd} corresponden a las cadenas alquílicas sn-1 de DPPC.

Los conceptos de orden y fluidez pueden parecer opuestos ya que el término fluidez no representa una propiedad física con una definición clara para representar a estos sistemas. Sin embargo, como recientemente hemos encontrado en otros sistemas [166], la adición de colesterol a la membrana de DPPC genera un efecto dual dado que por un lado incrementa la rigidez al mismo tiempo que conserva la fluidez requerida para su funcionamiento. En este sentido, el término fluidez da una idea del aspecto dinámico de la membrana lipídica en la fase líquido cristalina. El problema con este concepto de fluidez es que la membrana lipídica puede ser “fluida” en más de un sentido. La descripción del estado material de un lípido en una membrana requiere de al menos dos grados de libertad: el grado de libertad de posición (translacional) y el grado de libertad interno (conformacional). Las bicapas lipídicas pueden mostrar fluidez en ambos grados de libertad, por lo que si entendemos a la fluidez como la difusión rápida de moléculas en el plano lateral de la bicapa lipídica, entonces la fluidez describe el desorden dinámico de las variables translacionales. Si por el contrario, la fluidez hace mención a una alteración o la falta de uniformidad en la distribución conformacional de las cadenas hidrocarbonadas, entonces

estamos ante un término que hace referencia a la presencia de desorden en los grados de libertad internos de las moléculas del lípido. En otras palabras, la bicapa lipídica puede mostrar fluidez en sendos grados de libertad como en el caso de la fase líquido desordenada, o solo en uno como ocurre en la fase líquido ordenada inducida por la presencia de colesterol [167].

A modo de resumen, podemos decir que los resultados de las simulaciones para el sistema ternario (DPPC-Chol-DHA) en el estado fluido son consistentes con los resultados experimentales mostrando que el DHA contrarresta los efectos del colesterol en la membrana lipídica. Particularmente este efecto lo podemos observar en los valores de movilidad mostrados en el MSD [Figura 2.9](#), donde el DHA parcialmente revierte el efecto de ensanchamiento de las cadenas hidrocarbonadas [Figura 2.10](#), fluidificando a la membrana, y también restablece en cierta medida el parámetro de orden [Figura 2.11](#), contrarrestando también el efecto ordenador del colesterol.

A pesar de su vital importancia, todavía quedan muchos aspectos fisicoquímicos sin resolver sobre la presencia de colesterol en las membranas fosfolipídicas a pesar de la enorme cantidad de trabajos realizados al respecto. En este sentido, se han publicado estudios sobre la formación de dominios ricos en colesterol dependiendo del tipo de lípido de membrana [168]. También hay numerosos estudios sobre la participación del DHA en la formación de dichos dominios [17, 169, 159, 66, 170]. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis son particularmente válidos para el sistema estudiado en las proporciones utilizadas. Dado que la membrana plasmática es una estructura muy compleja, elegimos un modelo de membrana al igual que hicieron otros autores [62, 171]. Sin lugar a duda los sistemas humanos son mucho más complejos que nuestro simple modelo de representación. Así todo, confiamos en que los resultados de este trabajo pueden ayudar a esclarecer los efectos del DHA sobre la membrana lipídica en presencia de colesterol.

2.3. Estructuras moleculares privilegiadas: heterociclos tricíclicos fusionados (xantonas)

En esta sección estudiaremos los efectos de hidroxixantonas (XAs) en membranas de DPPC y DMPC. Como veremos más adelante, tanto los resultados obtenidos por la parte experimental como por la parte computacional indican que la presencia de XAs en los sistemas estudiados aumenta la fluidez de la membrana y simultáneamente disminuye la compresibilidad de las mismas. Esta aparente contradicción deja de existir cuando consideramos la geometría plana de los anillos aromáticos fusionados que le permitirían empaquetarse de manera eficiente entre las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. Esto disminuiría la compresibilidad mientras que su presencia debilitaría las interacciones metileno-metileno entre cadenas, incrementando así su fluidez y disminuyendo su temperatura de fusión.

Para este fin utilizamos técnicas experimentales como velocidad de ultrasonido y densitometría que aportan información sobre la mecánica (volumen de compresibilidad) y sobre la termodinámica (temperatura de transición de fase) de membranas biológicas y de membranas modelo [83]. En la literatura observamos que, en la mayoría de los casos, la compresibilidad de la membrana incrementa con respecto a la membrana pura en presencia de efectores [83, 172], mientras que en otros sistemas las membranas se vuelven menos compresibles [163]. En algunos casos la compresibilidad depende del estado de fase en que se encuentran los lípidos [173, 174, 175] y/o las proporciones lípido/efector [83].

El comportamiento termodinámico de la membrana en presencia de un efector lleva, generalmente, a la temperatura de transición de los lípidos hacia temperaturas más bajas, haciendo a la membrana más fluida (como observamos en las secciones anteriores con el DHA). El estudio de la respuesta de la membrana cuando diversos efectores son incorporados a la misma es de gran relevancia no sólo debido al hecho en sí mismo, sino también por la posibilidad que brinda para cambiar las propiedades de membrana y hacer posible su utilización en biotecnología para el diseño de membranas con funciones específicas como liposomas transportadores de drogas.

Los estudios de velocidad de ultrasonido y densidad de xantonas libres e hidroxiladas los realizamos en función de la temperatura, tanto para vesículas de DPPC como de DMPC dentro de la sub-línea experimental de nuestro grupo. Calculamos el volumen específico y la compresibilidad adiabática específica para las bicapas. Las medidas de densidad son necesarias para evaluar el volumen específico de la membrana y luego determinar la compresibilidad adiabática específica con la ecuación:

$$\frac{\varphi_K}{\beta_0} = -2[u] - \frac{1}{\rho_0} + 2\varphi_v \quad (2.4)$$

donde β_0 representa el coeficiente adiabático de compresibilidad y ρ_0 es la densidad del solvente [176]. El valor φ_K/β_0 representa los cambios en la compresibilidad de volumen de las vesículas con respecto al solvente, $[u]$ es la variación de la concentración y φ_v es el volumen parcial aparente. Los resultados están representados en las [Figura 2.12](#) y [Figura 2.13](#) en función de la temperatura para vesículas con DPPC y xantonas libres e hidroxixantonas. Al observar el gráfico de $[u]$ versus temperatura observamos una característica típica de este tipo de gráficos que es un mínimo en la temperatura de transición de fase principal ([Figura 2.12](#) curva azul). El valor de velocidad del sonido nos muestra una pendiente a la altura de la transición de fase [177, 178, 179]. Para temperaturas menores a la temperatura de transición (41°C para DPPC), el valor de $[u]$ cae lentamente a medida que la temperatura aumenta, por otra parte un aumento en $[u]$ es típico en la región por arriba de T_m . Esta tendencia puede deberse a la disminución del ordenamiento de los lípidos en la bicapa. Esto puede estar relacionado a una mejora en las libertades conformacionales de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos con el aumento de la temperatura [163]. Tanto la forma del gráfico $[u]$ versus T y el mínimo en $[u]$ han sido reportados en trabajos previos de velocidad de ultrasonido en función de la temperatura induciendo el cambio de transición de fase en vesículas suspendidas de PC saturadas [83, 175, 177, 180].

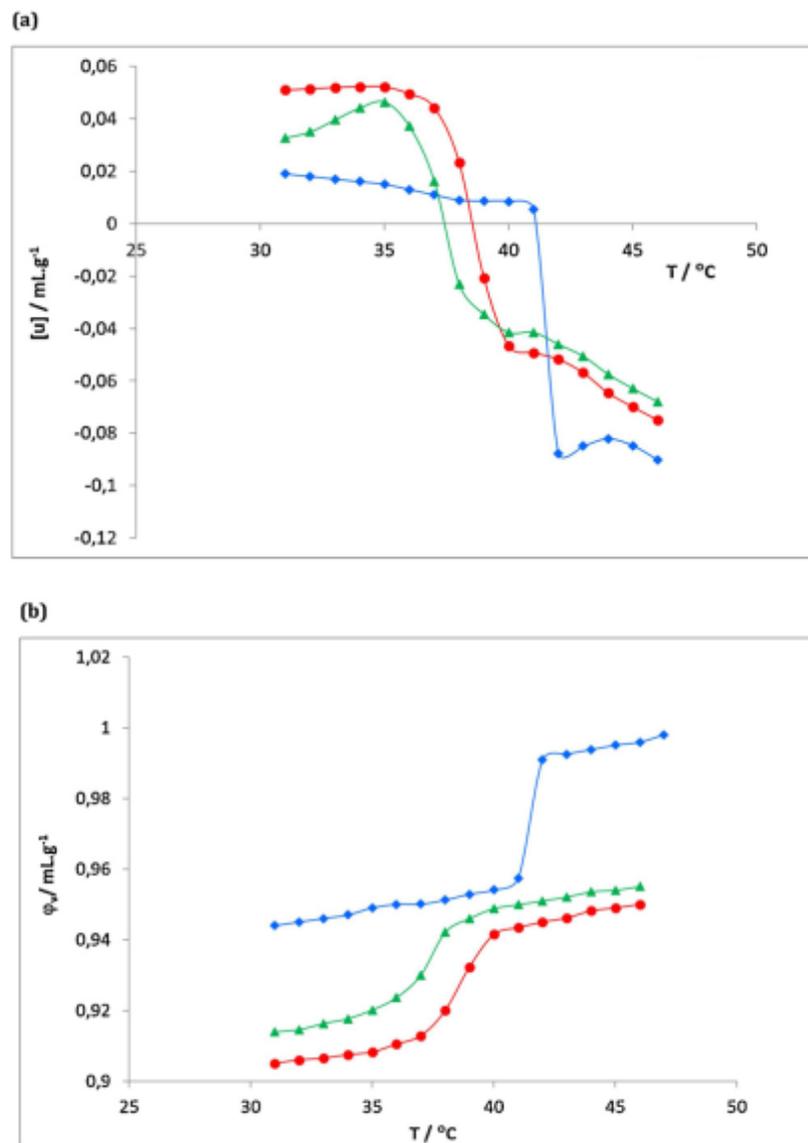


Figura 2.12: Incremento de la concentración de la velocidad del sonido, $[u]$, en (a) y volumen específico, φ_V , en (b) versus la temperatura, para suspensiones acuosas de liposomas de DPPC sin hidroxixantonas (rombos azules), y con una proporción de 0.3 de DPPC- XA_1 (círculos rojos) y DPPC- $\text{XA}_{1,3,6}$ (triángulos verdes). En todos los casos la desviación fue menor al 10%, no introducida en el gráfico para una mejor visualización. Los datos reportados son el promedio de tres grupos de liposomas diferentes.

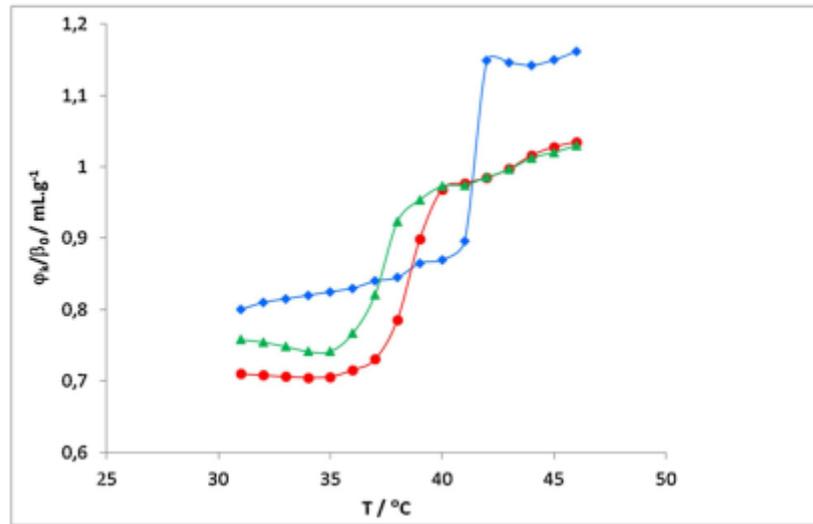


Figura 2.13: Compresibilidad específica adiabática, φ_K/β_0 , versus temperatura para suspensiones acuosas de liposomas de DMPC sin hidroxixantonas (rombos azules), y con una proporción de 0.3 de DPPC- XA_1 (círculos rojos) y DPPC- $XA_{1,3,6}$ (triángulos verdes). En todos los casos la desviación fue menor al 10 %, no introducida en el gráfico para una mejor visualización. Los datos reportados son el promedio de tres grupos de liposomas diferentes.

La presencia de hidroxixantonas influye el valor de membrana $[u]$. En la [Figura 2.12\(a\)](#) podemos apreciar que la pendiente del gráfico $[u]$ versus temperatura desaparece en las membranas de DPPC con hidroxixantonas, a medida que la concentración aumenta, se vuelve más pronunciada en comparación con las bicapas puras de DPPC. Al igual que como ya se ha reportado en membranas de PC con otros efectores [\[163\]](#), la capa de hidratación que rodea a los lípidos y a las xantonas se torna más compresible a medida que la temperatura aumenta. Dado que los cambios en $[u]$ implican cambios en sendas bicapas y en la esfera de hidratación, el análisis de las propiedades mecánicas requiere evaluar cambios en el volumen específico de los liposomas, lo cual se puede lograr a través de la densidad de los liposomas suspendidos [\[163\]](#). Utilizando los valores de densidad y la [Ecuación 2.1](#) determinamos el volumen específico de las vesículas de DPPC y lo graficamos en función de la temperatura [Figura 2.12\(b\)](#). Podemos observar que en general el volumen específico crece en los intervalos de temperatura cercanos a T_m , indicando un incremento en el volumen de las moléculas de fosfolípidos al pasar de la fase gel a la fase líquido

cristalina. El volumen específico de las vesículas con hidroxixantonas resultó ser menor que el de las que contenían solo DPPC a pesar de que todas tienen aproximadamente la misma forma. Esto podría indicarnos que la membrana lipídica es más compacta en las proporciones efector/lípido aquí estudiadas. También observamos que a medida que aumenta el número de grupos hidroxilo en las xantonas, los valores de T_m se vuelven más bajos [Tabla 2.4](#). Estos resultados tienen errores experimentales acordes a estudios previos de nuestro grupo de investigación [\[82\]](#) de potencial zeta con enfriamiento continuo y estudios de DSC.

Tabla 2.4: Temperaturas de transición obtenidas por Potencial Zeta y medidas de densidad mezclas de DPPC-XAs y DMPC-XAs en agua. La información contiene la media \pm SD.

Sistema	$T_m/^\circ C$ (Densitometría)	$T_m/^\circ C$ (Potencial Zeta)
DPPC	41.51 ± 1.20	42.1 ± 0.9
DPPC-XA1	38.60 ± 1.10	39.3 ± 0.8
DPPC-XA1,3,6	37.14 ± 1.00	36.5 ± 1.1
DMPC	23.55 ± 0.70	23.7 ± 0.6
DMPC-XA1	20.91 ± 0.60	21.6 ± 0.5
DMPC-XA1,3,6	18.03 ± 0.40	17.9 ± 0.5

De los valores de $[u]$ y de φ_v calculamos la compresibilidad adiabática específica (φ_K/β_0) en la [Ecuación 2.4](#) en función de la temperatura para vesículas puras y con hidroxixantonas. Para DPPC puro por debajo de T_m , encontramos que a medida que la temperatura aumenta el valor de φ_K/β_0 se incrementa hasta llegar a un máximo en T_m y luego disminuye para temperaturas menores a $T = 41$ °C. Un incremento de la compresibilidad específica con la temperatura para todos los sistemas estudiados es también evidente. El aumento en la compresibilidad específica refleja un mayor desorden en los liposomas debido principalmente al comportamiento de la parte hidrofóbica de la membrana y un aumento en la compresibilidad de las esferas de hidratación a

medida que la temperatura aumenta [163].

En la fase sólido cristalina, las curvas φ_K/β_0 para las membranas de DPPC puras y con hidroxixantonas son diferentes en forma y tamaño. En la fase líquido cristalina los valores de φ_K/β_0 para las vesículas con hidroxixantonas aumenta lentamente. En esta fase, podemos apreciar que si bien las curvas de membranas de DPPC-XAs no difieren de las membranas puras de DPPC, sí presentan diferencias entre si, mientras que en la fase gel el sistema DPPC-XA₁ tiene una compresibilidad menor que el sistema DPPC-XA_{1,3,6}. Esto nos muestra que las hidroxixantonas modifican la estructura de la membrana, específicamente, ambos efectores inducen orden tanto en la fase gel como en la fase fluida. En estudios previos de nuestro grupo [82] se puede apreciar que la fluidez aumenta al pasar de la fase sólido cristalina a la fase líquido cristalina. Sin embargo estos resultados no se contradicen ya que el grado de desorden refleja la anisotropía en el movimiento molecular mientras que la fluidez esta relacionada con el grado de movimiento, por lo que cambios en el orden estructural no significa estrictamente un cambio en la fluidez [65]. En síntesis, los resultados obtenidos revelan que un incremento en la concentración de hidroxixantonas en las vesículas, implican incrementos en la velocidad de ultrasonido [u] y una disminución tanto del volumen específico como de la compresibilidad específica aparente.

El comportamiento del DMPC lo podemos observar en la Figura 2.14(a) donde el gráfico de [u] versus temperatura nos muestra un gráfico típico mientras que el mínimo ubicado en la temperatura de transición desaparece. A diferencia del comportamiento del DPPC, los valores de [u] son similares en las membranas de DMPC con y sin hidroxixantonas. Los gráficos de volumen específico φ_V versus temperatura para los liposomas de DMPC los podemos apreciar en la Figura 2.14 (b), los cuales nos muestran las diferencias en el volumen específico para las vesículas con y sin hidroxixantonas tanto para la fase sólido cristalina como para la fase líquido cristalina. Si bien las formas de estos gráficos son similares, para ambas fases los sistemas que contenían hidroxixantonas dan valores más bajos que los sistemas puros de DPPC.

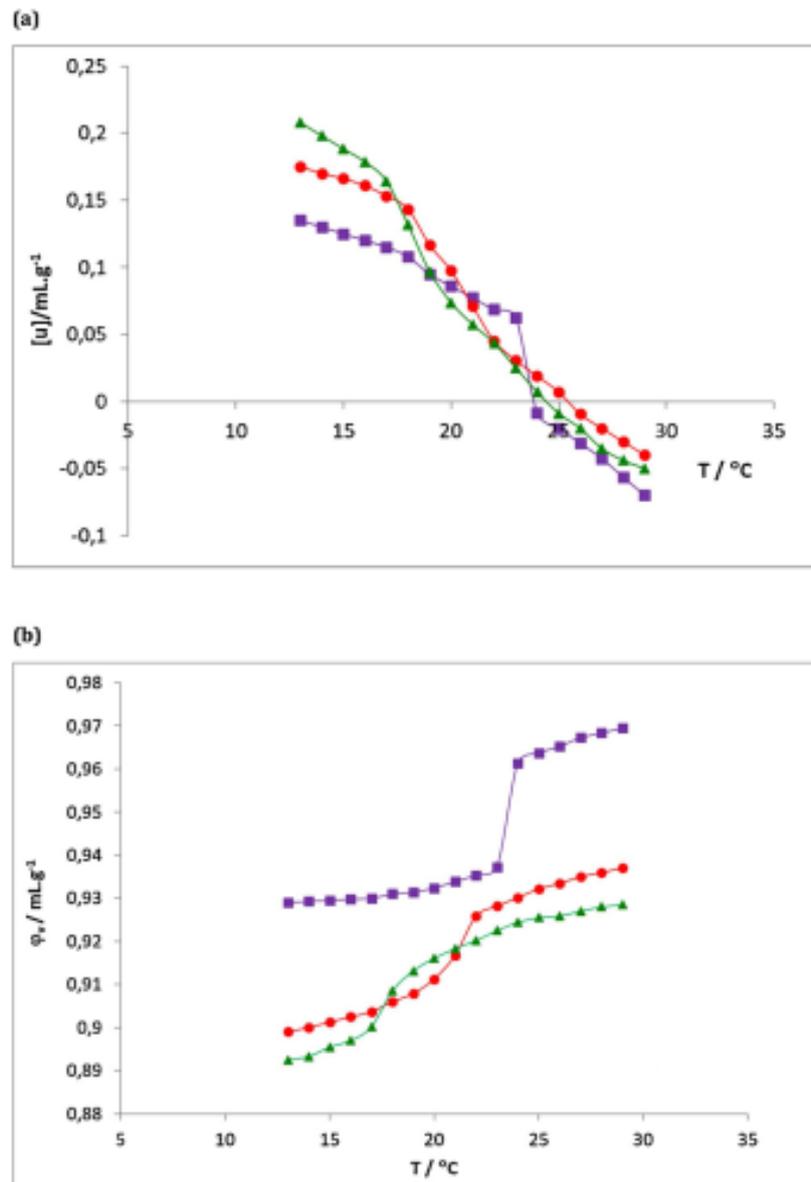


Figura 2.14: Incremento de la concentración de la velocidad del sonido, $[u]$, en a) y volumen específico, φ_V , en b) versus temperatura para las suspensiones acuosas de liposomas de DMPC sin hidroxixantonas (cuadrados violeta), y con una proporción de 0.3 de DMPC-XA₁ (círculos rojos) y DMPC-XA_{1,3,6} (triángulos verdes). En todos los casos la desviación fue menor al 10%, no introducida en el gráfico para una mejor visualización. Los datos reportados son el promedio de tres grupos de liposomas diferentes.

Calculamos también los valores de compresibilidad adiabática específica, φ_K/β_0 , de las vesículas con y sin hidroxixantonas a partir de los valores de φ_V y $[u]$ utilizando la [Ecuación 2.4](#). Estos resultados graficados en función de la temperatura los podemos observar en la [Figura 2.15](#).

En la fase líquido cristalina es evidente que las curvas de DMPC-XAs difieren de las curvas de DPPC pero no muestran diferencias entre si, mientras que en fase sólido cristalina el sistema DMPC-XA_{1,3,6} presenta menos compresibilidad que el sistema DMPC-XA₁. El gráfico de φ_V versus temperatura nos permite obtener el valor de T_m para todos los sistemas estudiados, los cuales confirmamos con medidas de potencial zeta con enfriamiento continuo [144]. Los valores de T_m concuerdan muy bien como podemos apreciar en la [Tabla 2.4](#). Otros parámetros que se derivan del mismo gráfico son: la transición de medio pico, ΔT_m ; el cambio de volumen en dicha temperatura, $\Delta\varphi_V$; y la expansibilidad térmica, α_m de la ecuación $\alpha_m = (\delta V/\delta T)$, a T_m [148]. Estos parámetros los podemos observar en la [Tabla 2.5](#) para DPPC y DMPC con y sin diferentes tipos de hidroxixantonas. Tanto para los sistemas con DPPC como para los sistemas con xantonas, la disminución de la T_m y el ancho de la transición de fase aumenta con la presencia de más grupos hidroxilos en las xantonas. En cambio, observamos el comportamiento opuesto para la expansión térmica lo cual indica una disminución de la cooperatividad en la transición principal en presencia de hidroxixantonas. La temperatura principal de transición disminuye tanto para los liposomas de DPPC como para los de DMPC. Para DMPC las xantonas polihidroxiladas tienen un efecto más pronunciado en la temperatura de transición. La disminución de la cooperatividad en los cambios estructurales en la membrana lipídica durante la temperatura de transición principal de los fosfolípidos en la membrana en presencia de hidroxixantonas también la vemos reflejada en valores más altos de $\delta\varphi_V$ y α_m en comparación con los liposomas puros. El valor de α_m para los sistemas puros de DMPC y DPPC coinciden muy bien con los resultados citados anteriormente [148].

Tabla 2.5: Valores de Temperaturas de transición principal, T_m , transition half-width, ΔT_m , cambios de volumen, $\Delta\varphi_v$, y la expansibilidad térmica, α_m , a la temperatura de transición principal para mezclas de DPPC-XAs y DMPC-XAs en agua.

Sistema	$T_m/^\circ C$	$\Delta T_m/^\circ C$	$\Delta\varphi_v 10^5/\text{mL.g}^{-1}$	$\alpha_m 10^5/\text{mL.g}^{-1}$
DMPC	23.55	0.45	3400	7500
DMPC-XA ₁	20.91	1.61	3070	1900
DMPC-XA _{1,3,6}	18.03	2.26	3000	1300
DPPC	41.51	0.51	4320	8500
DPPC-XA ₁	38.60	1.11	3750	3400
DPPC-XA _{1,3,6}	37.14	1.42	3700	2600

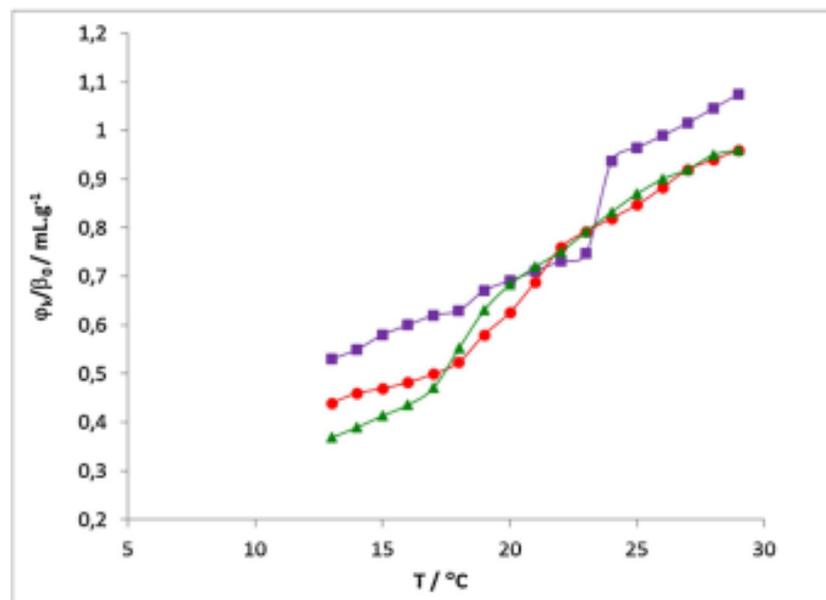


Figura 2.15: Compresibilidad específica adiabática, φ_K/β_0 , versus temperatura para suspensiones acuosas de liposomas de DMPC sin hidroxixantonas (cuadrados violeta), y con una proporción de 0.3 de DMPC-XA₁ (círculos rojos) y DMPC-XA_{1,3,6} (triángulos verdes). En todos los casos la desviación fue menor al 10 %, no introducida en el gráfico para una mejor visualización. Los datos reportados son el promedio de tres grupos de liposomas diferentes.

El modulo de compresibilidad isotérmica K_A lo obtuvimos por simulaciones de dinámica molecular a través de la siguiente ecuación [137]:

$$K_A = \frac{2K_B T \langle A_L \rangle}{n_{lipid} \sigma_A^2} \quad (2.5)$$

donde K_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura de simulación, $\langle A_L \rangle$ el área por lípido media, σ_A^2 es la varianza del área por lípido y n_{lipid} es el número de lípidos en la membrana. El área por lípido se calcula como una propiedad de la membrana en su conjunto. Representa el área promedio que un solo fosfolípido ocupa en la interfase (sin considerar la presencia o ausencia de un efector) calculada como: Área por lípido = (dimensión de la caja en X) * (dimensión de la caja en Y) / (número de lípidos por monocapa). Para poder estudiar la fluidez de los lípidos de la membrana y su respuesta frente a la presencia de las xantonas en la bicapa, calculamos el MSD de la misma forma que en las secciones anteriores con la [Ecuación 2.2](#).

Para correlacionar los resultados experimentales sobre compresibilidad y fluidez en los sistemas estudiados, realizamos simulaciones de dinámica molecular. El modulo de compresibilidad no presenta variaciones significativas al comparar el sistema puro de DMPC con los sistemas mixtos. En el caso de DPPC, encontramos que ambas xantonas produjeron un aumento significativo de K_A , lo que implica que las membranas conteniendo xantonas son menos compresibles que la membrana pura. Es así, que la $XA_{1,3,6}$ en la fase líquido cristalina incrementa el modulo de compresibilidad en un 27% en el caso de DPPC mientras que en el DMPC aumenta un 4%. Estos resultados están en concordancia con los experimentales sólo de forma cualitativa. Esto se debe a que el cálculo del modulo de compresibilidad es dependiente del tamaño de la membrana y sólo se puede incluir un número finito de lípidos en la simulación [181], por lo que este método no pretende reproducir los valores experimentales en términos absolutos, pero es útil para poder visualizar tendencias cualitativas y comportamientos relativos.

Para calcular el modulo de compresibilidad, obtuvimos el área por lípido de las membranas puras y membranas mixtas. El valor del área por lípido constituye un indicador de como la presencia de las xantonas afectan parcialmente el volumen específico de las membranas puras

sobre T_m . Como mostramos en la [Tabla 2.6](#), tanto las membranas de DPPC y DMPC en la presencia de xantonas reducen el área por lípido un 10 y un 15%, respectivamente, en comparación con la membrana pura. Esto significa que la presencia de xantonas hace a las membranas más compactas comparadas con su membrana pura. Estos resultados muestran una tendencia similar a los cambios de volumen obtenidos experimentalmente en la temperatura de transición en la [Tabla 2.5](#).

Tabla 2.6: Área por lípido para mezclas de DPPC-XAs y DMPC-XAs en agua.

Sistema	Área por lípido / Å^2
DPPC (T = 323 K)	61.5
DPPC-XA ₁ (T = 323 K)	52.3
DPPC-XA _{1,3,6} (T = 323 K)	53.1
DMPC (T = 303 K)	60.4
DMPC-XA ₁ (T = 303 K)	52.6
DMPC-XA _{1,3,6} (T = 303 K)	50.9

Para estudiar la fluidez de la membrana lipídica y su respuesta a la presencia de xantonas, calculamos el desplazamiento cuadrático medio en dos dimensiones (2D-MSD). En la [Figura 2.16](#) mostramos que las membranas que contenían xantonas (tanto la XA₁ como XA_{1,3,6}) registraron un aumento en el valor del MSD al compararlo con las membranas puras de DPPC a T=323 K. Este comportamiento nos indica que la presencia de este tipo de efectores tiende a fluidificar la membrana, especialmente XA_{1,3,6}, el cual induce un incremento en el MSD con respecto a la membrana pura de DPPC, más grande que la que produce la XA₁. Para ilustrar, se muestra solamente las curvas de DPPC ya que los sistemas con DMPC muestran el mismo comportamiento.

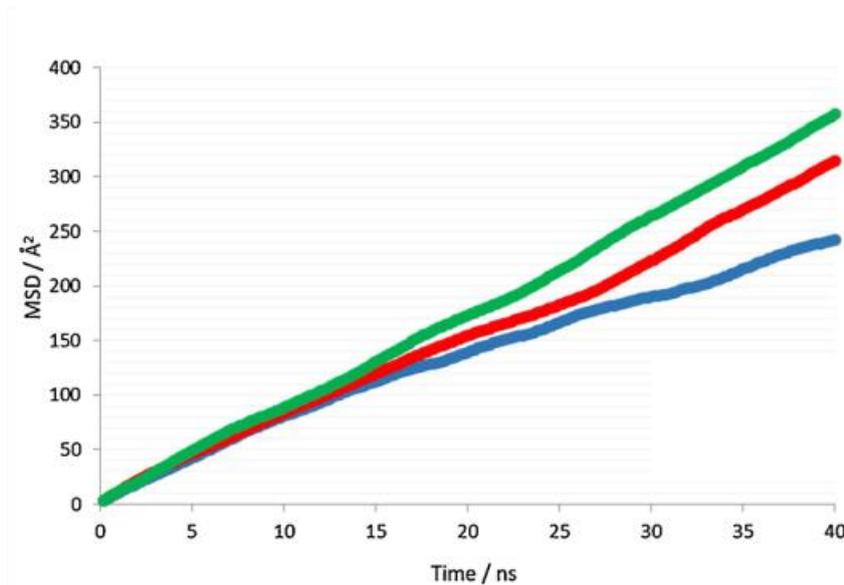


Figura 2.16: Desplazamiento cuadrático medio en dos dimensiones en función del tiempo para las membranas puras de DPPC (azul), DPPC con xantonas XA₁ (rojo) y DPPC con xantonas XA_{1,3,6} (verde) a T = 323 K.

Para determinar la posible ubicación de ambas xantonas en las bicapas de DMPC y DPPC, en la [Figura 2.17](#) mostramos los perfiles de densidad para átomos representativos de ciertos grupos funcionales. Esta figura nos muestra los perfiles de densidad para los grupos fosfato y carbonilo de DPPC, el agua y el centro de masa de las xantonas, para cada temperatura. En la [Figura 2.18](#) mostramos la misma situación pero para el caso de DMPC, donde las xantonas XA₁ y XA_{1,3,6} se posicionan por debajo de los grupos carbonilos en ambas temperaturas. En el caso del DPPC los resultados son similares para XA₁, mientras que para XA_{1,3,6} se ubica en la región entre carbonilos y fosfatos para ambas fases donde son capaces de interactuar con los grupos polares de DPPC (fosfatos y carbonilos) por medio de grupos hidroxilos. Esta situación difiere con el caso de las membranas de DMPC. La posición de XA₁ en la membrana de DPPC es un poco diferente a la reportada en el trabajo anterior de nuestro grupo [[182](#)] ya que ahora las xantonas alcanzan un lugar más profundo en las cadenas lipídicas (cerca de los carbonilos). Esto podría deberse a que la concentración de xantonas en este trabajo llega a 18 xantonas en cada capa de la membrana, lo cual duplica la concentración del trabajo anterior, por lo que en este trabajo las xantonas están mucho más cerca unas con otras pudiendo así inducir un efecto

más fuerte sobre el entorno de las cadenas lipídicas. A su vez, en las simulaciones empleamos paquetes de Amber y campos de fuerza diferentes. En la publicación anterior utilizamos la versión del paquete de simulación fue el Amber12 y el campo de fuerza fue el Lipid11, mientras que ahora utilizamos el paquete de simulación Amber16 y el campo de fuerza Lipid17. Esta diferencia podría llevar a cambios pequeños en las posiciones de equilibrio de las xantonas en las membranas lipídicas. En la [Figura 2.19](#) ilustramos la situación recién mencionada mientras que en la [Figura 2.20](#) podemos observar la membrana de DPPC completa (sin las moléculas de agua para una mejor visualización) con las xantonas $XA_{1,3,6}$ (a) y XA_1 (b).

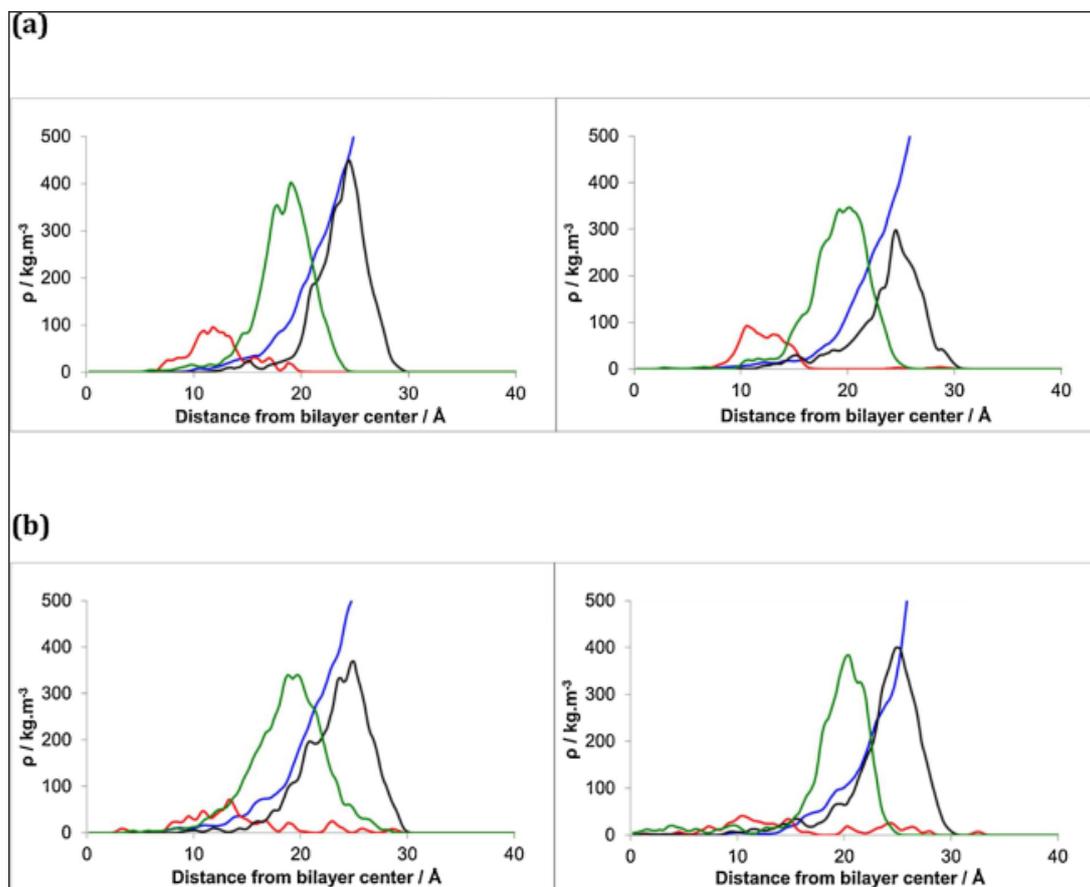


Figura 2.17: Perfil de densidad a lo largo del eje Z para agua (línea azul), grupos carbonilo del DPPC (línea verde), grupos fosfato del DPPC (línea negra) y xantonas (línea roja). En (a) para DPPC- XA_1 para $T = 293$ K (izquierda) y DPPC- XA_1 a $T = 323$ K (derecha), y en (b) para DPPC- $XA_{1,3,6}$ a $T = 293$ K (izquierda) y DPPC- $XA_{1,3,6}$ a $T = 323$ K (derecha).

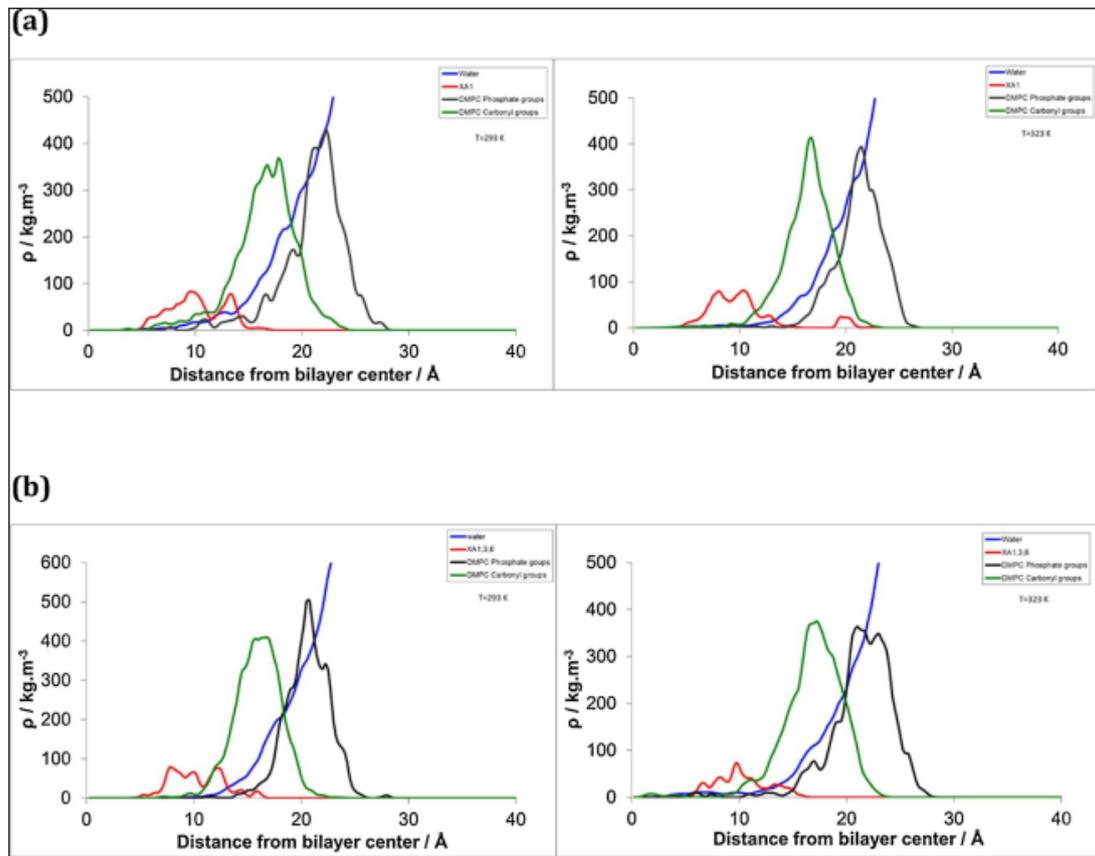


Figura 2.18: Perfil de densidad a lo largo del eje Z para agua (línea azul), grupos carbonilo del DMPC (línea verde), grupos fosfato del DMPC (línea negra) y xantonas (línea roja). En (a) para DMPC-XA₁ a T = 293 K (izquierda) y DMPC-XA₁ a T = 323 K (derecha), y en (b) para DMPC-XA_{1,3,6} a T = 293 K (izquierda) y DMPC-XA_{1,3,6} a T = 323 K (derecha).

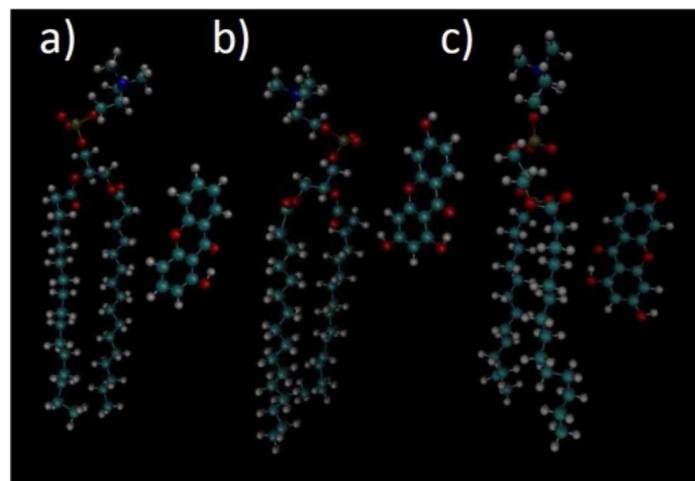


Figura 2.19: Ejemplos típicos de posicionamiento de las xantonas con respecto a los lípidos en diferentes sistemas. En (a) DPPC-XA₁, en (b) DPPC-XA_{1,3,6}, y en (c) DMPC-XA_{1,3,6}.

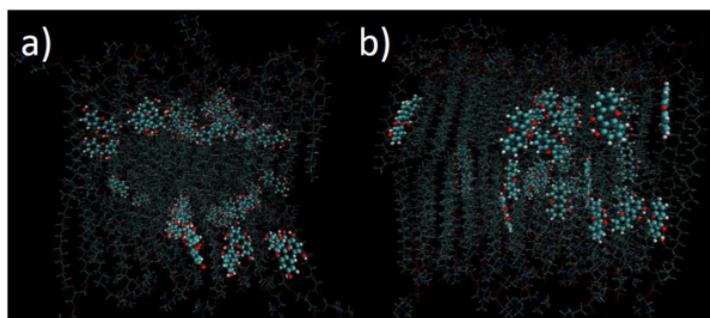


Figura 2.20: Membrana de DPPC-XA_{1,3,6} en (a) y DPPC-XA₁ en (b) en la fase líquido cristalina 15 ns de simulación después de haber llegado al equilibrio. Las moléculas de agua no figuran para lograr una mejor visualización.

Recapitulando todo lo anterior, el objetivo principal de este capítulo es estudiar las propiedades estructurales de los sistemas DPPC-XAs y DMPC-XAs en función de la temperatura y poder determinar la relación entre compresibilidad y fluidez a través del análisis de la respuesta termodinámica y mecánica de estos sistemas. Las membranas se diferencian entre sí en su espesor y en presencia de xantonas que difieren en el número de grupos hidroxilos. Las propiedades termodinámicas de las vesículas de DPPC y DMPC con hidroxixantonas obtenidas por estudios de volumen específico, son similares a las obtenidas por estudios de potencial zeta dependientes de la temperatura. Con estas técnicas observamos una disminución en la temperatura de transición y un aumento en el espesor de la fase de transición. La disminución de la temperatura de transición, así como la disminución de la cooperatividad de la fase de transición gel a líquido cristalino se han considerado como un resultado de la presencia de efectores en la membrana lipídica, que actúa como ciertas impurezas [150]. XA_{1,3,6} es la xantona que más disminuye la temperatura de transición de cada lípido, siendo este efecto un poco mayor para el caso del DMPC. Estas consideraciones sobre fluidez fueron corroboradas por los resultados de MSD obtenidos por dinámica molecular. Las diferencias entre los efectores en la fluidez de membrana pueden ser atribuidos no sólo al volumen del efector sino también a su localización en la membrana, como se observa en los resultados en silicio. Estos últimos también muestran que el sistema de DPPC-XA_{1,3,6} el efector tiene la posibilidad de distribuirse entre

las zonas hidrofílicas e hidrofóbicas, por lo que su presencia es menos disruptiva para la zona hidrofóbica en relación con el sistema DMPC-XA_{1,3,6}.

Tanto el DPPC como el DMPC nos muestran un comportamiento similar en el volumen aparente en presencia y en ausencia de efectores. Esto significa que los sistemas con hidroxixantonas tienen valores más bajos con respecto a los sistemas de lípidos puros debido a la existencia de restricciones adicionales que estas imponen a las fluctuaciones de volumen de los fosfolípidos. Los números de velocidad del sonido fueron más altos para los sistemas de DPPC con hidroxixantonas con respecto a los sistemas de DPPC solamente. Esta diferencia es menos pronunciada al comparar los sistemas con DMPC con hidroxixantonas con respecto a los sistemas puros de DMPC. A partir del incremento en la velocidad del sonido $[u]$ y el volumen específico de los fosfolípidos, φ_V , calculamos la compresibilidad adiabática específica, φ_K/β_0 , un factor que constituye una propiedad mecánica de las membranas. Este factor macroscópico es de vital importancia a la hora de evaluar las magnitudes de la influencia de las xantonas en las membranas lipídicas ya que modifica las propiedades físicas de las mismas. De [Figura 2.13](#) y [Figura 2.15](#) podemos observar que la respuesta de las membranas mixtas es diferente con respecto a las membranas puras. Las diferencias en compresibilidad entre las membranas puras y mixtas son levemente más evidentes para el caso de DPPC, sobre todo en fase fluida. Además, las curvas de DPPC poseen la misma forma para las membranas mixtas como para las membranas puras, mientras que para el DMPC la forma de las membranas mixtas es más suave que para el sistema puro de DMPC. La disminución de la compresibilidad específica nos muestra una reducción del desorden en los liposomas, principalmente en la parte hidrofóbica de las bicapas lipídicas [163].

El comportamiento de la compresibilidad de la membrana para los sistemas mixtos con ambos efectores es similar en la fase líquido cristalina, pero no en la fase sólido cristalina. Para el sistema de DPPC-XA, la xantona que más compacta la membrana es la XA₁, mientras que para los sistemas DMPC-XA es la XA_{1,3,6}. Estos resultados coinciden muy bien con los obtenidos para el volumen específico y con el módulo de compresibilidad obtenido en dinámica molecular.

Las diferencias entre ambos lípidos en términos de empaquetamiento de la membrana pueden

explicarse a través de los resultados de posición de las xantonas en las bicapas simuladas por dinámica molecular. Estos resultados nos indican que para las xantonas monohidroxiladas su ubicación no depende del tipo de membrana, ya que tanto para DPPC como para DMPC la xantona siempre se encuentra ubicada debajo de la línea de los carbonilos. Esto quiere decir que se encuentran, básicamente, entre la parte polar y la parte no polar de los lípidos, tanto en la fase líquido cristalina como en la fase sólido cristalina. Las xantonas polihidroxiladas presentan un comportamiento diferente ya que su ubicación varía dependiendo el tipo de lípido. Para DMPC la ubicación de preferencia es debajo de los carbonilos para ambas fases, un efecto similar al observado para la xantona monohidroxilada con DMPC. Para el sistema DPPC-XA_{1,3,6} el efector tiene una localización más heterogénea, oscilando entre la zona hidrofóbica debajo de los carbonilos y la región superficial de los grupos polares. Esta diferencia en la ubicación de la xantona polihidroxilada en la membrana de DPPC con respecto a la de DMPC puede estar atribuida a la diferente ubicación de los grupos polares en las membranas lipídicas [143]. Sin embargo, en cuanto a compresibilidad, es notable que ambas xantonas (mono y poliinsaturadas) presentan un comportamiento similar tanto en la membrana de DPPC como en la de DMPC incluso cuando se posicionan en diferentes regiones en cada membrana. Esto nos permite concluir que la ubicación de la xantona en la membrana no es un factor determinante para los comportamientos mecánicos observados en sendas membranas lipídicas.

Dado que la xantona tiene una geometría estructural plana es posible que su incorporación en la membrana produzca un empaquetamiento eficiente incrementando la compactación y disminuyendo la compresibilidad. De todas formas, la intercalación de las xantonas entre las cadenas lipídicas alteran las interacciones laterales entre cadenas (interfiriendo o incluso rompiendo las interacciones metileno-metileno entre las colas de cadenas hidrocarbonadas vecinas) mejorando así la fluidez de membrana. Este “desorden” está más relacionado a nivel de interacciones que a nivel estructural. Resultados similares en torno a la fluidez y a la compresibilidad fueron encontrados en [150] donde trabajaron con otros derivados de xantonas. En ese trabajo los autores dicen que el Mangostan (1,3,6-trihidroxi-7- metoxi-2,8-bis-(3-metil-

2-butenil)-9-xantenona) se solubiliza en bicapas de DPPC y disminuye la fluidez de los grupos acilos e incrementa la microviscosidad, debida al alto empaquetamiento de los lípidos. A esta altura, es importante resaltar como hizo [65], que el grado de orden es una medida de la anisotropía en la movilidad molecular mientras que, estrictamente hablando, la fluidez esta relacionada con la razón de movimiento. Por lo que un aumento o disminución en el ordenamiento estructural no significa a priori una correlación con el aumento o disminución de la fluidez como generalmente esperamos, siendo estos resultados similares obtuvimos en el estudio del DHA como describimos en la [Sección 2.2](#).

Capítulo 3

Agua de hidratación de membranas lipídicas modelo

En lo que concierne al agua de hidratación de membranas en este capítulo abordaremos, en una primera instancia, un caso específico sobre el estudio de lípidos de distinta naturaleza química con y sin colesterol, el mismo resulta de interés dado que contamos con excelente información experimental de un nuestro grupo colaborador dirigido por el Prof. Aníbal Disalvo en la Universidad Nacional de Santiago del Estero ([Sección 1.3](#)). Luego, en una segunda instancia, estudiaremos los efectos del DHA sobre la hidratación en membranas de DPPC-Chol. Para tal fin partimos de una base teórica sólida, ya que hay evidencia de la influencia del Chol en el agua de hidratación de membranas de DPPC [122]. Por su parte pensamos que la labilización del agua de hidratación de membranas inducida por el colesterol podría tener implicaciones importantes en términos de la reactividad local de la membrana, por ejemplo en la unión de péptidos beta amiloides, una cuestión de mucho interés en el contexto de la EA [121]. Por último, daremos los primeros pasos hacia una caracterización más general del agua de hidratación. Dado que para ello veremos que los índices de estructura de agua existentes no resultan aplicables en este contexto, será necesario desarrollar un nuevo índice que caracterice la estructura del agua. Esta tarea, tan demandante, será el mayor objetivo de esta parte del trabajo de tesis. El índice que desarrollaremos será aplicado de manera preliminar en la determinación de la extensión

espacial de la capa de hidratación de membranas, pero su adaptación a contextos específicos y a la caracterización de los distintos “tipos de agua” correspondientes a los diferentes lípidos, cuestión que también resulta sumamente demandante, quedará como una tarea ulterior.

3.1. Estudios de casos específicos de hidratación de membranas

3.1.1. Estudio del efecto de la naturaleza de los lípidos sobre el agua de hidratación de membranas que contienen colesterol

En esta sección mostraremos por medio de espectroscopía de fluorescencia y simulaciones de dinámica molecular que el colesterol reduce el agua en las cadenas lipídicas de los lípidos con grupos éter. Esto lo podemos apreciar si observamos las diferencias en los patrones de distribución entre las moléculas de agua fuerte y débilmente unidas. Estas distribuciones fueron realizadas por espectroscopía de emisión y polarización generalizada de la sonda 6-lauroil-2-dimetilamino naftaleno (Laurdan) insertada en membranas lipídicas de DMPC y de 1,2-di-O-tetradecil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (14:0 Dieter PC) por el grupo del Prof. Aníbal Disalvo en la Universidad Nacional de Santiago del Estero. Las simulaciones de dinámica molecular indican que la acción del colesterol podría ser diferentes en éter PC en comparación con ester PC. Como veremos luego, el colesterol pareciera actuar *per se* como un centro de hidratación adicional en las membranas compuestas por lípidos éter PC. Tanto para la fase líquido cristalina como para la fase sólido cristalina en vesículas de DMPC y de 14:0 Dieter PC, cambian las distribuciones de las moléculas de agua disminuyendo la relajación dipolar de la interface lipídica generando un aumento en la población no relajable. Concentraciones de 10% en las membranas de 14:0 Dieter PC poseen un entorno alrededor de las moléculas de Laurdan similar a las que poseen los sistemas lipídicos con ester PC.

En la [Figura 3.1](#) podemos observar los cambios en el ancho total a medio máximo (*Full Width at Half-Maximum*, FWHM, el cual resulta sensible a la presencia de distintas poblaciones de moléculas de agua en cuanto a su relajación) obtenidos por los espectros de emisión de Laurdan normalizados para DMPC y 14:0 Dieter PC. En la parte A mostramos el FWHM para

concentraciones crecientes de Chol a temperaturas por debajo de la T_m y en la parte B por arriba de la T_m . En el caso de 14:0 Dieter PC por debajo de T_m , los valores de FWHM disminuyen significativamente a una concentración de 10% de Chol y aumenta de la misma forma para temperaturas por encima de T_m . Estas discontinuidades no están presentes en los sistemas de DMPC/Chol en ninguno de los 2 estados.

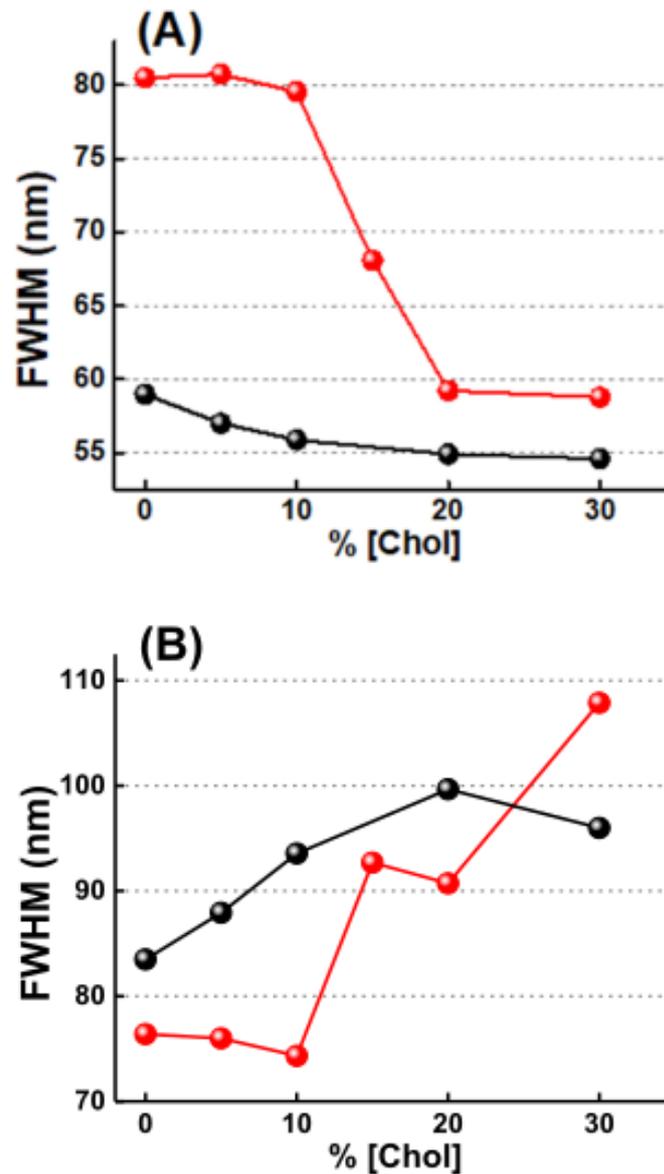


Figura 3.1: FWHM versus % Chol para temperaturas por debajo de T_m (A) y por encima T_m (B), para 14:0 Dieter PC (círculos rojos) y DMPC (círculos negros).

Los estudios de la función GP_{ex} nos permiten analizar los efectos del Chol en la relajación dipolar de los ester y éter PC. Esta función la calculamos como:

$$GP_{ex} = \frac{I_{440} - I_{480}}{I_{440} + I_{480}} \quad (3.1)$$

adaptada de Parasassi et al. [118, 183, 184, 185], donde I_{440} y I_{480} corresponden al máximo de emisión del Laurdan por debajo y por encima de T_m respectivamente. La gran diferencia que observamos en FWHM entre el DMPC y el 14:0 Dieter PC por debajo de T_m es notable también al ver el comportamiento de GP_{ex} en la Figura 3.2.

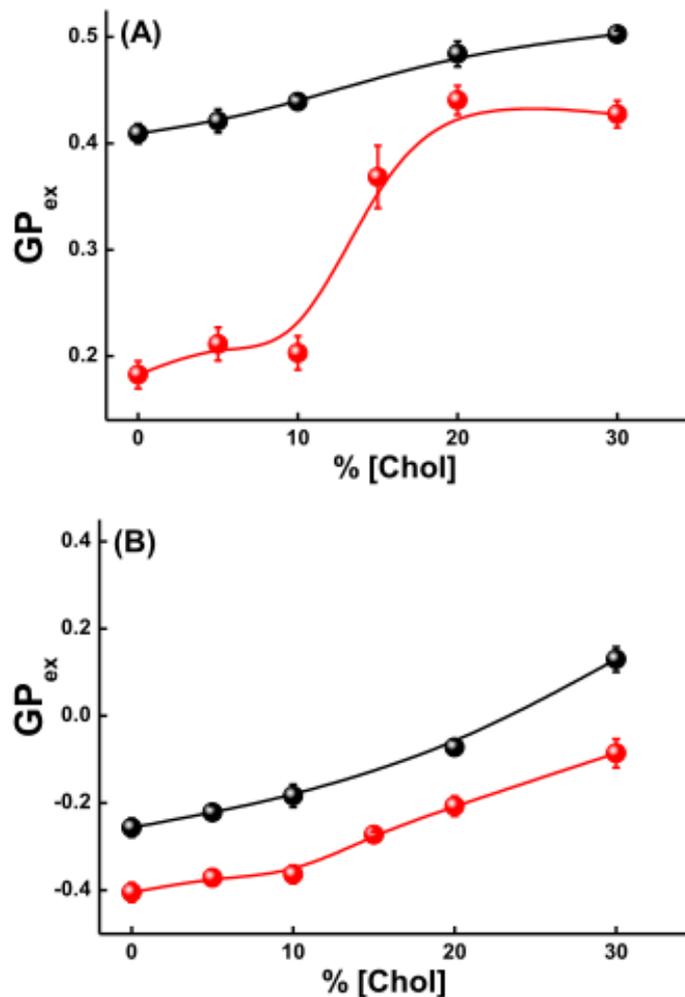


Figura 3.2: GP_{ex} versus concentración de Chol para temperaturas por debajo de T_m (A) y por encima T_m (B), para 14:0 Dieter PC (círculos rojos) y DMPC (círculos negros).

La parte A nos muestra que los valores de GP_{ex} para DMPC son mucho más altos que para 14:0 Dieter PC por debajo de T_m y 10% de Chol. A esta concentración observamos un cambio abrupto que no está presente en DMPC. Para temperaturas por encima de T_m estos

cambios no los observamos en DMPC ni en 14:0 Dieter PC, como observamos en la parte B de la [Figura 3.2](#). Como ya ha sido reportado, el espectro de emisión de Laurdan es la superposición de los estados de emisión relajados y no relajados. Estos estados de emisión se pueden obtener por la descomposición de la emisión fluorescente del Laurdan a través de Log-Normal (LN) [[186](#), [187](#)]. Estos estados de emisión son una medida indirecta de la población de moléculas de agua con diferentes grados de libertad rotacional rodeando al Laurdan [[116](#), [186](#)]. La contribución de esta población fueron analizadas en función de la concentración de Chol en sistemas de DMPC y de 14:0 Dieter PC por encima y por debajo de la T_m utilizando el procedimiento reportado por Bacalum et al. [[186](#)] y graficadas en la [Figura 3.3](#) y en la [Figura 3.4](#).

La [Figura 3.3](#) muestra los cambios en la población de las distribución relajables y no relajables para DMPC por debajo de la T_m sin Chol (A) y con 20 % Chol (B). En el primer caso, hay un pequeña contribución de la población relajable pero que tiende a desaparecer al incorporar Chol (B). Para el DMPC la población no relajable representa el 78 % de la emisión total mientras que la población relajable representa el 22 %. En presencia de un 20 % de Chol la población no relajable aumenta hasta el 100 % y la población relajable disminuye al 0 %. En la [Figura 3.4](#) están representadas las poblaciones relajables y no relajables para el 14:0 Dieter PC por debajo de T_m . Para el 14:0 Dieter PC (A) la relación relajable/no relajable es superior en los lípidos con éter PC y disminuye muy notoriamente en presencia de Chol (B). Esta relación es mucho mayor en el sistema 14:0 Dieter PC/Chol comparado con DMPC/Chol [Figura 3.3](#). Para 14:0 Dieter PC la contribución de la población no relajable disminuye un 15 % siendo correspondido por un aumento en la población relajante. En presencia de un 20 % de Chol, el 14:0 Dieter PC reestablece la contribución a los niveles similares al DMPC, 79 % no relajable y 21 % relajable.

En la [Figura 3.5](#) mostramos los cambios en las poblaciones relajables y no relajables para los sistemas de DMPC y de 14:0 Dieter PC para temperaturas por debajo (A) y por arriba (B) de T_m para concentraciones crecientes de Chol. Por debajo de T_m (A) la población no relajable de moléculas de agua en DMPC se incrementa de manera continua a medida que aumenta la concentración de Chol hasta que se satura al llegar al 10 %. Para el 14:0 Dieter PC observamos

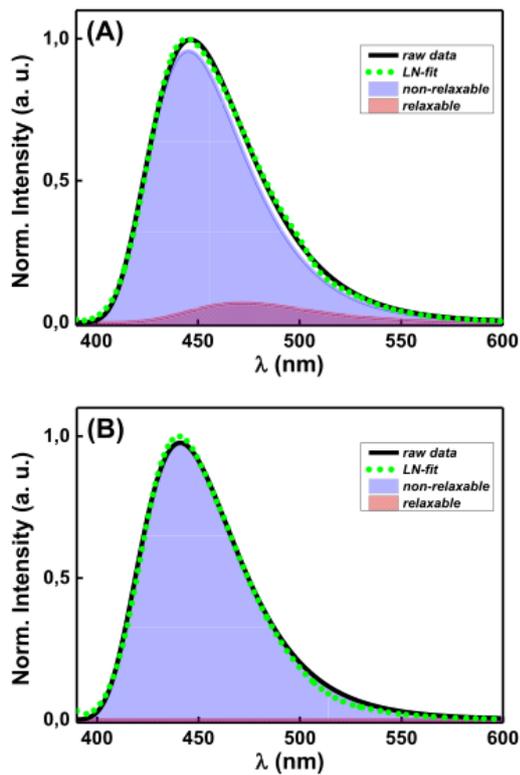


Figura 3.3: Deconvolución del espectro del Laurdan por debajo de T_m para DMPC (A) y para DMPC/20% Chol (B).

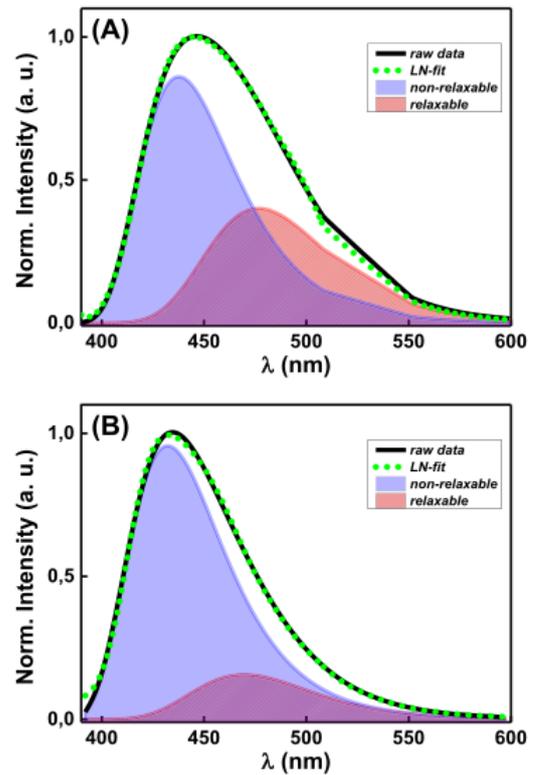


Figura 3.4: Deconvolución del espectro del Laurdan por debajo de T_m para 14:0 Dieter PC (A) y para 14:0 Dieter PC/20% Chol (B).

un leve aumento en la población no relajable a una concentración de 5% de Chol. Luego se produce un aumento más intenso entre un 10 y un 20% de Chol. Este último aumento ocurre a una concentración donde también observamos discontinuidades en las figuras de FWHM y GP_{ex} , por lo que queda de manifiesto que para temperaturas por debajo de la T_m las diferencias entre los 2 sistemas de lípidos son evidentes. Para temperaturas por encima de T_m (B) el Chol produce la misma disminución de la población de agua relajable tanto para DMPC como para 14:0 Dieter PC.

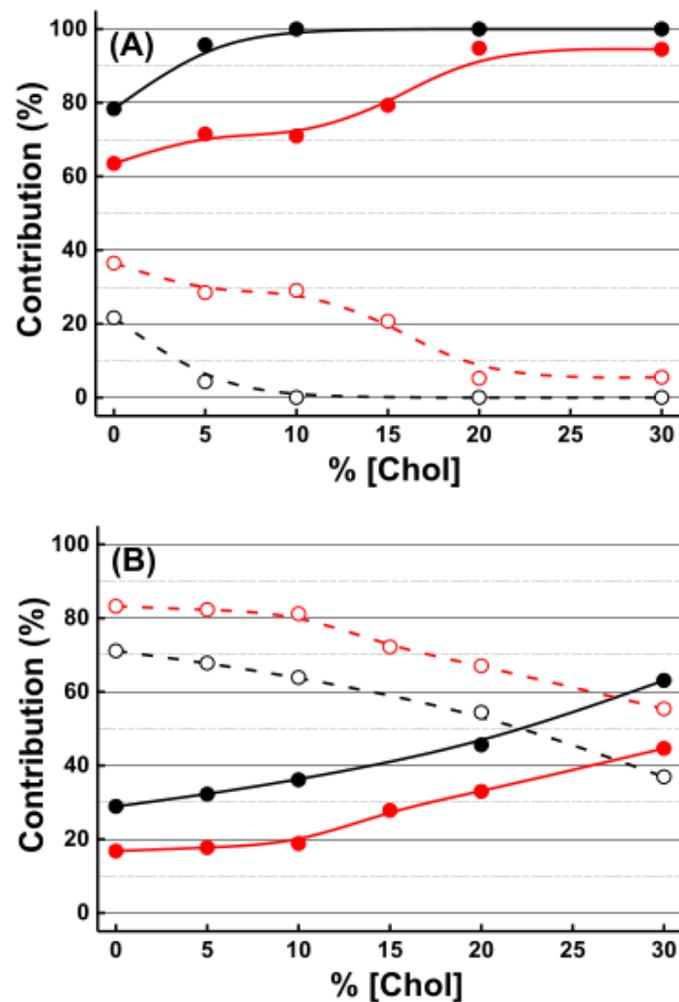


Figura 3.5: Contribución porcentual (%) de las poblaciones relajables y no relajables en función de la concentración de Chol para DMPC y 14:0 Dieter PC por debajo (A) y por encima (B) de T_m . Los círculos llenos corresponden a las poblaciones no relajables de DMPC (en negro) y de 14:0 Dieter PC (en rojo). Los símbolos vacíos corresponden a las poblaciones relajables de DMPC (en negro) y de 14:0 Dieter PC (en rojo).

El aumento de la población de agua no relajable en presencia del Chol junto con la disminución de la población de agua relajable nos indica que el Chol afecta los grados de libertad de las moléculas de agua de diferente manera en membranas de DMPC y 14:0 Dieter PC. Para profundizar en el estudio de las diferentes distribuciones de las “clases” de agua según el número de puentes de hidrógeno que forman con su entorno, realizamos simulaciones de dinámica molecular.

En la [Figura 3.6](#) mostramos el índice que clasifica las moléculas de agua según si forman enlaces por puente de hidrógeno agua-agua, agua-PO (agua-fosfato) y agua-CO (agua-carbonilo) por encima y por debajo de T_m . En los paneles A, B y C para los sistemas de DMPC y 14:0 Dieter PC sin Chol y en los paneles D, E y F en presencia de Chol. Este análisis fue restringido de forma tal de resaltar en el análisis los cambios en la zona por debajo de los grupos fosfatos; mostrando en los paneles A y D la zona entre los grupos POs y COs, en los paneles B y E la zona de los COs propiamente dicha y en los paneles C y F las cadenas alquílicas debajo de los COs.

El índice WPC representa el número de enlaces de puente hidrógeno (HBs) que las moléculas de agua forman con otras moléculas de agua (W), con los grupos POs (P) y con los grupos COs (C) [188]. Así pues, por ejemplo 201 significa que en una molécula de agua hay presentes 2 HBs con otras moléculas de agua, ningún HB con los POs y un HB con los COs. Este índice fue realizado considerando todas las moléculas de agua a una distancia menor a 4.5 Å de los átomos pesados de los lípidos y calculando el número de HBs con otras moléculas de agua y con los grupos POs y COs, donde debemos considerar que dos moléculas de agua forman un HB cuando la distancia O–O es menor a 3.5 Å y el ángulo O–H \cdots O es mayor a 140 °.

Tanto para el sistema de DMPC como para el de 14:0 Dieter PC no hay cambios significativos en el índice WPC para las regiones entre COs y POs, ni para los COs propiamente dichos, ya sea por debajo o por encima de la T_m (paneles A y B). El panorama es muy diferente para ambos lípidos, ya sea por debajo o por encima de T_m , en la zona que se encuentra entre los COs y las cadenas alquílicas. Aquí observamos un aumento en el WPC = 000 correspondiente a

ningún enlace HB formado, coincidiendo con un aumento de los isómeros rotacionales formando bolsillos de agua que aparecen en la transición de fase [108]. Esto mismo observamos para la población $WPC = 100$ (panel C).

Al comparar el sistema de DMPC con el de 14:0 Dieter PC en la misma fase observamos que la ausencia de grupos COs aumenta la población de $WPC = 000$. Esto coincide muy bien con la interpretación que el reemplazo de un grupo ester por un éter es equivalente a un leve incremento en el largo de la cadena alquílica produciendo el mismo aumento en los isómeros rotaciones como en la transición de fase [115]. También podemos apreciar que para el sistema de 14:0 Dieter PC, en la tres regiones, hay más moléculas de agua sin HBs (000) y con un solo HB (100). En el sistema de DMPC las moléculas de agua forman más HBs con otras moléculas de agua o con COs. El incremento en la población de 200 y 300 en estas membranas nos señala que las asociaciones agua-agua en estos lípidos aumenta en comparación con los éter PC. Esto mismo ocurre para temperaturas por encima de T_m .

La presencia de Chol en ambas membranas modifica la distribución de los puentes de hidrógeno de las moléculas de agua en comparación con las membranas puras. Esto lo podemos ver en la disminución de las poblaciones de agua en los valores de índice WPC 000 y 100, y en el aumento de las moléculas de agua con dos o más puentes de hidrógeno tanto para membranas de DMPC/Chol como de 14:0 Dieter PC/Chol. Esto lo podemos observar en la [Figura 3.6](#) para los sistemas puros de 14:0 Dieter PC y para sistemas mixtos de 14:0 Dieter PC/Chol, donde se exhibe el mismo perfil tanto por encima como por debajo de la temperatura de transición aunque de una forma más atenuada. Las membranas de DMPC pierden población de estas “clases” de moléculas ya que hay un aumento en la cantidad de moléculas que forman HB con los grupos carbonilos de los lípidos (001, 101, 201 y 301). Estas clases de moléculas suman hasta un 40% del total de moléculas en la región y son menos propensas a la relajación dado que están unidas a las cadenas de los lípidos.

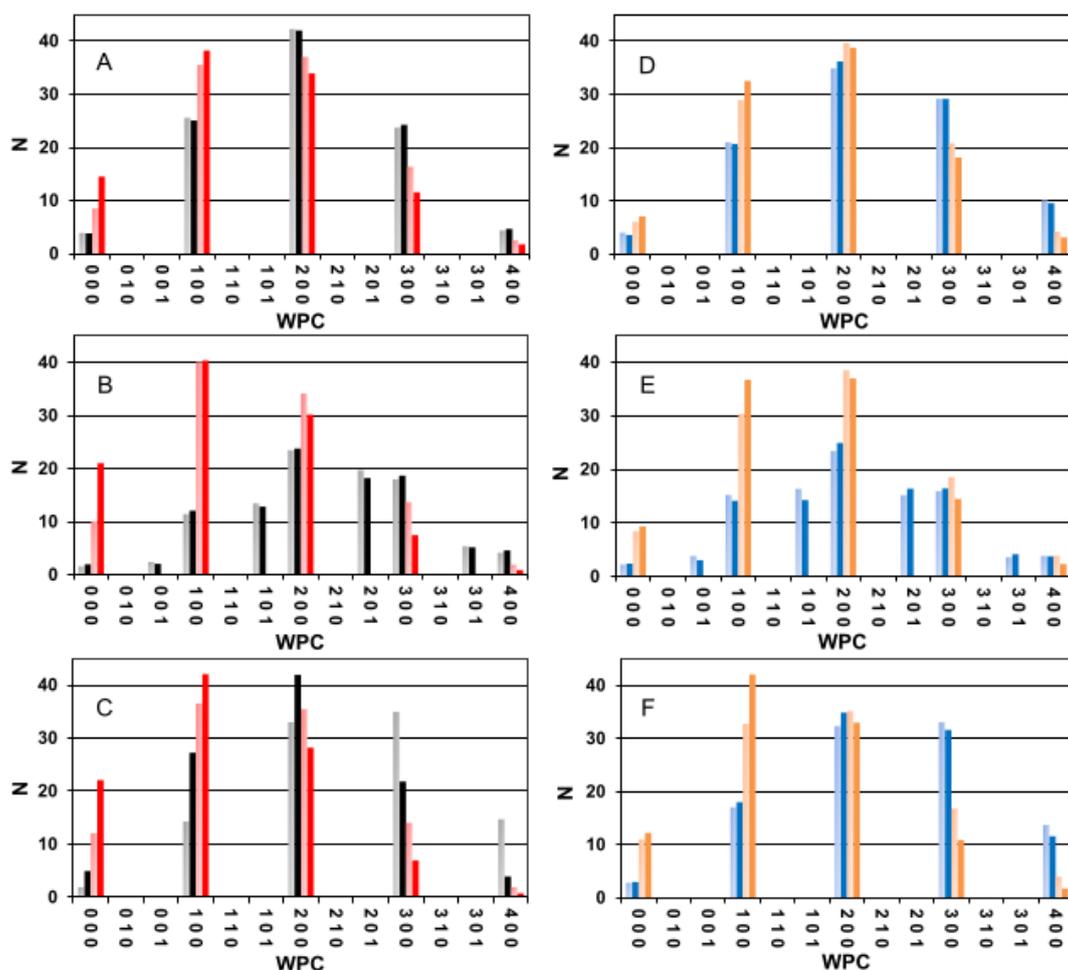


Figura 3.6: Índice WPC para lípidos en las membranas por debajo y por encima de T_m . Los paneles A, B y C corresponden a membranas de DMPC (gris y negro, respectivamente) y 14:0 Dieter PC (rojo claro y rojo). Los paneles D, E y F corresponden a membranas de DMPC/Chol (azul claro y azul) y 14:0 Dieter PC/Chol (naranja claro y naranja). Los paneles superiores representan la región entre los grupos POs y COs, la del medio representa la región de los COs y la inferior representa la región de las cadenas alquílicas por debajo de los grupos COs.

La primera esfera de hidratación de las biomoléculas implica agua específicamente hidratada (agua enlazada incluso con los lípidos) y agua de hidratación general (agua interactuando a través de interacciones más débiles como las de van der Waals), por lo que el tiempo de residencia del agua de hidratación en la primera esfera es el resultado de estos 2 tipos de hidratación con un tiempo diferente de relajación, siendo este mucho mayor para las moléculas formando HB con los lípidos. Calculamos el tiempo medio de residencia de las moléculas de agua unidas por

HBs a los COs en DMPC y de las moléculas de agua en la región de los lípidos PC carentes de grupo COs con el objetivo de incluir información sobre la dinámica, para lo que consideramos el tiempo medio para abandonar la primera esfera de hidratación (moléculas de agua siendo primera vecina de los lípidos) en un radio de 4.1 Å desde el oxígeno del carbonilo en DMPC y del carbono correspondiente en la región para el 14:0 Dieter PC. Este umbral para definir la primera esfera de hidratación fue determinado por nuestro grupo en diferentes sistemas desde superficies de grafeno a proteínas, considerando tanto la distribución de agua normal a la superficie del soluto (primer pico) como la distribución de las distancias mínimas de agua-soluto [189, 190, 191].

A través de los resultados de los cálculos ahora podemos saber que las moléculas de agua unidas por HBs a los grupos carbonilos del DMPC en la primera esfera de hidratación residen en promedio un tiempo de 31.2 ps. Mientras que para 14:0 Dieter PC (no hay HB agua-lípido) la escala de tiempo es casi un orden de magnitud menor, siendo el valor de 2.6 ps, por lo que las moléculas de agua en la región de la sonda para 14:0 Dieter PC son mucho más lábiles o relajantes que las de DMPC, lo cual concuerda con los resultados experimentales.

Resumiendo todo lo anterior, es evidente que el espectro de emisión del Laurdan es sensible al empaquetamiento de las moléculas de los lípidos en las vesículas lipídicas y por lo tanto a su estado de fase. Otro aspecto que modifica la fluorescencia del Laurdan es la dinámica de las moléculas de agua próximas a la sonda, como por ejemplo la reorientación de los dipolos de las moléculas de agua alrededor del estado excitado del dipolo del Laurdan [112, 192]. Al comparar la Figura 3.2 y la Figura 3.3 observamos que tanto el valor de GP_{ex} y de la población no relajable son mayores en DMPC que para 14:0 Dieter PC en ambas fases. Esto se debe a que algunas moléculas de agua forman HB con los grupos carbonilos como confirmamos por simulaciones de dinámica molecular a través del índice WPC en la Figura 3.6. El agua se organiza alrededor de los grupos polares de la cabeza de los lípidos formando una solución bidimensional en una región que denominamos “interfaz” [193, 194]. Dentro de los alcances de este trabajo este término “interfaz” se refiere a un plano matemático que divide a la región polar de la no polar [195]. La mayor organización de la interfaz de DMPC, puede deberse a la posibilidad de que las moléculas

de agua puedan formar un puente intramolecular enlazando simultáneamente los grupos POs y COs por HB del mismo lípido [116]. Las simulaciones de DM nos indican que el Chol en membranas de DMPC no rompe estos puentes de agua sino que el agua forma puentes entre los COs de los lípidos y los grupos hidroxilo (-OH) del Chol, dando lugar a una región de interfaz más ordenada.

El índice WPC refleja que la presencia de las moléculas de agua sin enlaces HB (000) o solo un HB (100) es mayor que para 14:0 Dieter PC comparado con DMPC en concordancia con el aumento de la población relajable observada en el análisis de fluorescencia (Figuras 3.4 y 3.6). La adición de Chol a la membrana de 14:0 Dieter PC disminuye esta población indicando un menor número de moléculas de agua libres. Los puentes intramoleculares de agua no se forman en membranas de 14:0 Dieter PC dado que carecen del grupo CO [120], por lo que las moléculas de agua enlazadas al grupo POs pueden rotar alrededor del HB dando como resultado una reorientación de los dipolos de las moléculas de agua, aumentando la población de agua relajable. Este efecto es menos notable en presencia de Chol, indicando que hay moléculas de agua haciendo puentes entre el grupo PO de los lípidos y del -OH del Chol [120]. Estos puentes previenen la rotación de las moléculas de agua alrededor de los enlaces con los POs, por lo que disminuye la relajación dipolar y por ende, aumenta el valor de GP y la población no relajante de moléculas de agua.

Cuando la concentración de Chol llega a un 10% los valores de GP_{ex} y de la población de agua no relajable en 14:0 Dieter PC son similares a las obtenidas para sistemas puros de DMPC (Figura 3.5 A y B), por lo que inferimos que el Laurdan se encuentra en un entorno de polaridades similares. En los perfiles de densidad que están representados en la Figura 3.7 podemos observar que el agua cubre las regiones de los POs y COs en DMPC, mientras que para 14:0 Dieter PC la región de POs y la región donde deberían estar los COs se desplazan a distancias menores con respecto al centro de la membrana. Además se puede observar en la figura que los grupos -OH del Chol en 14:0 Dieter PC se ubican en la región de los carbonilos de los lípidos, en la misma posición que en DMPC permitiendo que el agua penetre más profundo

en las membranas mixtas. Esto es una fuerte evidencia de que en ausencia de grupos COs el Chol aporta al sistema la posibilidad de que el agua puede unirse a las moléculas de Chol presentes.

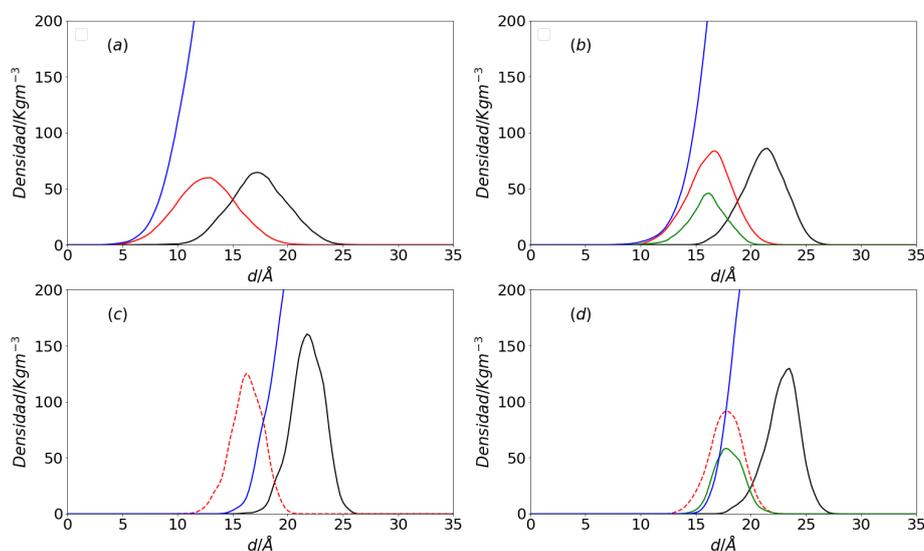


Figura 3.7: Perfiles de densidad a lo largo del eje Z para agua (azul), grupos carbonilos (rojo), grupos fosfatos (negro) y Chol (verde) para DMPC (a), DMPC/Chol (b), 14:0 Dieter PC (c) y 14:0 Dieter PC/Chol (d). Las líneas punteadas rojas en los paneles (c) y (d) indican la región donde los grupos carbonilos deberían estar.

Para poder mostrar la interacción de las moléculas de agua con las de Chol, realizamos una modificación al índice de clasificación. El último dígito del índice WPCC, considera los enlaces por HB de las moléculas de agua con el grupo -OH de las moléculas de Chol. Por ejemplo, 2101 significa que una molécula de agua posee dos HBs con otras moléculas de agua, un HB con el grupo PO de las moléculas de los lípidos, ningún HB con los grupos COs de los lípidos y un HB con una moléculas de Chol. En la [Figura 3.8](#) observamos que prevalecen las uniones con otras moléculas de agua y con Chol (1001 y 2001) en ambas mezclas lipídicas. La ausencia de grupos carbonilos conlleva a un aumento del número de moléculas de agua unidas a grupos POs y con Chol (0101 y 1101).

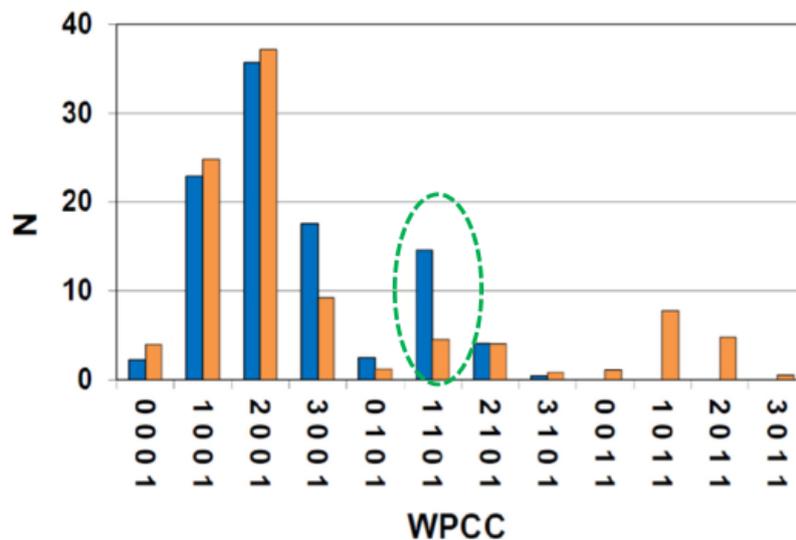


Figura 3.8: Índice WPC para moléculas de agua en membranas de 14:0 Dieter PC/Chol (azul) y DMPC/Chol (naranja).

En un trabajo previo se ha mostrado que los grupos -OH de los Chol en éter PC pueden unirse a los grupos POs [120]. Esta organización impuesta por el Chol la podemos correlacionar observando la [Figura 3.6](#), la cual indica que las distribuciones del índice WPC en membranas de DMPC puras a temperaturas por debajo de T_m (000, 100, 200, 300, 400) coinciden muy bien con las encontradas para membranas de 14:0 Dieter PC con Chol en las regiones de los grupos COs y los POs. Esto explica la coincidencia en los valores de GP_{ex} para estas dos membranas en 0.4 como se mostró en la [Figura 3.2](#), ratificando así la presencia de la sonda en esta región. Esta asociación requerida para lograr esta propiedad interfacial ocurre a una proporción de 14:0 Dieter PC/Chol del 10%, la cual se observa en la [Figura 3.1](#) y en la [Figura 3.2](#) en donde aparecen una transiciones marcadas.

A modo de conclusión de esta parte del trabajo de tesis, podemos decir que la presencia de Chol en membranas de DMPC y 14:0 Dieter PC, en ambas fases lipídicas, modifica la distribución de las moléculas de agua disminuyendo la relajación dipolar de los lípidos de la interfaz generando un aumento en la población no relajable. Estos resultados los podemos corroborar en los índices de WPC obtenidos por análisis de DM. Las simulaciones mostraron que el Chol en las membranas de DMPC reducen la labilidad (moléculas de hidratación fácilmente relajables) a expensas de un

aumento en la cantidad de moléculas de agua formando HB con los carbonilos de los lípidos. Estas moléculas de agua, son detectadas por el GP del Laurdan mostrando un tiempo de residencia local casi un orden de magnitud mayor al correspondiente para el sistema de 14:0 Dieter PC. Al comparar los efectos del Chol en membranas modelo de DMPC y 14:0 Dieter PC observamos que a un nivel molecular, el Chol genera anomalías en las propiedades de la región interfacial de la membrana por los diferentes arreglos de agua. Por un lado interacciona de diferente manera con los grupos POs si los grupos COs están presentes o no, ya que se pueden formar puentes de agua. Además el Chol puede pasar a formar un nuevo centro de hidratación para las moléculas de agua en membranas carentes de grupos COs. Los lípidos con grupos éteres y sus mezclas con Chol contribuyen a la estabilidad de los microdominios lipídicos involucrados en la señalización celular. Particularmente, la distribución de moléculas de agua en la región interfacial puede aportar un características estructurales modificando la fusión y la dinámica de la membrana. Estos estudios en DMPC/14:0 Dieter PC/Chol indican en principio que la incorporación del éter en las cadenas alquílicas en fosfolípidos afecta la respuesta de la membrana modificando los HBs intermoleculares entre los grupos de las cabezas de los lípidos [119].

3.1.2. Estudio de la influencia del colesterol y del DHA en el agua de hidratación de membranas lipídicas modelo

En la [Sección 1.3](#) presentamos la importancia del colesterol en la membrana lipídica en su estructura, dinámica y función biológica. En particular, como componente de la membrana lipídica, el colesterol puede alterar significativamente las propiedades mecánicas disminuyendo la fluidez de la membrana volviéndola más rígida. Este efecto, como ya mencionamos, promueve funciones celulares fisiológicas pero también puede llevar a procesos celulares patológicos como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. Además, como comentamos en [Sección 2.2](#), en ciertas instancias el colesterol puede presentarse en arreglos lipídicos ordenados en dominios cristalinos, un comportamiento que también ha sido indicado como promotor de la enfermedad de Alzheimer. Los beneficios de los ácidos grasos para el desarrollo cerebral y la prevención de enfermedades

también los comentamos anteriormente en la [Subsección 1.1.2](#).

En la [Sección 2.2](#) mostramos como el DHA libre no sólo tiene la capacidad de modificar la fluidez de las membranas de DPPC, pero que también contrarresta la rigidez que produce el Chol. Esta rigidez es debida a un efecto global dado por el peso dominante de las largas cadenas hidrofóbicas que se estiran y se ordenan por la presencia de este efector [[121](#), [122](#)]. En este sentido, estudios experimentales [[121](#)] y computacionales [[122](#)] de bicapas de DPPC-Chol mostraron que la movilidad de las cabezas hidrofílicas de los lípidos aumenta en presencia de Chol así como también la dinámica del agua de hidratación. Este hecho es de suma importancia teniendo en cuenta el nuevo paradigma (mencionado también en la [Subsección 1.2.2](#)) donde el agua es un componente fundamental de la membrana y es esencial para su estructura, dinámica y función. Por lo que sería de gran interés estudiar si la capacidad del DHA de revertir el efecto del Chol en las propiedades mecánicas de membranas de DPPC-Chol también se verifica en la dinámica del agua de hidratación restaurando la modificación que en ella produce el Chol. Este es nuestro objetivo en esta sección del trabajo de tesis. Particularmente, ello sería de interés en la posibilidad de remoción de agua lábil y su consecuente reemplazo por un ligando, lo cual se considera una fuerza impulsora de los procesos de unión macromolecular. En tal sentido, obtendríamos información que podría ser relevante a la reactividad de la membrana [[121](#)], lo cual podría ser de particular interés en el contexto de la EA donde los lípidos jugarían un papel fundamental en la unión y posterior agregación de los péptidos amiloides.

El agua hidrata tanto a superficies polares como no polares, resultando en perfiles de densidad con las típicas capas de hidratación. Sin embargo, a pesar de que los valores medios no aporten información relevante, se ha encontrado que las fluctuaciones de densidad aumentan en una superficie hidrofóbica lo cual implica una probabilidad mayor de vaciado de dicha región, indicando una menor energía libre de creación de cavidad local [[196](#), [197](#)]. Es por esto que podemos calcular la probabilidad de observar N moléculas de agua dentro un pequeño volumen en un cierta región, como por ejemplo dentro de una esfera de radio 4.5 \AA ($P(N=0)$), como un estimativo de la hidrofobicidad local. Cuanto mayor es el valor de $P(N=0)$, más lábil o

fácilmente removible son las moléculas de agua de hidratación, más hidrofóbica es la naturaleza de la región observada. De forma contraria, una probabilidad baja nos indica un comportamiento hidrofílico, dado que las moléculas de agua de hidratación están fuertemente unidas a la región en estudio. En estudios previos de nuestro grupo de investigación hemos utilizado la probabilidad de vaciado de agua como una medida de la hidrofobicidad local en sistemas modelo como superficies de grafeno, proteínas, membranas, etc. [188, 198, 199, 200].

En la [Figura 2.10](#) de la [Sección 2.2](#) observamos los perfiles de densidad para las membranas pura de DPPC (a), para el sistemas binario, DPPC-Chol (b), DPPC-DHA (c) y para el sistema ternario DPPC-Chol-DHA (d), los cuales son de gran ayuda en este contexto. Recordamos que la figura (b) deja en evidencia el efecto ya conocido (y mostrado también en la [Sección 2.2](#)) que tiene el Chol sobre la membrana lipídica, volviéndola más rígida y estirándola de forma tal que las cabezas hidrofílicas se alejan más del centro de la membrana. La distribución de Chol es estrecha y esta localizada al comienzo de la distribución de los carbonilos. El efecto del DHA, evidente de la figura (d), es estrechar las regiones globales para los grupos polares pero dispersa la distribución del Chol en una región más grande, cubriendo toda la región ocupada por los carbonilos. Esto expone a las moléculas de Chol hacia la superficie de la membrana, haciéndolas posiblemente más accesible por las moléculas de agua.

Para acceder a las propiedades de hidratación de los grupos lipídicos de interés o, más específicamente, para estimar su hidrofobicidad, podemos calcular la probabilidad de vaciado de las moléculas de agua, $P(N=0)$, de sus primeras capas de hidratación. Dado que las regiones por encima y por debajo de los carbonilos es donde la hidratación se ve más afectada por la presencia de colesterol [122] y, como es evidente de los perfiles de densidad en la figura, esta es precisamente la región donde se ubican tanto el Chol como el DHA, analizamos precisamente la probabilidad de vaciado de moléculas de agua en regiones esféricas de radio $r = 3.5, 4.5$ y 5.5 Å centradas en los átomos de carbono de los grupos carbonilos. En la [Figura 3.9](#) mostramos los resultados para los tres radios para las membranas de DPPC, para el sistema binario (DPPC-Chol) y para el sistema ternario (DPPC-Chol-DHA). Recalamos que valores grandes de $P(N=0)$

implican que las moléculas de agua que hidratan el grupo en estudio son lábiles o fácilmente removibles y, por lo tanto, ese grupo es hidrofóbico. Por el contrario, un valor bajo de $P(N=0)$ implica que las moléculas de agua están fuertemente unidas, por lo que ese grupo muestra un comportamiento hidrofílico (esto ocurre, por ejemplo, cuando se forman los puentes de hidrógeno agua-superficie). En la [Figura 3.9](#) es inmediatamente evidente que la presencia de colesterol tiene un efecto pequeño, pero que no pasa desapercibido, en la hidrofobicidad local de la membrana haciendo a los grupos carbonilos un poco más hidrofóbicos (valores más grandes de $P(N=0)$ que para el caso de la membrana de DPPC pura). La presencia de DHA en el sistema ternario reduce la hidrofobicidad de los carbonilos restaurando parcialmente los valores correspondientes al sistema de DPPC puro. Este efecto es evidente en esferas de radio $r = 3.5$ y 4.5 Å mientras que es menos significativo para el caso de $r = 5.5$ Å, posiblemente por el hecho de son incluidas las moléculas de agua externas e hidratando los fosfatos, las cuales tienen un comportamiento intrínsecamente más hidrofílico.

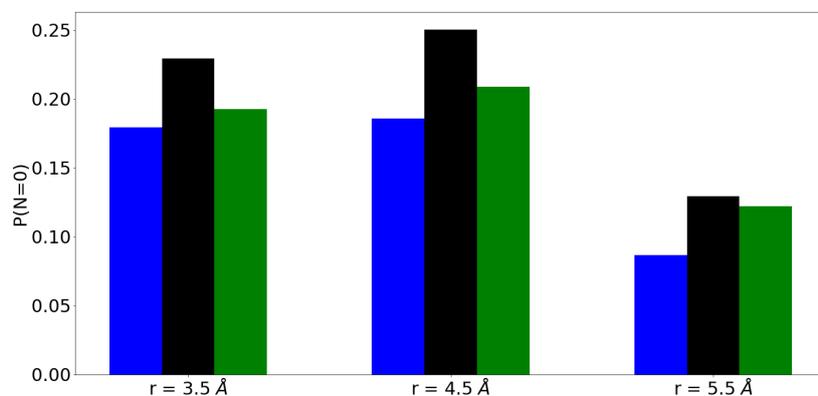


Figura 3.9: Probabilidad de vaciado ($P(N=0)$) de moléculas de agua en regiones esféricas de radio $r = 3.5, 4.5$ y 5.5 Å centradas en los átomos de carbono de los grupos carbonilos en membranas de DPPC (azul), DPPC-Chol (negro) y DPPC-Chol-DHA (verde).

Recordamos que en la región de los carbonilos también se encuentran las moléculas de colesterol y de DHA (como podemos observar en la [Figura 2.10](#)) y que simulaciones previas de DM han mostrado un cierta labilización del agua de hidratación inducida por el colesterol [122], un hecho que podría llevar a un aumento de la reactividad local de la membrana dado por

la propensión del agua a ser reemplazada por un ligando [121]. Esta disminución de la propensión del agua de hidratación removible inducida por el Chol (junto con un aumento de la exposición de agua con el colesterol mostradas en la [Figura 3.1](#)) suponemos que podría ser relevante para la reactividad de las membranas con colesterol, particularmente por la posibilidad de unión de los péptidos beta amiloides [69, 70, 71, 72, 201] y su posterior agregación [129] implicados en la enfermedad de Alzheimer. Dado que el proceso de unión ocurre por la remoción y el reemplazo del agua de hidratación por los ligandos, la restauración de un contexto más hidrofílico promovido por la presencia de DHA puede volver este proceso menos espontáneo. Además, ciertos ácidos grasos como el EPA pueden romper los dominios cristalinos del colesterol en la membrana lipídica ([159, 66]), por lo que esto sería de gran importancia para un estudio futuro considerando el rol que tienen estos dominios como centros catalíticos para la agregación de los péptidos beta amiloides [129].

Por último, mostramos la [Figura 3.10](#), donde podemos observar el índice WPC que cuenta el número de puentes de hidrógeno de las moléculas de agua con otras moléculas de agua y con los grupos fosfato y carbonilo (explicado en la [Subsección 3.1.1](#)). Calculamos el índice para las moléculas de agua en una esfera de radio $r = 4.5 \text{ \AA}$ de los carbonilos ya que esta es la región de interés derivada de nuestras figuras previas. En la [Figura 3.10](#) es evidente que la presencia del colesterol aumenta el porcentaje de moléculas de agua con dos o menos HBs totales (HBs agua-agua y agua-lípido) a expensas de las moléculas con un número de coordinación mayor por HB. Nuevamente aclaramos que las moléculas menos coordinadas esperamos que sean más lábiles y fácilmente removibles, por lo que concuerda muy bien con los resultados expuestos anteriormente. El agregado de DHA, por lo contrario, revierte este efecto prácticamente restableciendo la coordinación de los HBs totales típicos de la membrana pura de DPPC, por lo que nuevamente encontramos que el DHA restablece la fuerte capa de hidratación alrededor de los carbonilos de los lípidos (típico también de la membrana pura de DPPC). Este hecho podría restaurar el escenario en el que la membrana es menos accesible por los ligandos, una situación que podría ser de interés, como ya mencionado, para contextos como el de la enfermedad de Alzheimer.

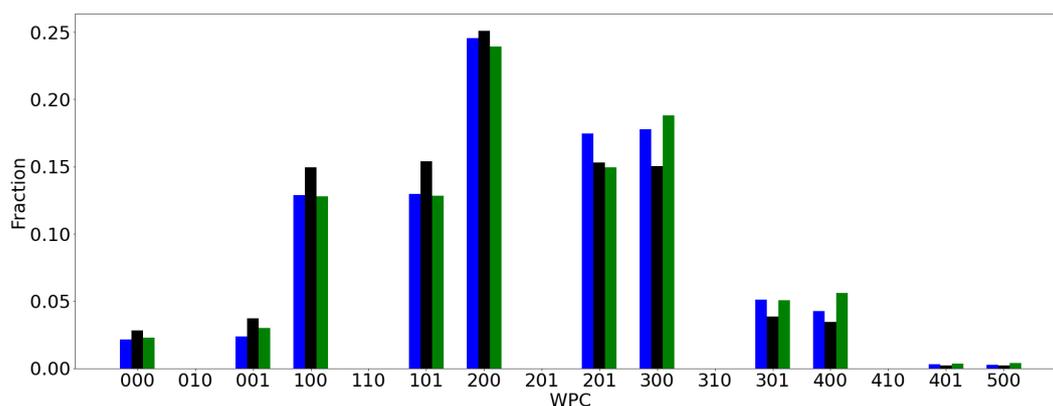


Figura 3.10: Índice WPC para lípidos en membranas de DPPC (azul), DPPC-Chol (negro) y DPPC-Chol-DHA (verde).

Para concluir con este apartado de la tesis podemos decir que, luego de utilizar simulaciones de dinámica molecular para determinar el efecto del DHA en el agua de hidratación de las membranas lipídicas de DPPC-Chol, encontramos que mientras que el colesterol induce un estado más desordenado de las moléculas de agua alrededor de los grupos polares de los lípidos, la presencia de DHA en el sistema ternario DPPC-Chol-DHA puede revertir parcialmente dicho efecto restableciendo el orden estructural del agua. Adicionalmente, el DHA causa que las cabezas polares de los lípidos se estrechen, como es evidente en los perfiles de densidad de la [Figura 2.10](#), mientras que ensancha la distribución espacial de las moléculas de Chol exponiéndolas hacia la superficie y volviéndolas más accesibles por el agua de hidratación. Finalmente, estudiamos también los efectos locales principales inducidos por el Chol y por el DHA sobre la hidrofobicidad de la membrana. Primero encontramos que la presencia de Chol vuelve a los carbonilos un poco más hidrofóbicos. Este hecho podría afectar la reactividad de la membrana [121] aumentando la propensión a la deshidratación local y por lo tanto favoreciendo la interacción con otros efectores o ligandos que podrían desplazar al agua lábil en el proceso de unión. Por otro lado, cuando el DHA se incorpora en la membrana de DPPC-Chol su presencia parcialmente contrarresta la influencia del Chol. Esto es consistente con nuestro estudio del índice de WPC que cuantifica la coordinación de los puentes de hidrógeno de las moléculas de agua en dicha región, mostrando que mientras el Chol promueve la presencia de moléculas con menos HBs coordinados alrededor

de los carbonilos de los lípidos, la adición de DHA restablece la hidratación fuerte de las capas de hidratación típica de las membranas puras de DPPC.

3.2. Hacia una caracterización más completa del agua de hidratación de membranas

Como se deja entrever a partir de los estudios específicos de los puntos anteriores, en esta sección nos concentramos en aspectos más bien globales del agua de hidratación. Sin embargo, ya el agua pura o bulk presenta una gran riqueza estructural tal como se concibe dentro del escenario de dos líquidos (como explicado en la [Subsección 1.1.2](#)), de modo que es esperable que el agua de hidratación presente un comportamiento de una riqueza aún mayor. Para estudiar dicho comportamiento es necesario, como dicho, recurrir al empleo de índices de estructura que resulten aplicables en este contexto específico. Esta es la cuestión en la que nos concentraremos en la próxima sección, de modo de sentar las bases de una descripción más precisa del agua de hidratación de membranas.

3.2.1. Aspectos estructurales de moléculas de agua de alta densidad local

Para poder llegar a una descripción detallada del agua en membranas es necesario primero contar un parámetro de estructura que sea capaz de clasificar apropiadamente las moléculas de agua. Por lo tanto, en esta primera instancia nos concentraremos en la descripción y desarrollo de índices de estructura para clasificar moléculas de agua pura y luego extenderemos los resultados al contexto de interés. De disponerse de un índice de estructura para el agua aplicable en interfase en condiciones de nanoconfinamiento, como es el caso de agua de hidratación de membranas, sería una tarea más directa. Sin embargo, los índices existentes fallan en estos contextos tal como indicaremos en las secciones siguientes, de modo que la primer y demandante etapa que abordaremos a continuación consiste en el desarrollo de un parámetro de estructura apropiado.

Para desarrollar un nuevo indicador estructural para el agua, estudiamos primero dos índices basados en consideraciones estructurales (orden traslacional hasta la segunda capa

molecular). Por un lado, el LSI cuyo uso propuso nuestro grupo integrar a minimizaciones de energía potencial, es decir, cuando se utilizan las llamadas estructuras inherentes o IS (*Inherent Structures*), cuencas de atracción local de la configuración real en la superficie de energía potencial que se acceden por medio de métodos de minimización energética como *steepest descent* o gradiente conjugado. Por otro lado, el índice ζ [202, 203] que incorpora en cierto modo el papel de los puentes de hidrógeno, HBs, (sin embargo, para una dada molécula central, ello sólo se considera en virtud de la distancia entre la última molécula que forma HB y la primera vecina sin HB). Para calcular el índice LSI, que denominamos $I(i, t)$, para una molécula central i a un tiempo t , uno ordena al resto de las moléculas dependiendo de la distancia radial r_j entre el oxígeno de la molécula i y el oxígeno de la molécula j : $r_1 < r_2 < r_j < r_{j+1} < \dots < r_{n(i,t)} < r_{n(i,t)+1}$, donde $n(i, t)$ es elegido de forma tal que $r_{n(i,t)} < 3,7 \text{ \AA} < r_{n(i,t)+1}$ (eso es, consideramos hasta la molécula de agua n hasta 3.7 \AA de la molécula central). Luego $I(i, t)$ se calcula como :

$$I_{(i,t)} = \frac{1}{n(i,t)} \sum_{j=1}^{n(i,t)} [\Delta(j; i, t) - \bar{\Delta}(i, t)]^2 \quad (3.2)$$

donde $\Delta(j; i, t) = r_{j+1} - r_j$ y $\bar{\Delta}(i, t)$ es el promedio sobre todas las moléculas de $\Delta(j; i, t)$ (un promedio sobre todas las n moléculas de agua más próximas que 3.7 \AA a la molécula central), por lo que $I(i, t)$ expresa la inhomogeneidad en la distribución radial dentro de una esfera de radio 3.7 \AA . Un valor más grande de $I(i, t)$ implica que una molécula i a un tiempo t se caracteriza por un ordenamiento local tetraédrico y una baja densidad local, con un hueco definido entre la primera y la segunda esfera de coordinación, mientras que, por otro lado, valores de $I(i, t)$ cercanos a cero indican que una molécula presenta un ordenamiento local tetraédrico defectuoso y una alta densidad local, dado que alguna molécula de la segunda esfera de coordinación ha colapsado parcialmente sobre la primer esfera (transformándose en una molécula intersticial), perturbando así el orden tetraédrico local. Como ya indicamos, a diferencia de las referencias [98, 99], calculamos el índice en la IS minimizando la energía potencial de la correspondiente estructura instantánea para poder deshacerse del efecto aleatorio de las vibraciones térmicas,

removiendo así las fluctuaciones que impiden una identificación correcta de la estructura local en la trayectoria real. Por otro lado el índice ζ en [202, 203] se calcula midiendo la diferencia entre la distancia $d_{j'i}$ de la molécula vecina más cercana j' no unida por puente de hidrógeno a la molécula central i (para simplificar a partir de ahora llamaremos a esta primera molécula no unida por puente de hidrógeno *1NHB*), y la distancia $d_{j''i}$ de la molécula j'' más lejana que forma puente de hidrógeno con la molécula i (que designaremos como la última molécula unida por puente de hidrógeno o *LHB*): $\zeta(i) = d_{j'i} - d_{j''i}$. Este índice tiene una ventaja desde un punto de vista conceptual al tomar explícitamente en cuenta la coordinación de puente hidrógeno, la cual contribuye de forma mayoritaria a la estructura del agua. Para el modelo de agua TIP5P el índice produce distribuciones claramente bimodales en la dinámica real, es decir, en la configuración instantánea (sin necesidad de recurrir al esquema IS) [203]. Para el modelo TIP4P/2005, en cambio, la distribución no dió bimodalidades claras pero se puede descomponer en dos funciones Gaussianas [202]. Esta medida produce valores levemente mayores a 1 Å para moléculas de baja densidad o estructuradas (para las cuales la molécula *1NHB* esta localizada dentro de la segunda capa de coordinación, la cual esta separada de la primera por una clara brecha), pero significativamente más baja para las moléculas de alta densidad o desestructuradas donde la molécula *1NHB* se encuentra en la región entre la primera y la segunda capa (el índice puede llegar incluso a valores cero o negativos, cuando la molécula *1NHB* se introduce en la región de la primera capa).

En la [Figura 3.11](#) mostramos la distribución para el índice ζ en un rango de temperatura para los 2 modelos de agua estudiados, TIP5P y SPC/E (cuyas temperaturas de fusión o melting, T_m , son 272 y 214 K respectivamente [204]) en la configuración real (instantánea) y en la configuración inherente (IS), en la cual el índice no había sido calculado hasta la fecha. Para el modelo TIP5P en la dinámica real observamos una buena bimodalidad con un pico a la derecha (cuya población aumenta a medida que la T disminuye) incluyendo a las moléculas estructuradas y un pico a la izquierda (cuya amplitud decrece a medida que la temperatura, T, disminuye) que contiene a las moléculas desestructuradas. Sin embargo, y en contrapartida con

la situación observada para el LSI (cuya distribución en la IS la incluimos para comparar), luego del proceso de minimización (es decir, el cálculo del índice ζ en la IS) la bimodalidad se pierde significativamente, principalmente porque el pico a la izquierda se vuelve más ancho y sufre un desplazamiento hacia el exterior. Cuando evaluamos el modelo SPC/E (para el cual el índice ζ no ha sido calculado antes ni siquiera en la dinámica real) encontramos que no hay bimodalidad en la dinámica real ni tampoco en el nivel IS, y presenta un pico simple que se mueve a valores más altos a medida que la T disminuye. Es notable que los picos para las diferentes temperaturas están mucho más cerca unas de otras en la dinámica inherente ya que los picos para temperaturas altas experimentan un claro desplazamiento hacia valores más grandes del índice. Esto nos habla de los cambios significativos que se generan durante el proceso de minimización y podría estar afectando de manera considerable el ordenamiento local de las moléculas desestructuradas y no así a las moléculas estructuradas. En la [Figura 3.11](#) también observamos el índice LSI en el esquema IS para los dos modelos de agua. Es evidente que en ambos casos el índice muestra una clara bimodalidad. Es de esperar que el modelo TIP5P favorezca la estructuración al mejorar la coordinación tetraédrica local de los puentes de hidrógeno mientras que el modelo SPC/E representa un modelo desestructurado. Es interesante considerar que en (b) y en (d) observamos la distribución del índice ζ para TIP5P y para SPC/E respectivamente en el esquema IS, y en (e) y (f) los casos para el índice LSI. Si comparamos los picos a bajas temperaturas en (b) y en (d), donde podemos aprender que el índice ζ para TIP5P implica moléculas muy bien estructuradas con valores del índice mayores a 1 \AA , mientras que en el caso de SPC/E este pico está por debajo de dicho valor. Además, el pico para moléculas estructuradas es también más alto para el caso de TIP5P. Finalmente, cuando comparamos la estructura del pico en (e) y en (f) podemos aprender que la fracción de moléculas estructuradas (área debajo de cada pico) es mucho más grande para TIP5P comparado con SPC/E para las temperaturas más bajas. Sin embargo, también podemos apreciar que el modelo TIP5P sobreestima levemente la fracción de moléculas estructuradas a altas T.

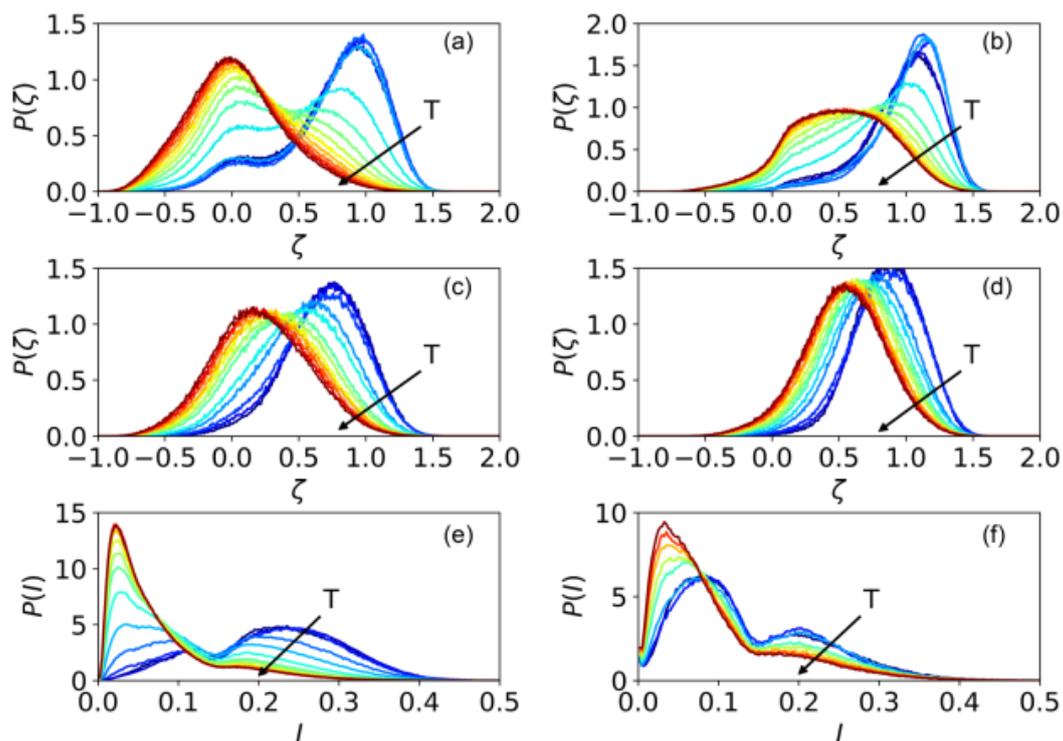


Figura 3.11: (a) Índice ζ para el modelo de agua TIP5P calculado en la dinámica real (rango de temperaturas: 200 K a 340 K); (b) Idéntico a (a) pero el índice calculado en la dinámica inherente (luego de la minimización); (c) Índice ζ para el modelo de agua SPC/E en la dinámica real (rango de temperaturas: 180 K a 300 K); (d) Idéntico a (c) pero el índice calculado en la dinámica inherente; (e) Índice de estructura local para TIP5P en la dinámica inherente ($T = 200\text{-}340$ K); (f) Índice de estructura local para SPC/E en la dinámica inherente ($T = 180\text{-}250$ K). Las flechas muestran la dirección creciente de la temperatura.

Para profundizar sobre las bases moleculares de los arreglos locales responsables de los cambios producidos por el proceso de minimización en la distribución de densidad de probabilidad de la Figura 3.11 y poder así esclarecer la naturaleza del estado de alta densidad (desestructurado), en la Figura 3.12 mostramos la ubicación (distancia desde la molécula central) de las dos moléculas involucrados en el cálculo del índice ζ : la última molécula unida por puente de hidrógeno (*last hydrogen bonded*, LHB) y la primera no unida por puente de hidrógeno (*first non-hydrogen bonded*, 1NHB). En la Figura 3.12 podemos observar en (a) dichas distancias cuando las moléculas son clasificadas como 1NHB y LHB en la dinámica real (y la distancia

también es calculada en la dinámica real), en (b) las moléculas son clasificadas en la configuración dinámica inherente (y la distancia también es calculada en dicho nivel IS). Sin embargo, durante el proceso de minimización las moléculas pertenecientes a ambas clases pueden cambiar su molécula central. En (c) mostramos los resultados cuando las moléculas son clasificadas como 1NHB y LHB en la dinámica real y sus distancias a la molécula central son medidas en la configuración IS correspondiente, es decir, luego de la minimización (dejando de lado el hecho que sigan o no siendo las moléculas 1NHB y LHB en la configuración IS).

En la dinámica real, en [Figura 3.12\(a\)](#) podemos notar que la molécula LHB presenta un pico consistente con un arreglo tetraédrico coordinado con la molécula central (ubicada dentro de la primera capa de coordinación y formando puentes de hidrógeno de buena calidad con la molécula central). Sin embargo, la distribución también muestra una cola a la derecha, presentando una población apreciable a distancias mayores a 3 Å de la molécula central. En contrapartida, la distribución de las moléculas 1NHB muestran un pico cerca de los 3.4 Å pero también se ensancha hacia la izquierda, mostrando una población significativa a distancias menores a los 2 Å. Sin embargo, observando la figura 2b, podemos aprender que en ambos casos esa región pierde la mayoría de su población cuando el índice es calculado en la configuración IS: La distribución de las moléculas LHB han decaído en su mayoría a distancia mayores a 3.1-3.2 Å mientras que las moléculas 1NHB no muestran una población apreciable a valores menores que esos. La primera lección que podemos aprender es que no hay muchas ubicaciones favorecidas para estas moléculas en la dinámica inherente pero solo hay dos distancias separadas de la molécula central: una que corresponde al primer mínimo en la función de distribución radial (posición de la primera capa) y una segunda ubicación cerca de los 3.5 Å (caracterizada por un pico con una forma claramente Gaussiana en la [Figura 3.12\(b\)](#)). Las fluctuaciones térmicas desvían la posición de las moléculas de estas ubicaciones en la dinámica real.

La diferencia significativa entre los gráficos de la [Figura 3.12](#) en la dinámica real e inherente, por un lado, es que las moléculas LHB se mueven hacia adentro en la minimización mejorando así sus puente de hidrógeno con la molécula central, como es de esperar. También, puede darse

el caso en el que el proceso de minimización expulsa una cierta molécula 1NHB (la molécula intersticial) de su posición distorsionada (cerca a la primera capa) hacia una distancia de 3.5 Å. Mientras esto sucede en muchos casos, no siempre es así como podemos observar en el destino de las moléculas clasificadas como 1NHB en la dinámica real (no en la IS) y analizada en la configuración IS (Figura 3.12(c)). De tal gráfico podemos ver que la distribución de las moléculas 1NHB se separan en dos picos claramente definidos, ya que ciertas moléculas 1NHB se mueven hacia el centro a una posición típica de las primeras vecinas (formando un puente de hidrógeno de buena calidad con la molécula central). Esto significa que cuando calculamos el índice ζ en la dinámica inherente para este caso (cuando clasificamos las moléculas como 1NHB y LHB directamente en la IS, Figura 3.12(b)), la molécula que había sido una molécula 1NHB (en la dinámica real) ha perdido su naturaleza en la minimización transformándose en una vecina tetraédrica unida por puente de hidrógeno. Esto también significa que otras moléculas se han convertido en 1NHB en la minimización. Cuando analizamos la coordinación de HB de la molécula central para esta situación, podemos aprender que hay un claro predominio de 3 HBs en la dinámica real, por lo que la 1NHB en la dinámica real no es estrictamente hablando una molécula intersticial pero representa la cuarta vecina que ha perdido su HB como consecuencia de una distorsión del tetraedro causada por la que es realmente intersticial. Es notable que el índice ζ en la dinámica real (dando valores pequeños o incluso negativos) implica para este caso que el cálculo de la diferencia entre la distancia de la cuarta y la tercera vecina, y no entre la quinta y la cuarta, como es de esperar en la propuesta original [202, 203]. En contrapartida, la Figura 3.12(c) nos muestra que otra molécula 1NHB se mueve hacia los 3.5 Å o más (segundo pico), ya que en la minimización estas moléculas ubicadas como quintas vecinas (típicamente intersticiales) disminuyen o cesan su efecto distorsionador sobre la primera capa de la molécula central, que por lo tanto mejora su estructura tetraédrica local. Para estos casos la molécula central muestra un predominio de los 4 HBs en la dinámica real y la estructura tetraédrica local mejora por el proceso de minimización. El cálculo del índice ζ involucra en este caso la cuarta y la quinta vecina. Estos resultados son similares cuando utilizamos TIP5P (Figura 3.12(d)) en

lugar de SPC/e [Figura 3.12\(c\)](#). Si bien la distribución de las moléculas 1NHB nos muestra una cierta bimodalidad en la dinámica real para TIP5P en la región cercana a los 3 Å, es también notablemente vaciada por el proceso de minimización. Tal región es también despoblada en la [Figura 3.12\(d\)](#) para las moléculas LHB. Este hecho revela la reluctancia de las moléculas de agua a permanecer en dicha región, ya que la minimización las distribuye entre una posición típica de una primera capa y un pico externo (que para SPC/E esta centrado a los 3.5 Å mientras que para TIP5P son desplazadas un poco más lejos). El vaciado de dicha región en la minimización explica también por que el índice LSI produce distribuciones bimodales en el esquema IS. Mientras que en la primera capa se ve favorecida, la quinta vecina se ve desplazada hacia el exterior, por lo que si el proceso de minimización ubica a dicha molécula a una distancia mayor a los 3.5 Å (una distancia conmensurable con la segunda capa y utilizada como *cutoff* en la definición del índice), entonces la quinta vecina es la última vecina incorporada en el cálculo del índice. Y dado que su distancia a la cuarta vecina es grande, contribuye significativamente al cálculo del índice en [Ecuación 3.2](#), por lo que produce valores elevados característicos de una buena estructura de la molécula central. Pero si la quinta vecina cae por debajo de los 3.7 Å, reteniendo su naturaleza intersticial (el proceso de minimización no es capaz de arrojarla a la segunda capa), el cálculo del índice también incluye a una sexta vecina. De esta forma se estaría incorporando un par extra en el cálculo de la [Ecuación 3.2](#). Además, dado que no hay grandes distancias entre ninguna de las moléculas consecutivas consideradas, el índice da como resultado valores bajos representativos de una molécula central desestructurada. De esta manera, mientras el LSI hace un buen trabajo determinando inequívocamente las moléculas estructuradas y desestructuradas en el esquema IS en todos los modelos de agua utilizados en este trabajo, esta clasificación depende evidentemente del *cutoff* utilizado [\[101\]](#). Además, dado que en el modelo TIP5P la quinta vecina es expulsada a distancias mayores durante el proceso de minimización, el índice LSI sobreestima la fracción de moléculas estructuradas en comparación con la situación para el modelo SPC/E [\[205\]](#).

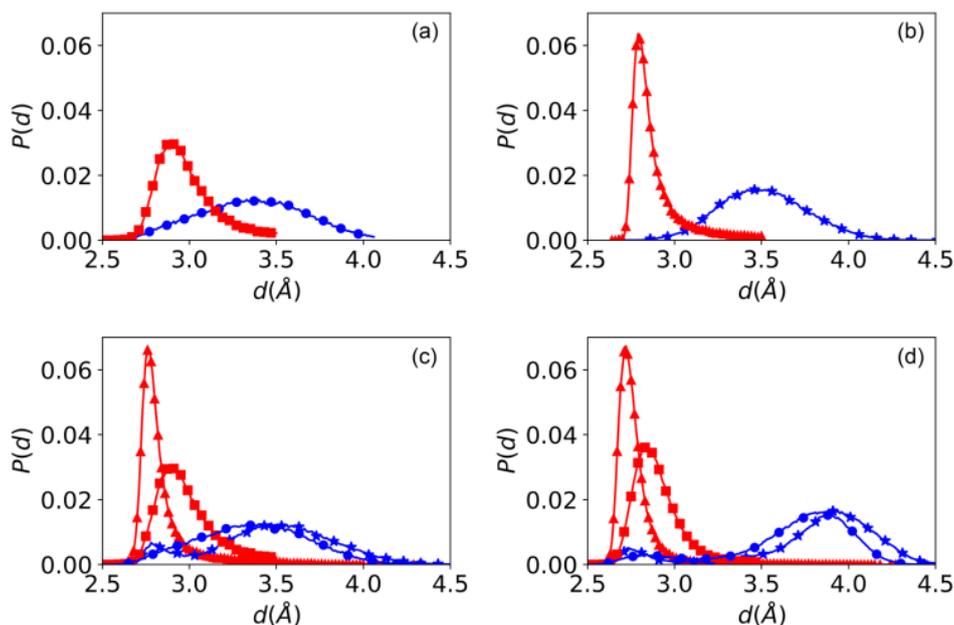


Figura 3.12: Distancia desde la molécula central a las moléculas 1NHB y LHB para SPC/E a $T = 240$ K cuando las moléculas son clasificadas en: (a) la dinámica real (1NHB: curva azul con círculos; LHB: curva roja con cuadrados); (b) en la dinámica inherente (1NHB: curva azul con estrellas; LHB: curva roja con triángulos); (c) en la dinámica real pero su distancia a la molécula central no es calculada en la dinámica real como en los casos (a) y (b) sino en la correspondiente dinámica inherente, es decir, luego del proceso de minimización de la configuración real [1NHB: curva azul con estrellas; LHB: curva roja con triángulos; también incluimos las curvas del caso (a) para comparar]; (d) Idéntico a (c) pero para el modelo de agua TIP5P a $T = 250$ K. Notamos que las temperaturas elegidas implican que para SPC/E el sistema se encuentra levemente por encima de su T_m , mientras que para TIP5P el sistema está levemente por debajo de la misma. Las temperaturas las elegimos con el propósito de mostrar como diferentes situaciones para diferentes modelos de agua dan como resultado comportamientos cualitativamente similares. Obtenemos resultados similares para otras temperaturas cerca o por debajo de T_m en ambos casos. En particular, para TIP5P hemos elegido una temperatura por debajo de T_m , ya que el índice ζ muestra una buena bimodalidad para el régimen sobreenfriado en la dinámica real (mientras que a temperaturas por encima de la T_m esa bimodalidad casi desaparece).

Observando todo lo anterior, podemos decir que encontramos que ambos índices sobreestiman

a las moléculas desestructuradas, tipo HDL, ya que algunas moléculas que parecen ser desestructuradas restituyen el HB al minimizar, en realidad son estructuradas. Esto nos muestra que encontrar un índice capaz de estimar de forma más acertada las fracciones de moléculas estructuras y desestructuras nos ayudaría a profundizar en nuestro conocimiento de las propiedades estructurales del agua en los contextos de agua nanoconfinada y sobreenfriada.

3.2.2. Índices de estructura para diferentes modelos de agua y conexión entre estructura-dinámica

Para el agua, resulta importante relacionar estructura con dinámica, pues se espera que moléculas de agua más desestructuradas presenten una mayor difusividad local. Esto es así dado que estamos estudiando agua pura pero, además, en el caso del agua de hidratación, las moléculas más desestructuradas podrían presentar una mayor labilidad local, siendo más fácilmente reemplazables por un ligando. Por lo tanto, en un estudio posterior [206] comparamos el desempeño del índice LSI, y también del índice ζ (datos no mostrados), basándonos en el grado de orden traslacional hasta la segunda capa de coordinación en tres modelos de agua SPC/E, TIP4P/2005 y TIP5P. Correlacionamos las distribuciones de los índices con una medida indirecta de la restricción estructural: la propensión dinámica (DP) [207], que luego nos permite buscar conexiones con medidas pertenecientes a la configuración del sistema (medidas estáticas como características estructurales o energía potencial local [208, 209]). Esta medida indirecta (calculada a partir de la movilidad promediada sobre el denominado ensamble isoconfiguracional, IC, un grupo de muchas dinámicas diferentes con la misma configuración inicial) representa la tendencia de la dinámica de las moléculas de agua, es decir, la probabilidad de dichas moléculas a realizar desplazamientos sustanciales determinados por las restricciones impuestas por la configuración inicial. La propensión dinámica para una determinada molécula en la configuración inicial (en un determinado intervalo de tiempo t cercano al tiempo de relajación estructural, es decir, cuando la función *scattering* autointermedio decayó a $1/e$) está dado por la ecuación: $DP = \langle \Delta r_i^2 \rangle_{IC}$ [donde $\langle \dots \rangle_{IC}$ implica el promedio sobre la IC y $\Delta r_i^2 = (r_i(t = t) - r_i(t = 0))^2$ es el

desplazamiento cuadrático de la molécula i durante dicho intervalo de tiempo]. En otras palabras, la DP mide (desde su correspondiente tendencia dinámica) que atadas o sueltas se encuentran las moléculas de agua en una dada configuración, por lo que aporta información interesante sobre la relación entre estructura, dinámica y superficies de energía potencial en modelos formadores de vidrios [227, 229, 207, 208, 209, 212, 213, 214]. Esta propuesta se ha aplicado a agua anteriormente [215, 216, 217]. Este procedimiento permite evidenciar la existencia de una evidente correlación entre la estructura y la información dinámica [Figura 3.13](#). Específicamente, encontramos que las moléculas estructuradas localmente presentan una preferencia a tener valores bajos de propensión dinámica y, más conspicuamente, encontramos que las moléculas desestructuradas están extremadamente sujetas a una alta propensión dinámica. Este resultado es relevante para el régimen sobreenfriado donde la aparición de vínculos firmes entre estructura y dinámica han permanecido más bien elusivos, ya que la existencia de dinámicas que varían ordenes de magnitud en el sobreenfriamiento generalmente contrasta con los cambios apenas notables en la estructura general.

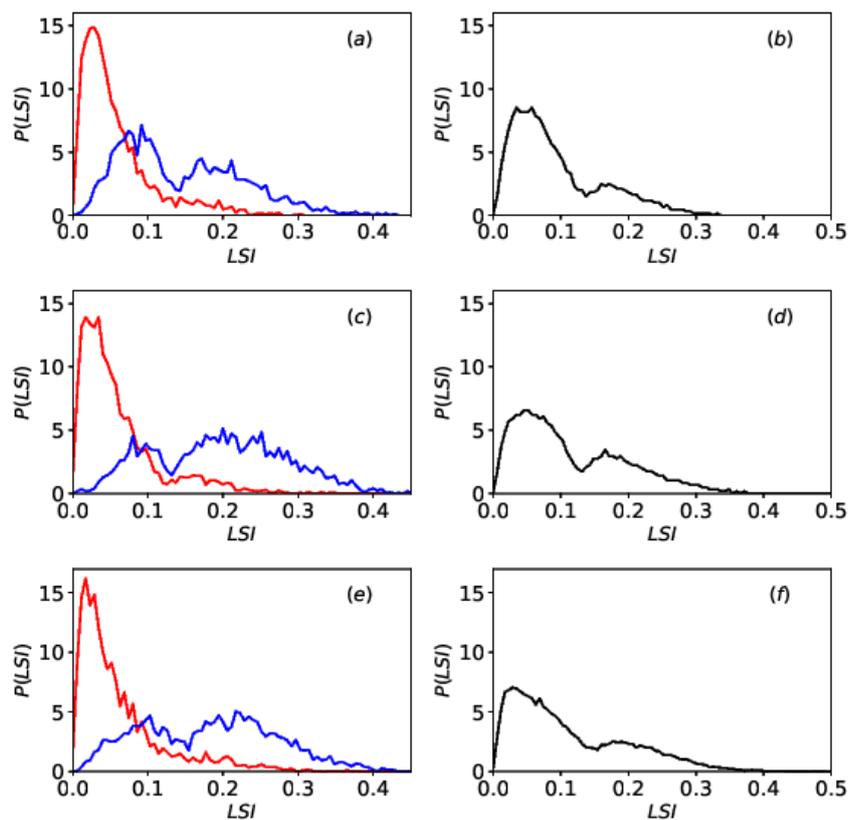


Figura 3.13: Distribuciones de los índices LSI para el 10% de moléculas con mayor valor de propensión (rojo), para el 10% de moléculas con valor menor de propensión (azul), y para todas las moléculas (negro). Cada fila corresponde a un modelo de agua diferente. (a) y (b) distribuciones de LSI para SPC/E a $T = 240$ K; (c) y (d) distribuciones de LSI para TIP4P/2005 a $T = 246$ K y (e) y (f) distribuciones de LSI para TIP5P a $T = 267$ K.

En la [Figura 3.14](#) mostramos un ejemplo de una configuración en 3-dimensiones para el modelo SPC/E a $T = 240$ K, donde graficamos la distribución espacial de las moléculas dentro del 10% de mayor propensión (rojo) y dentro del 10% de menor propensión (coloreadas en azul si pertenecen al pico estructurado de la derecha de la distribución de LSI en la [figura 3.13\(a\)](#), o en celeste si su valor de LSI está localizado en el pico desestructurado, el pico de la izquierda de la [figura 3.13\(a\)](#)). Desde un punto de vista cualitativo, podemos observar clusters (*racimos*) de moléculas similares. Las moléculas azules y celestes juntas muestran una cierta tendencia a ordenarse en clusters más compactos (también con la presencia de regiones más del tipo de cadenas), mientras que las moléculas rojas tienden a ordenarse más en racimos del tipo

de cadenas de la misma forma que las moléculas móviles en los sistemas vítreos [218] o cadenas ramificadas, como los ya antes observados en agua [219]. Vale la pena recalcar que el gráfico muestra los valores de propensión (comportamiento promedio en el ensamble isoconfiguracional, es decir, sobre muchas dinámicas que tienen como punto de partida la misma configuración inicial) y no los valores de movilidad de una dinámica individual como en los casos mencionados. Esta situación, también la encontramos para los otros dos modelos de agua.

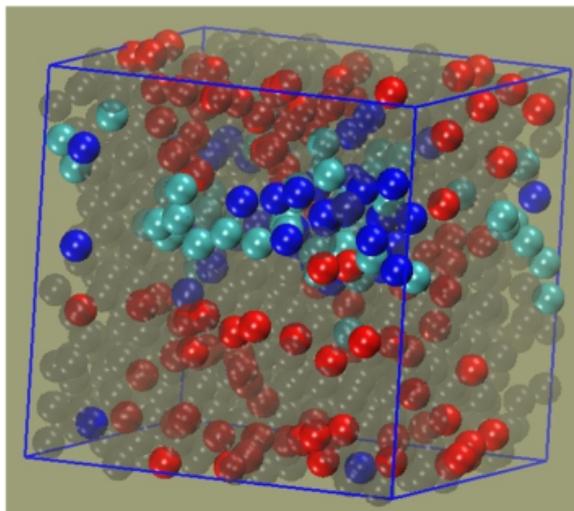


Figura 3.14: Gráfico 3D de una típica configuración con el 10 % de moléculas con mayor valor de propensión coloreadas en rojo, el 10 % de moléculas con valor menor de propensión coloreadas en azul (si pertenecen al pico de la derecha de la distribución del LSI o moléculas estructuradas) y en celeste (si pertenecen al pico de la izquierda de la distribución del LSI o moléculas desestructuradas). Las moléculas rojas pertenecen en su mayoría al pico de la izquierda de la distribución del LSI. También indicamos la posición del resto de las moléculas de agua (en gris pálido). El modelo de agua es SPC/E a $T = 240$ K.

3.2.3. Desarrollo de un nuevo índice de estructura para agua basado en consideraciones energéticas. Aspectos estructurales y el vínculo estructura-dinámica en la relajación vítrea del agua

De modo de corregir los errores en la clasificación de las moléculas de agua antes mencionados (dado que los índices disponibles sobreestiman al estado desestructurado), en nuestro grupo

de investigación hemos desarrollado un nuevo índice basado en consideraciones energéticas llamado V_4 [102, 103], que evita la introducción de preconceptos estructurales. Como dicho, nuestros resultados sugieren que la población del estado distorsionado ha sido sobreestimada por los indicadores previos, ya que algunas moléculas con una primera capa local deformada por fluctuaciones térmicas, resultan pertenecer a una configuración bien estructurada si el efecto “enmascarador” es debidamente removido [102, 103]. Bajo este escenario, en esta sección introduciremos los detalles estructurales de la clasificación con V_4 y, en particular, la relación entre V_4 y las medidas de propensión dinámicas para poder dilucidar la existencia de una conexión clara entre estructura y dinámica en el régimen de agua sobreenfriada.

El índice V_4 [102, 103] involucra el cálculo de todas las interacciones de los pares de moléculas V_{ij} , $j \neq i$ para cada molécula i y las ordena, j según su intensidad, de menor a mayor. Luego al valor de $V_4(i)$ lo definimos como la cuarta V_{ij} . Una molécula bien estructurada con una primera capa de coordinación ordenada tetraédricamente presentará un valor de $V_4(i)$ cercano a la energía de un HB lineal, mientras que una molécula con un arreglo tetraédrico distorsionado dará valores de $V_4(i)$ más grandes. Este índice nos muestra una clara distribución bimodal tanto en dinámica real como en la inherente [102, 103], siendo este último esquema el adecuado a fines de la clasificación estructural [102, 103]. Este hecho nos permite clasificar las moléculas de agua como localmente estructuradas o desestructuradas más allá de la estimación de la fracción de los dos estados, una posibilidad que está por fuera del alcance de la mayoría de los indicadores anteriores. Luego, proporcionaremos argumentos adicionales para mostrar que el índice V_4 también corrige la tendencia a sobreestimar la fracción de moléculas desestructuradas en la que ciertos indicadores basados en la estructura suelen incurrir [102, 103].

En la [Figura 3.15](#) mostramos la distribución del índice V_4 para una serie de temperaturas y a una presión de 1 bar, tanto en la dinámica real como inherente para el modelo de agua SPC/E. Si bien es evidente que ambos esquemas muestran una bimodalidad neta, el enfoque en la dinámica inherente es el que nos permite realizar una clasificación correcta de las clases moleculares. Este hecho tiene su base no sólo en consideraciones estructurales, como la similitud de las funciones de

distribución radial con resultados experimentales en agua amorfa de alta y baja densidad, pero también en la capacidad de permitir una descripción apropiada del comportamiento anómalo de la capacidad calorífica del agua [102, 103]. El pico a la izquierda en la distribución de la dinámica inherente de V_4 (valores menores o negativos) comprende moléculas con cuatro HBs lineales de buena calidad y con tetraedros bien arreglados (a estas moléculas las llamamos moléculas T), mientras que el pico de la derecha está poblado por moléculas con sus arreglos tetraédricos distorsionados y por lo menos un HB se ha perdido (moléculas D). De esta manera, el pico de la izquierda corresponde a las moléculas estructuradas mientras que el pico de la derecha representa las desestructuradas. A fines de poder clasificarlas, consideramos un valor umbral que se encuentra entre los dos picos de la distribución, $V_4 = -12$ kcal/mol, aunque cambios moderados en estos valores no alteran significativamente nuestros resultados. Observamos la existencia de moléculas coordinadas con 5 moléculas de agua [102, 103], pero a diferencia del caso de las coordinadas con 3 moléculas de agua, estas moléculas pentacoordinadas son siempre muy pocas y su fracción no cambia mucho con la temperatura. Además, estas moléculas presentan valores de V_4 característicos de las moléculas tetracoordinadas (tetraedros bien coordinados con 4 HBs de buena calidad) y a su vez son capaces de formar una buena interacción con una quinta molécula, por lo que este número pequeño de moléculas pentacoordinadas serán incluidas entre las moléculas T. Por el contrario, las moléculas D constan de tres moléculas coordinadas ya que básicamente implican la ruptura neta de un HB y su fracción cambia significativamente con la temperatura.

Si bien de ahora en más clasificaremos a las moléculas de agua como T o D con V_4 en la dinámica inherente, es importante aclarar que en la dinámica real en la distribución de V_4 hay muchas moléculas del pico de la derecha ($V_4 > -12$ kcal/mol) que se mueven hacia el pico de la izquierda ($V_4 < -12$ kcal/mol) en la minimización (cuando cambiamos al esquema de dinámica inherente). Estas moléculas T (como indica la clasificación en la dinámica inherente), aparentan ser moléculas D en la dinámica real, de hecho presentan arreglos deformados térmicamente en la dinámica real, pero en el proceso de minimización muestran que

pertenecen en verdad a la cuenca bien estructurada (cuenca T). Por razones prácticas, si bien en verdad pertenecen al estado T en nuestra clasificación, las llamaremos también moléculas F (ya que podríamos pensar que son moléculas D falsas: aparecen como D en la dinámica real pero cuando el desorden térmico es removido se vuelven moléculas T). Los indicadores estructurales basados meramente en preceptos estructurales (a diferencia del índice V_4 que está basado en consideraciones energéticas) clasificarían de manera errónea a la mayoría de estas moléculas desestructuradas. Por ejemplo, el LSI sobreestima la población de moléculas desestructuradas (siempre evaluado en la dinámica inherente donde, a diferencia del caso en la dinámica real, muestra una distribución bimodal neta). Claramente, este es el estado dominante para el LSI, incluso bien por encima del régimen sobreenfriado [215, 100, 101, 220, 205, 221], a diferencia del resultado que observamos en la [Figura 3.15](#) donde predominan las moléculas T. El problema de sobreestimar las moléculas desestructuradas por ciertos indicadores meramente basados en la estructura es de gran importancia si tratamos de encontrar un vínculo entre la estructura y la dinámica. Encontramos que también existen otros parámetros estructurales como el orden métrico local que mide el grado de orden al compararlo con una referencia apropiada del sistema [222, 223]. Sería de gran interés comparar los resultados de este indicador con el esquema de dinámica inherente con V_4 en un trabajo futuro.

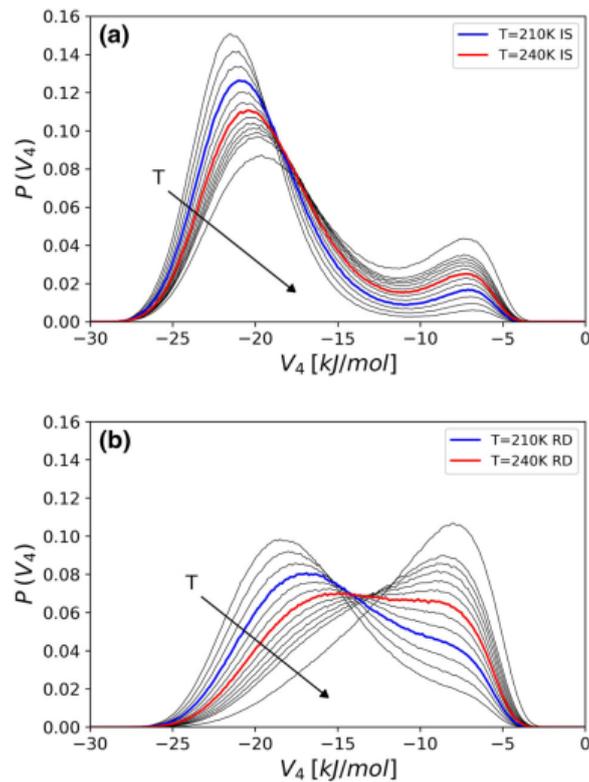


Figura 3.15: Distribución del índice V_4 calculado en la dinámica inherente (estructuras inherentes, IS) en (a) y en la dinámica real (RD) en (b) para el modelo de agua SPC/E, para una serie de temperaturas (desde temperaturas por encima del punto de fusión hasta temperaturas en el régimen sobreenfriado; las flechas indican la dirección creciente de la temperatura).

Como ya sabemos, las moléculas estructuradas tienden a presentar una brecha clara entre la primera y la segunda capa de coordinación (lo cual permite que la primera esfera desarrolle una coordinación tetraédrica) y, por otro lado, las moléculas desestructuradas implican un cierto colapso de la segunda capa, con una o más moléculas ocupando posiciones intersticiales y por consiguiente perturbando el orden local de la primera capa [Figura 3.16](#). Sin embargo, un trabajo reciente sugiere que las moléculas desestructuradas podrían ser menos desordenadas de lo esperado y que de hecho muestran una estructura de preferencia [\[224\]](#). Para tener un panorama más preciso, ahora mostramos la función de distribución radial (*Radial Distribution Function*, RDF), para las moléculas T, D y F (que ahora consideramos como un subconjunto de moléculas T las cuales, como ya indicamos, pueden ser consideradas como desestructuradas en base a sus entornos distorsionados térmicamente). La [Figura 3.16](#) nos muestra dichas RDFs en

las configuraciones reales y en las minimizadas (IS).

Si comparamos las RDFs de las moléculas T y D (en ambos esquemas, dinámica real e inherente), encontramos una clara diferencia entre ambas. Las moléculas T muestran una brecha pronunciada entre el primer y el segundo pico (correspondientes a la primera y segunda capa respectivamente), mientras que las moléculas D presentan una población importante en dicha región, un indicador claro de la presencia de moléculas intersticiales. Aun cuando no todas las posiciones intersticiales son igualmente probables hay un pico notable (u hombro). De hecho, la RDF de las moléculas F en la dinámica real presenta cierta población en la región entre picos pero ciertamente no hay evidencia de un pico u hombro. Además, podemos observar que en el esquema minimizado (IS) el pico intersticial es más evidente para las moléculas D en la minimización, mientras que la región entre picos es claramente vaciada para las moléculas F haciendo las curvas casi idénticas a la de las moléculas T en dicho esquema minimizado. Estos resultados sin lugar a duda señalan el hecho que, si intentamos de buscar la conexión entre estructura y dinámica en el régimen sobreenfriado, es necesario discriminar entre moléculas distorsionadas meramente por las fluctuaciones térmicas y las realmente distorsionadas (moléculas defectuosas).

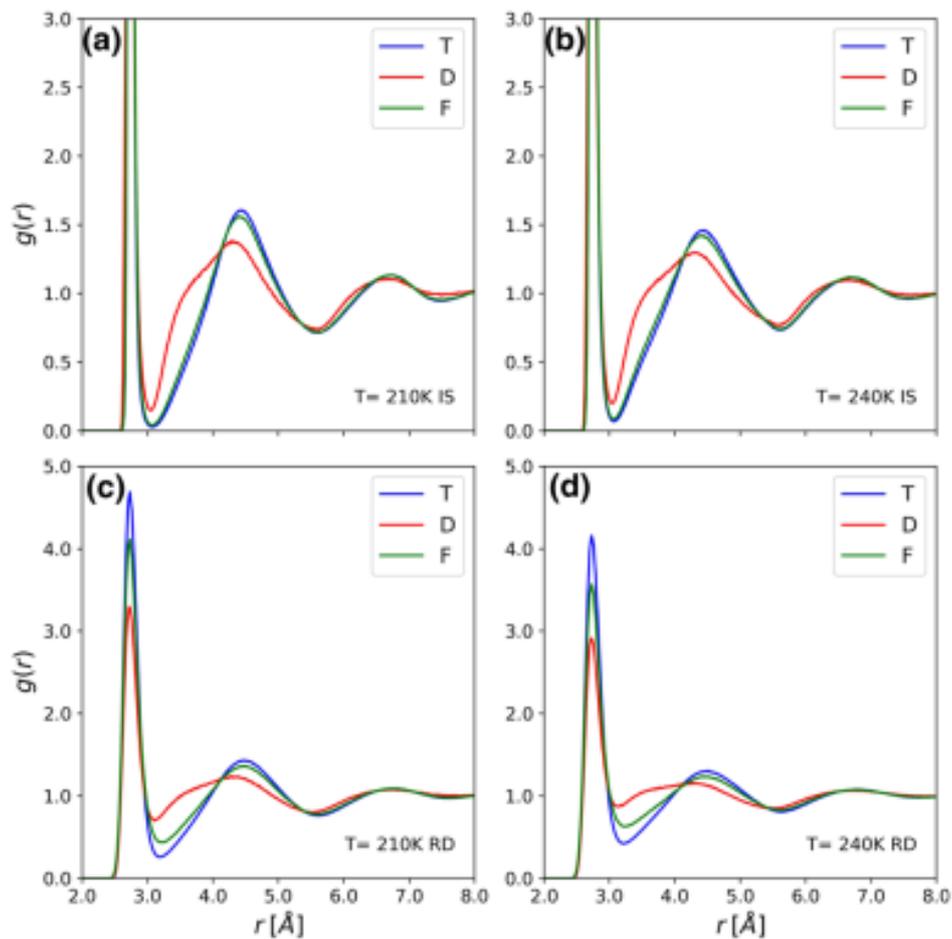


Figura 3.16: Función de distribución radial para las moléculas T, D y F en la dinámica real (RD) y en la dinámica inherente (estructuras inherentes, IS) para el modelo de agua SPC/E a $T = 210$ K y a $T = 240$ K.

A continuación realizamos correlaciones entre la estructura y las propensiones dinámica (tal como fue explicado en la sección anterior [Subsección 3.2.2](#)). En la [Figura 3.17](#), que correlaciona V_4 con propensión dinámica, podemos observar que las moléculas D (la mancha pequeña en el gráfico de contorno) residen en la zona de mayor propensión dinámica: por encima del valor de propensión media enriqueciendo también su contribución a la región del 10% de mayor propensión. Esta correlación entre defectos estructurales y movilidad molecular en la dinámica de relajación del agua se puede hacer evidente gracias a que contamos con un indicador estructural con una capacidad de clasificación precisa, el índice V_4 . Además, recalamos que no hace falta recurrir a un valor promedio del ensamble isoconfiguracional (es decir, a un valor que incluya

explícitamente información dinámica en su definición) para poder cuantificar la estructura local molecular o la energía potencial de las moléculas. Por el contrario, el índice V_4 es una medida directa de la estructura calculada solamente en la configuración estructural inicial.

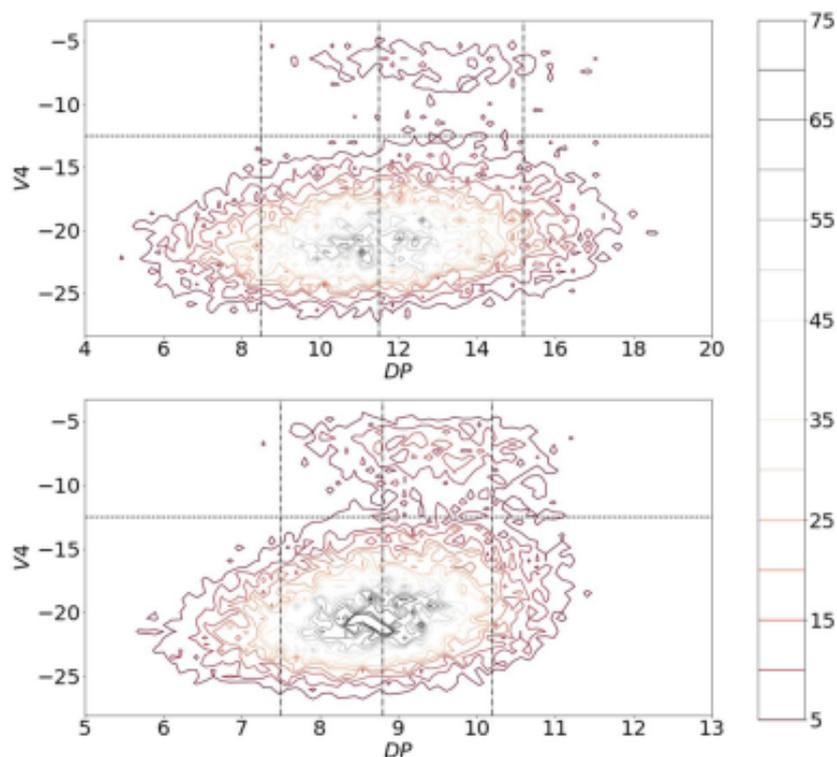


Figura 3.17: Gráficos de contorno de la correlación de V_4 y las dinámicas de propensión para el modelo de agua SPC/E a $T = 210$ K (arriba) y a $T = 240$ K (abajo). En cada caso, la línea horizontal indica el umbral para clasificar moléculas como T y D, mientras que las líneas verticales indican los valores que define el 10% de moléculas con menor propensión, la propensión media y el 10% de moléculas con mayor propensión. En ambos casos, la mancha grande corresponde al valor más bajo de V_4 (región con la población más alta), es decir, a las moléculas estructuradas (T), mientras que las manchas pequeñas contienen a las moléculas desestructuradas (D).

3.2.4. Aplicaciones preliminares del nuevo índice en membranas lipídicas

Dado que una virtud del índice V_4 que propusimos es el hecho de que el mismo es en principio generalizable a contextos no bulk (donde los índices existentes fallan, tal como hemos demostrado previamente en [220]), el mismo es entonces aplicable a contextos como

interfaces y nanoconfinamiento. Y puesto que el índice cuantifica la energética (caracterizando las interacciones moleculares) el mismo permitiría estimar de modo simple y preciso la labilidad del agua de hidratación y, por ende, la reactividad local de las distintas regiones de una macromolécula. En este sentido, es necesario reformular el índice V_4 para incorporar otras interacciones más allá de las interacciones agua-agua de modo de extenderlo a estos contextos. En la hidratación de membranas lipídicas, las interacciones de HB agua-agua que se sacrifican son en general reemplazadas por HB agua-lípido (agua-fosfato y agua-carbonilo), de modo que es necesario generalizarlo para contemplar esta mayor riqueza energética, para luego aplicarlo a distintos lípidos con y sin colesterol y en presencia o no de diversos efectores. Si bien nos pareció importante plantear el tema de la hidratación de membranas de modo completo, más aun considerando los paradigmas modernos que consideran al agua como parte constitutiva de la membrana, todo esto constituye un trabajo muy ambicioso que escapa a los objetivos de esta tesis y que quedará como un desarrollo futuro que dará continuidad a la misma y que ya estamos comenzando a transitar. Ante la falla de los índices previos, el desarrollo de un parámetro de estructura como el V_4 que resultará aplicable en este contexto fue, en tal sentido, el primer paso.

De todos modos, en esta última parte del trabajo de tesis, nos proponemos aplicar el índice V_4 a membranas modelos de DPPC evaluado en diferentes regiones de la misma separadas por 2 Å entre si, donde la región 1 abarca la zona entre 13 y 15 Å desde el centro de la membrana y la región 20 esta ubicada entre 53 y 55 Å . De esta manera nos aseguramos que las regiones 1 y 2 cubren la zona de los carbonilos (por debajo de este punto hay muy poca agua de hidratación), y luego nos alejamos progresivamente hasta llegar a la zona de agua bulk. Es importante mencionar que utilizamos el modelo de agua clásica TIP3P que, si bien no reproduce las propiedades del agua de la misma manera que el modelo SPC/E, es el más utilizado en la literatura en sistemas que involucran membranas y proteínas. En la [Figura 3.18](#) podemos observar la probabilidad de obtener un determinado valor de V_4 para cada región. En este estudio preliminar, utilizaremos el V_4 calculado sobre estructuras reales (sin minimizar). Es evidente que en las primeras regiones, el índice puede presentar algunos problemas al no haber sido adaptado a las interacciones con

el lípido, pero ello no es un problema dado que nos interesa el comportamiento del agua en regiones alejadas de la membrana donde no hay interacciones HB agua-lípido, puesto que se espera que la influencia de la membrana se “sienta” hasta distancias importantes. Es decir, nos interesa determinar la longitud de escala en la que el comportamiento del agua converge al valor del bulk y se espera que ello ocurra relativamente lejos de la ubicación de los extremos de las cabezas polares de los lípidos.

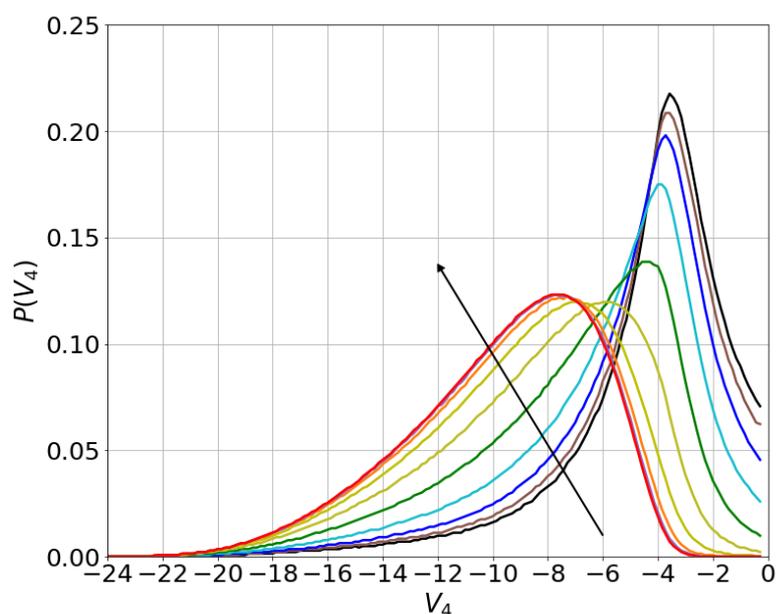


Figura 3.18: $P(V_4)$ para las moléculas de agua en cada región para la membrana pura de DPPC a 323 K. La flecha indica la posición de la región desde el interior de la membrana (carbonilos) hacia el exterior (bulk).

En la [Figura 3.18](#) podemos observar que las primeras regiones tienen los máximos de sus curvas de probabilidad ubicados en valores bajos de V_4 , lo que nos indica que las moléculas de agua estarían formando pocos HBs con otras moléculas de agua. Por otra parte, como es de esperar, a medida que nos alejamos de la membrana el comportamiento del agua se aproxima al del agua bulk, donde las moléculas de agua pueden formar más HBs. De todas formas, al encontrarnos a una temperatura relativamente alta, sobre todo al compararlo con el régimen sobreenfriado (donde el índice fue propuesto inicialmente), las fluctuaciones térmicas no permiten

que los HBs duren demasiado tiempo dando como resultado valores bajos de V_4 incluso en el bulk. Podemos notar también, que recién a partir de la región 10 (es decir, aproximadamente a 20 Å de los carbonilos) la estructura del agua de hidratación es similar a la del bulk, llegando a un resultado consistente con determinaciones previas [130]. Para observar mejor la variación del valor del índice a media que nos alejamos del centro de la membrana, en la [Figura 3.19](#) mostramos el valor medio de V_4 para cada región.

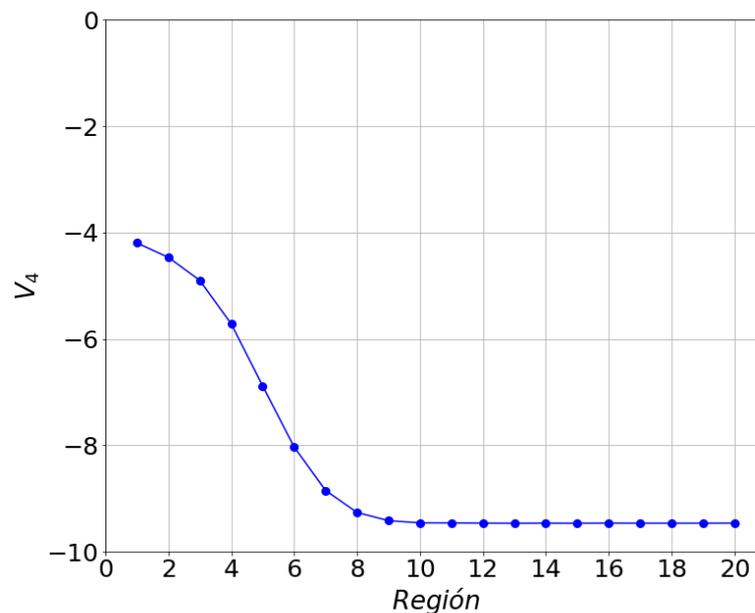


Figura 3.19: Valor medio de V_4 para cada región para la membrana pura de DPPC a 323 K.

Como dicho, es importante reconocer en este punto, que las moléculas de agua pueden también tener interacciones de puente de hidrógeno con los átomos de oxígeno los grupos de la membrana (carbonilos y fosfatos) los cuales no estamos considerando en nuestro cálculo de V_4 . Esta tarea que nos permitiría una descripción más apropiada del agua de hidratación primaria de la membrana, requiere realizar esfuerzos futuros. Ello nos permitiría extenderlo a sistemas más complejos, como los sistemas de DPPC-Chol-DHA estudiados a lo largo de esta tesis.

Capítulo 4

Conclusiones

A modo de conclusión de este trabajo de tesis mostraremos los resultados obtenidos en los diferentes capítulos y sus correspondientes secciones.

En nuestros estudios sobre efectores en membranas lipídicas modelo, comenzamos estudiando las diferencias en estructura y fluidez entre membranas de DPPC y DPPC-DHA, donde los resultados obtenidos concuerdan muy bien con los experimentos realizados por la sub-línea experimental de nuestro grupo de investigación. El DHA es capaz de incorporarse en los liposomas de DPPC y localizarse en la región de la cabeza polar de los lípidos, obteniendo como resultado principal una membrana más fluida. Este arreglo en la estructura de la membrana de DPPC sería esencial para su actividad biológica, tal como se reporta en la literatura. Luego estudiamos un caso más “real” al incorporar el colesterol obteniendo así el sistema ternario DPPC-Chol-DHA, siendo este sistema más representativo de la membrana celular, con el objetivo de observar si el DHA puede revertir los efectos que el Chol produce en las membranas de DPPC. Pudimos determinar que una concentración de 30% de DHA revierte parcialmente los efectos del colesterol en la membrana de DPPC. Además, pudimos evidenciar que el sistema DPPC-Chol-DHA se vuelve más compresible y que el DHA se opone al efecto rigidizante que el Chol produce en las cadenas hidrocarbonadas, incrementando así la fluidez de la membrana. Este fenómeno resulta relevante especialmente en el contexto de enfermedades que tienen su origen en las membranas celulares del cerebro, como la enfermedad de Alzheimer, y son promovidas por

la presencia abundante de colesterol. Finalmente estudiamos los efectos de las xantonas mono y polihidroxilada en membranas de DMPC y DPPC. Estos estudios han dejado en evidencia la existencia de una influencia significativa en las propiedades termodinámicas, volumétricas y mecánicas de las hidroxixantonas sobre las vesículas con la proporción de efectores/lípidos estudiadas. Si bien en términos termodinámicos ambos efectores disminuyen la temperatura de transición de cada lípido, también inducen un empaquetamiento más compacto en ambas membranas. Es esperable que la estructura plana de las xantonas les permita empaquetarse eficientemente entre los lípidos, disminuyendo la compresibilidad, mientras que simultáneamente realizan una disrupción de las interacciones laterales entre cadenas lipídicas (imponiendo desorden en las interacciones y no en la estructura), incrementando así la fluidez de la membrana y disminuyendo la temperatura de fusión. Como última observación podemos afirmar que la combinación de resultados termodinámicos y mecánicos en membranas de DPPC y DMPC en presencia de xantonas, tanto experimentales como computacionales, nos ha permitido resolver el enigma planteado al principio de este trabajo: el orden estructural en la membrana, inducido por la presencia de un efector, no presenta una correlación trivial con la compresibilidad y fluidez de la membrana.

Como ya comentamos a lo largo de este trabajo de tesis, para poder comprender en profundidad las interacciones ligando-membrana es necesario incluir al agua de hidratación dentro de este contexto, por lo que estudiamos dos casos específicos con resultados notables. Por un lado, en una primera instancia, estudiamos como los efectos de la presencia de colesterol en membranas de DMPC y 14:0 Dieter PC (tanto en la fase sólido cristalina como en la líquida cristalina) modifica la distribución de las moléculas de agua, disminuyendo la relajación dipolar del agua de los lípidos de la interfase generando un aumento en la población no relajable. Luego, en un segundo paso, estudiamos los efectos de la incorporación de Chol en membranas lipídicas modelo de DPPC, observando un incremento de la hidrofobicidad local. Este fenómeno podría resultar crucial ya que la reactividad de la membrana se vería aumentada y por lo tanto, se volvería susceptible para interactuar con ligandos como los péptidos amiloides (responsables en

gran parte de la enfermedad de Alzheimer). Nuevamente, el agregado de DHA al sistema DPPC-Chol revierte el efecto del Chol sobre el agua de hidratación, disminuyendo su hidrofobicidad.

Finalmente, hicimos uso de nuestra experiencia previa en el contexto de agua sobreenfriada y agua vítrea (sabiendo que el agua de hidratación de membranas lipídicas guarda cierta reminiscencia vítrea) para establecer las bases de una caracterización más completa del agua de hidratación. Para tal fin, es preciso disponer de un índice de estructura que sea utilizable en dicho contexto, por lo que comenzamos exponiendo algunas limitaciones de los índices previos. A partir de estos estudios desarrollamos un nuevo índice de estructura (el índice V_4) que no presenta los desperfectos con los que contaban los índices anteriores, esta virtud se la atribuimos al hecho que V_4 carece de preconceptos estructurales y esta basado en consideraciones energéticas. En esta tesis, a pesar del camino transitado, solo pudimos aplicar el índice V_4 de manera preliminar en nuestro contexto de interés (el agua de hidratación de membranas lipídicas modelo), pero su implementación en el futuro es una tarea que motivará estudios posteriores.

Bibliografía

- [1] Lipowsky, E. Sackmann. Handbook of Biological Physics, Vol. 1, páginas 403-463. Elsevier, Amsterdam (1995).
- [2] R. Hinz, S. Selvaraj, N. V Murthy, et al., J Cereb Blood Flow Metab, Vol: 28, 0271-678X, paginas: 1478-1490 (2008).
- [3] S. J. Singer, G. L. Nicolson, Science, 175 (4023), 720 (1972).
- [4] R. Aldea, M. TESIS DOCTORAL Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid, España (2013).
- [5] B. P. Rosen, K., E. R. Bacterial Transport, ed. B.P.E. Rosen, New York: Marcel Dekker, 61, (1978).
- [6] P. Méléard, C. G., T. Pott, L. Fernandez-Puente, I. Bivas, M. D. Mitov, J. Dufourcq, P. Bothorel, Biophys. J., 72, 13 (1997).
- [7] W. Rawicz, K. Olbrich, T. McIntosh. Biophys. J. 79, 11 (2000).
- [8] C. Tanford. The Hydrophobic Effect, New York: Wiley (1980).
- [9] J. Israelachvili, Intermolecular and Surface Forces, New York: Academic Press (1992).
- [10] P. Kinnunen, M. Rytömaa, J. Lehtonen. Chem. Phys. Lipids 66, 75 (1993).
- [11] O. G. Mouritsen. En Life-as a matter of fat-The Emerging Science of Lipidomics. Vol.1., Germany: The Frontiers. Collection Springer (2005).

- [12] M. Abramson. *Biochim. Biophys. Acta* 225, 3 (1971).
- [13] P. Overath. *Biochemistry* 12, 9 (1973).
- [14] Yi, P.a.M., R. *Chem. Phys. Lipids* 11, 20 (1973).
- [15] H. W. Meyer, A. M. Richter. *Journal Struct. Biol.* 124, 10 (1998).
- [16] W. Stillwell, S. R. Wassall. *Chem. Phys. Lipids* 126, 1 (2003).
- [17] S. R. Wassall, M. R. Brzustowicz, S. R. Shaikh, V. Cherezov, M. Caffrey, W. Stillwell. *Chem. Phys. Lipids* 132, 79 (2004).
- [18] M. Ibarguren, D. J. López, P. V. Escribá. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1518 (2014).
- [19] A. Leyva-Rendón. *Rev. Mex Neuroci* 12 365 (2011).
- [20] Docosahexaenoic Acid. *Alternative Medicine Rev.* 14, 391 (2009).
- [21] A. P. Simopoulos. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 11, 163 (2002).
- [22] R. C. Valentine, D. L. Valentine. *Progress in Lipid Research* 43, 383 (2004).
- [23] H. F. Turk, R. S. Chapkin. *Prostaglandins, Leukotrienes. Essential Fatty Acids* 88, 43 (2013).
- [24] G. Vitiello, S. Di Marino, A. M. D' Ursi, G. D' Errico. *Langmuir* 29, 14239 (2013).
- [25] D. Papahadjopoulos, S. Hui, W. J. Vail, G. Poste. *Biochim. Biophys. Acta* 448, 245 (1976).
- [26] H. L. Kantor, S. Mabrey, J. H. Prestegard, J. M. Sturtevant. *Biochim. Biophys. Acta* 466, 402 (1977).
- [27] J. M. H. Kremer, P. H. Wiersema. *Biochim. Biophys. Acta* 471, 348 (1977).
- [28] S. Mabrey, J. M. Sturtevant. *Biochim, Biophys. Acta* 486, 444 (1977).
- [29] H. L. Kantor, J. H. Prestegard. *Biochem*, 17, 3592 (1978).
- [30] K. Ichihara, M. El-Zayat, C. K. Mittal, F. Murad. *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 44 (1979).

- [31] M. J. Karnovsky. *Am. J. Pathol.* 97, 211 (1979).
- [32] Y. K. Tsao, W. E. M. Lands. *Science* 207, 777 (1980).
- [33] T. K. Ray, V. P. Skipski, M. Barclay, E. Essner, F. M. Archibald. *J. Biol. Chem.* 244, 5528 (1969).
- [34] R. P. Bazinet, S. Laye. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 771 (2014).
- [35] A. A. Spector. *J. Mol. Neurosci.* 16, 159 (2001).
- [36] N. Attar-Bashi, A. Sinclair. *DHA is a Building Block for the Brain*. Ph.D. Thesis, RMIT University (2004).
- [37] D. F. Horrobin. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 60, 431 (1999).
- [38] L. D. Lawson, B. G. Hughes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152, 328 (1998).
- [39] J. P. Schuchardt, I. Schneider, H. Meyer, J. Neubronner, C. V. Schacky, A. Hahn. *Lipids Health Dis.* 10, 1 (2011).
- [40] M. Ouellet, V. Emond, C. T. Chen, C. Julien, F. Bourasset, S. Oddo, F. LaFerla, R. P. Bazinet, F. Calon. *Neurochem. Int.* 55, 476 (2009).
- [41] V. Martín, N. Fabelo, G. Santpere, B. Puig, R. Marín, I. Ferrer, M. Díaz. *J. Alzheimers Dis* 19, 489 (2010).
- [42] N. Fabelo, V. Martín, G. Santpere, R. Marín, L. Torrent, I. Ferrer, M. Díaz. *Mol. Med.* 17, 1107 (2011).
- [43] J. H. Menkes, M. Alter, G. K. Steigleder, D. R. Weakley, J. H. Sung. *Pediatrics* 29, 764 (1962).
- [44] E. E. Birch, D. G. Birch, D. R. Hoffman, R. Uauy. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 33, 3242 (1992).
- [45] U. N. Das. *Biotechnol. J.* 1, 420 (2006).

- [46] A. W. Elias, D. Chapman, D. F. Ewing. *Biochim. Biophys. Acta* 448, 220 (1976).
- [47] S. Mabrey, J. M. Sturtevant. *Biochim. Biophys. Acta* 486, 444 (1977).
- [48] H. L. Kantor, J. H. Prestegard. *Biochemistry* 17, 3592 (1978b).
- [49] S. E. Schullery, T. A. Seder, D. A. Weinstein, D. A. Bryant. *Biochemistry* 20, 6818 (1981)
- [50] J. R. Usher, R. M. Epanand, D. Papahadjopoulos. *Chem. Phys. Lipids* 22, 245 (1978).
- [51] R. D. Klausner, A. M. Kleinfeld, R. L. Hoover, M. J. Karnovsky. *J. Biol. Chem.* 255, 1286 (1980).
- [52] M. J. Karnovsky, A. M. Kleinfeld, R. L. Hoover, R. D. Klausner. *J. Cell Biol.* 94, 1 (1982).
- [53] F. Podo, J. K. Blasie. *Biochim. Biophys. Acta* 419, 1 (1976).
- [54] D. Marsh, J. M. Seddon. *Biochim. Biophys. Acta* 690, 117 (1982).
- [55] J. M. H. Kremer, P. H. Wiersema. *Biochim. Biophys. Acta* 471, 348 (1977b).
- [56] H. Hauser, W. Guyer, K. Howell. *Biochem.* 18, 3285 (1979).
- [57] K. Peter Pauls, M. L. Alex, B. Myer. *Biochem.* 22, 6101 (1983).
- [58] D. Fodor, R. M. Epanand. *Chem. Phys. Lipids* 28, 159 (1981).
- [59] S. E. Schullery, T. A. Seder, D. A. Weinstein, D. A. Bryant. *Biochemistry* 20, 6818 (1982).
- [60] R. M. Epanand, R. F. Epanand, N. Ahmed, R. Chen. *Chem. Phys. Lipids* 57, 75 (1991).
- [61] M. Ibarguren, D. J. López, P. V. Escribá. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1518 (2014).
- [62] Y. Onuki, M. Morishita, Y. Chiba, S. Tokiwa, K. Takayama. *Chem. Pharm. Bull.* 54, 68 (2006).
- [63] G. Lenaz. *Biosci. Rep.* 7, 823 (1987).
- [64] A. Cordomi, J. Prades, J. Frau, O. Vögler, S. S. Funari, J. J. Pérez, P. V. Escribá, F. Barceló. *J. Lipid Res.* 51, 1113 (2010).

- [65] W. Ehringer, D. Belcher, S. R. Wassall, W. Stillwell. *Chem. Phys. Lipids* 54, 79 (1990).
- [66] S. C. R. Sherratt, R. P. Mason. *Chem. Phys. Lipids* 212, 73 (2018).
- [67] M. Edidin, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32, 257 (2003).
- [68] S. R. Wassall, X. Leng, S. W. Canner, E. R. Pennington, J. J. Kinnun, A. T. Cavazos, S. Dadoo, D. Johnson, F. A. Heberle, J. Katsaras, S. R. Shaikh, *Biochim. Biophys. Acta* 1860, 1985 (2018).
- [69] R. P. Mason, T. N. Tulenko, R. F. Jacob, *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 198 (2003).
- [70] G. P. Gellermann, T. R. Appel, A. Tannert, A. Radestock, P. Hortschansky, V. Schroeckh, C. Leisner, T. Lütkepohl, S. Shtrasburg, C. Rocken, M. Pras, R. P. Linke, S. Diekmann, M. Fandrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6297 (2005).
- [71] T. Mori, D. Paris, T. Town, A. M. Rojiani, D. L. Sparks, A. Delledonne, F. Crawford, L. I. Abdullah, J. A. Humphrey, D. W. Dickson, M. J. Mullan, C. J. *Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 778 (2001).
- [72] J. Popp, S. Meichsner, H. Kolsch, P. Lewczuk, W. Maier, J. Kornhuber, F. Jessen, D. Lütjohann, *Biochem. Pharmacol* 86, 37 (2013).
- [73] F. M. Goñi, *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1467 (2014).
- [74] G. S. R. Subba Rao, S. Raghavan. *J. Indian Inst. Sci.* 81, 393 (2001).
- [75] M. E. Sousa, M. M. Pinto. *Curr. Med. Chem.* 12, 2447 (2005).
- [76] R. Castanheiro, M. Pinto, S. Cravo, D. Pinto, A. Silva, A. Kijjoa. *Tetrahedron* 65, 3848 (2009).
- [77] J. Li, S. Liu, J. Koh, H. Zou, R. Lakshminarayanan, Y. Bai, K. Pervushin, L. Zhou, C. Verma, R. Beuerman. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848, 1023 (2015).

- [78] J. Koh, S. Qiu, H. Zou, R. Lakshminarayanan, J. Li, X. Zhou, C. Tang, P. Saraswathi, C. Verma, D. Tan, A. Tan, S. Liu, R. Beuerman. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr* 1828, 834 (2013).
- [79] J. Koh, H. Zou, S. Lin, H. Lin, R. Soh, F. Lim, W. Koh, J. Li, R. Lakshminarayanan, C. Verma, D. Tan, D. Cao, R. Beuerman, S. Liu. *J. Med. Chem.* 59, 171 (2016).
- [80] M. Wang, K. Zhang, Q. Gu, X. Bi, J. Wang. *Chin. J. Nat. Med.* 15, 81 (2017) and references therein.
- [81] B. E. Evans, K. E. Rittle, M. G. Bock, R. M. DiPardo, R. M. Freidinger, W. L. Whitter, G. F. Lundell, D. F. Veber, P. S. Anderson, R. S. L. Chang, V. J. Lotti, D. J. Cerino, T. B. Chen, P. J. Kling, K. A. Kunkel, J.P. Springer, J. Hirshfieldt. *J. Med. Chem.* 31, 2235 (1988).
- [82] M. B. Sierra, L. M. Alarcón, D. Gerbino, V. I. Pedroni, F. Buffo, M. A. Morini. *Chem. Phys. Lipids* 206, 1 (2017).
- [83] P. Rybar, R. Krivanek, T. Samuely, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, T. Hianik. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1466 and references cited herein (2007).
- [84] T. Hianik, V. I. Passechnik, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands (1995).
- [85] H. R. Corti, G. A. Appignanesi, M. C. Barbosa et al. *Eur. Phys. J. E* 44, 136 (2021).
- [86] P. Gallo, J. Bachler, G. A. Appignanesi et al. *Eur. Phys. J. E* 44, 143 (2021).
- [87] D. C. Malaspina, Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur (Argentina), (2011).
- [88] H. J. C. Berendsen, J. R. Grigera, T. P. Stroatsma, *J. Phys. Chem.* 91, 6269 (1987).
- [89] M. W. Mahoney and W. L. Jorgensen, *J. Chem. Phys.* 112, 8910 (2000).
- [90] https://water.lsbu.ac.uk/water/water_models.html
- [91] P. H. Poole, F. Sciortino, U. Essmann, H. E. Stanley. *Nature* 360, 324 (1992).

- [92] O. Mishima, L.D. Calvert, E. Whalley. *Nature* 310, 393 (1984).
- [93] O. Mishima, L.D. Calvert, E. Whalley. *Nature* 314, 76 (1985).
- [94] G. Debenedetti, F. Sciortino, G. H. Zerze. *Science* 369, 289 (2020).
- [95] P. Gallo, K. Amann-Winkel, C. A. Angell, M. A. Anisimov, F. Caupin, C. Chakravarty, E. Lascaris, T. Loerting, A. Z. Panagiotopoulos, J. Russo, J. A. Sellberg, H. E. Stanley, Ha. Tanaka, C. Vega, L. Xu, L. G. M. Pettersson. *Chem. Rev.* 116, 7463 (2016).
- [96] H. E. Stanley. En *Hydration Processes in Biology: Theoretical and Experimental Approaches*. Proceedings of the NATO Advanced Study Institutes; Bellissent-Funel, M. -C., Ed.; IOS Press: Amsterdam, 1999; Vol. 305; Capitulo 1, Opening Course, 1998 Les Houches School, pp 3313-3327.
- [97] N. Giovambattista, T. Loerting, B. R Lukanov, F. W. Starr. *Sci. Rep.* 2, 1 (2012).
- [98] E. Shiratani, M. Sasai. *J. Chem. Phys.* 104, 7671 (1996).
- [99] E. Shiratani, M. Sasai. *J. Chem. Phys.* 108, 3264 (1998).
- [100] G. A. Appignanesi, J. A. Rodriguez Fris, F. Sciortino. *Eur. Phys. J. E* 29, 305 (2009).
- [101] S. R. Accordino, J. A. Rodriguez Fris, F. Sciortino, G. A. Appignanesi. *Eur. Phys. J. E* 34, 48 (2011).
- [102] J. M. Montes de Oca, F. Sciortino, G. A. Appignanesi. *J. Chem. Phys.* 152, 244503 (2020).
- [103] A. R. Verde, J. M. Montes de Oca, S. R. Accordino, L. M. Alarcón, G.A. Appignanesi. *Eur. Phys. J. E* 44:47 (2021).
- [104] N. J. Munn, E. Arnio, D. Liu, R. A. Zoeller, L. Liscum. *J. Lipid Res.* 44, 182 (2003).
- [105] K. Gorgas, A. Teigler, D. Komljenovic, W. W. Just. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1763, 1511 (2006).
- [106] R. M. Epand. *Prog. Lipid Res.* 45, 279 (2006).

- [107] H. Heerklotz, A. Tsamaloukas. *Biophys. J.* 91, 600–607 (2006).
- [108] E. A. Disalvo, O. A. Pinto, M. F. Martini, A. M. Bouchet, A. Hollmann, M. A. Frías. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1848, 1552 (2015).
- [109] D. Marsh. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1798, 688–699 (2010).
- [110] L. A. Bagatolli, Monitoring membrane hydration with 2-(dimethylamino)-6-acylnaphthalenes fluorescent probes, en: *Membr. Hydration*, Springer, pp. 105–125 2015.
- [111] T. Parasassi, M. Di Stefano, M. Loiero, G. Ravagnan, E. Gratton. *Biophys. J.* 66, 763 (1994).
- [112] H. A. Pérez, A. Disalvo, M.d.l.A. Frías. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 178, 346 (2019).
- [113] J. A. Mondal, S. Nihonyanagi, S. Yamaguchi, T. Tahara. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 7842 (2012).
- [114] E. A. Disalvo, F. Lairion, F. Martini, E. Tymczyszyn, M. Frías, H. Almaleck, G. J. Gordillo. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1778, 2655 (2008).
- [115] A. S. Rosa, J. P. Cejas, E. A. Disalvo, M. A. Frías. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1861, 1197 (2019).
- [116] H. A. Pérez, J. P. Cejas, A. S. Rosa, R. E. Giménez, E. A. Disalvo, M. A. Frías. *Langmuir* 36, 2644 (2020).
- [117] N. Watanabe, K. Suga, J. P. Slotte, T. K. M. Nyholm, H. Umakoshi. *Langmuir* 35, 6762 (2019).
- [118] T. Parasassi, G. De Stasio, G. Ravagnan, R.M. Rusch, E. Gratton. *Biophys. J.* 60, 179 (1991).
- [119] J. M. Dean, I. J. Lodhi. *Protein Cell* 9, 196–206 (2018).

- [120] J. Pan, X. Cheng, F.A. Heberle, B. Mostofian, N. Kučerka, P. Drazba, J. Katsaras. J. Phys. Chem. B 116, 14829 (2012).
- [121] C-Y Cheng et al. J. Chem. Phys. 141, 22D513 (2014).
- [122] D. M. Elola, J. Rodríguez. J. Phys. Chem. B 122, 5897 (2018).
- [123] L. M. Alarcón, J. A. Rodríguez Fris, M. A. Morini, M. B. Sierra, S. A. Accordino, J. M. Montes de Oca, V. I. Pedroni, G. A. Appignanesi, In “Membrane Hydration”, Editor: E. A. Disalvo, Springer Verlag, Berlin (2015).
- [124] C. A. Menéndez, S. R. Accordino, D. C. Gerbino, G. A. Appignanesi. Eur. Phys. J. E 38, 107 (2015).
- [125] Dynamic Analysis of Backbone-Hydrogen-Bond Propensity for Protein Binding and Drug Design, C. A. Menéndez, S. R. Accordino, J. A. Rodriguez Fris, D. C. Gerbino and G. A. Appignanesi, en “Biopolymers for Medical Applications”, J. M. Ruso and P. V. Messina eds., CRC Press, ISBN 9781498744966 - CAT# K26920 (2016).
- [126] J. M. Montes de Oca Joan, J. A. Rodriguez Fris Ariel, G. A. Appignanesi, A. Fernández. FEBS J 281, 3079 (2014).
- [127] S. R. Accordino, M. A. Morini, M. B. Sierra, J. A. Rodríguez Fris, G. A. Appignanesi, A. Fernández. Proteins: Structure, Function and Bioinformatics 80, 1755 (2012).
- [128] S. R. Accordino, J. A. Rodríguez Fris, G. A. Appignanesi and A. Fernández, Eur. Phys. J. E 35, 59 (2012).
- [129] J. Habchi, S. Chia, C. Galvagnion, T. C. T. Michaels, M. M. J. Bellaiche, F. S. Ruggeri, M. Sanguanini, I. Idini, J. R. Kumita, Em. Sparr, S. Linse, C. M. Dobson, T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo. Nature Chemistry 10, 673 (2018).
- [130] F. Martelli, J. Crain, and G. Franzese. ACS Nano 14, 8616 (2020).
- [131] E. A. Disalvo, M. A. Frias. Langmuir 29, 6969 (2013).

- [132] D. Frenkel, B. Smith: Understanding Molecular Simulations. Academic Press, San Diego (1996).
- [133] W. C. Swope, H. C. Andersen, P. H. Berens, K. R. Wilson. *J. Chem. Phys.*, 76, 637 (1983).
- [134] D. A. Case, V. Babin, J. Berryman, R. M. Betz, Q. Cai, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham III, T.A. Darden, R. E. Duke, H. Gohlke, A. W. Goetz, S. Gusarov, Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. M. Merz, F. Paesani, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C. L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, P. A. Kollman. Amber 14. University of California, San Francisco (2014).
- [135] S. Jo, J.B. Lim, J.B. Klauda, W. Im. *Biophys. J.* 97, 50 (2009).
- [136] D. A. Case, R. M. Betz, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham III, T. A. Darden, R. E. Duke, T. J. Giese, H. Gohlke, A. W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K. M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C. L. Simmerling, W. M. BotelloSmith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, P.A. Kollman. AMBER 2016, University of California, San Francisco (2016).
- [137] I. R. Gould, A. A. Skjevik, C. J. Dickson, B. D. Madej, R. C. Walker, *Manuscr. Prep.* (2018).
- [138] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, *J. Comput. Chem.* 25, 1157 (2004).
- [139] <https://ambermd.org/AmberTools.php>
- [140] R. W. Pastor, B. R. Brooks, A. Szabo. *Mol. Phys.* 65, 1409 (1988).
- [141] H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel, and R. van Drunen, *Comput. Phys. Commun.* 91, 43 (1995).

- [142] A. R. Verde, M. B. Sierra, L. M. Alarcón, V. I. Pedroni, G. A. Appignanesi, M. A. Morini. *Chemistry and Physics of Lipids* 217, 12 (2018).
- [143] M. A. Morini, M. B. Sierra, V. I. Pedroni, L. M. Alarcón, G. A. Appignanesi, E. A. Disalvo. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 131, 54 (2015).
- [144] M. B. Sierra, V. I. Pedroni, F. E. Buffo, E. A. Disalvo, M. A. Morini. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 142, 199 (2016).
- [145] H. Hauser, I. Pascher, R. H. Pearson, S. Sundell. *Biochim. Biophys. Acta* 650, 21 (1981).
- [146] W. W. Sulkowski, D. Pentak, K. Nowak, A. Sulkowska. *J. Mol. Struct* 744 (2005).
- [147] D. P. Tieleman, S. J. Marrink, H. J. C. Berendsen. *Biochim. Biophys. Acta* 1331, 235 (1997).
- [148] J. F. Nagle, D. A. Wilkinson. *Biophys. J.* 23, 159 (1978).
- [149] X. Leng, J. Kinnun, A. Cavazos, S. Canner, S. Shaikh, S. Feller, S. Wassall. *Biochim. Biophys. Acta* 1860, 1125 (2018).
- [150] A. Yoshida, A. Manosroi, J. Manosroi, H. Yamauchi, M. Abe. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 4, 423 (1995).
- [151] D. A. Brown, E. London, *J. Membr. Biol.* 164 (2) 103 (1998).
- [152] S. A. Pandit, D. Bostick, M.L. Berkowitz. *Biophys. J.* 86 1345 (2004).
- [153] A. A. Jovanovic, B. D. Balanc, A. Ota, P. A. Grabnar, V. B. Djordjevic, K. P. Savikin, B. M. Bugarski, V. A. Nedovic, N. P. Ulrih. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 120, 1800039 (2018).
- [154] C. Silva, F. Aranda, A. Ortiz, V. Martínez, M. Carvajal, J. Teruel. *J. Colloid Interface Sci.* 358 192 (2011).
- [155] M. Ricci, R. Olivia, P. Del Vecchio, M. Paolantoni, A. Moressi, P. Sassi. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 3024 (2016).

- [156] A. Magarkar, V. Dhawan, P. Kallinteri, T. Viitala, M. Elmowafy, T. Rog, A. Bunker. *Sci. Rep.* 4, 05005 (2014).
- [157] S. E. Feller. *Chem. Phys. Lipids* 153, 76 (2008).
- [158] O. Soubias, K. Gawrisch. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 6678 (2007).
- [159] R. P. Mason, R. F. Jacob, S. Shrivastava, S. C. R. Sherratt, A. Chattopadhyay. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 3131 (2016).
- [160] J.A. Williams, S.E. Batten, M. Harris, B.D. Rockett, S.R. Shaikh, W. Stillwell, S.R. Wassall. *Biophys. J.* 103, 228 (2012).
- [161] V. I. Pedroni, M. B. Sierra, L. M. Alarcón, A. R. Verde, G. A. Appignanesi, M. A. Morini. *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes* 1863, 183584 (2021).
- [162] T. Róg, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, M. Karttunen. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 97 (2009).
- [163] T. Hianik, P. Rybár, R. Krivánek, M. Petříková, M. Roudna, H. Apell. *Gen. Physiol. Biophys.* 30, 145 (2011).
- [164] K. Tu, M. L. Klein, D. J. Tobias, *Biophys. J.* 75, 2147 (1998).
- [165] A. M. Smondyrev, M. L. Berkowitz, *Biophys. J.* 7,7 2075 (1999).
- [166] M. A. Morini, V. I. Pedroni, L. M. Alarcón, A. R. Verde, P. Mendioroz, G. A. Appignanesi, M. B. Sierra. *Chem. Phys. Lipids* 231, 104938 (2020).
- [167] O. G. Mouritsen, L. A. Bagatolli, *Life as a matter of fat: lipids in a membrane biophysics perspective*, en: *The Frontiers Collection*, 2nd edition, Springer (2016).
- [168] N. Kucerka, D. Marquardt, T.A. Harroun, Mu-Ping Nieh, S.R. Wassall, J. Katsaras, J. *Am. Chem. Soc.* 131, 16358 (2009).
- [169] S. R. Wassall, W. Stillwell, *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 24 (2009).

- [170] R. P. Mason. *Curr. Atheroscler. Rep.* 21, 1 (2019).
- [171] Y. Onuki, C. Hagiwara, K. Sugibayashi, K. Takayama, *Chem. Pharm. Bull.* 56, 1103 (2008).
- [172] R. Krivanek, P. Rybar, E. Prenner, R. N. J. McElhaney, T. Hianik. *Biochim. Biophys. Acta* 1510, 452 (2001).
- [173] L. Okoro. *Int. J. Chem.* 3, 1 (2011).
- [174] A. Colotto, D. Kharakoz, K. Lohner, P. Laggner. *Biophys. J.* 65 (6), 2360 (1993).
- [175] S. Halstenberg, T. Heimburg, T. Hianik, U. Kaatze, R. Krivanek. *Biophys. J.* 75, 264 (1998).
- [176] A. P. Sarvazyan. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20, 321 (1991).
- [177] D. P. Kharakoz, A. Colotto, K. Lohner, P. Laggner. *J. Phys. Chem.* 97, 9844 (1993).
- [178] T. Heimburg. *Biochim. Biophys. Acta* 1415, 147 (1998).
- [179] G. Pabst, C. Loney, M. Vandenbranden, J. Jestin, A. Radulescu, J. Ruyschaert, T. Gutberlete. *Soft Matter* 8, 7243 (2012).
- [180] S. Mitaku, A. Ikegami, A. Sakanishi. *Biophys. Chem.* 8, 295 (1978).
- [181] A. A. Skjervik, B. D. Madej, C. J. Dickson, C. Lin, K. Teigen, R. C. Walker, I. R. Gould. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18, 10573 (2016).
- [182] J. P. Cejas, A. S. Rosa, H. A. Pérez, L. M. Alarcón, C. Menéndez, G. A. Appignanesi, E. A. Disalvo, M. A. Frías. *Colloid Interface Sci. Commun.* 26, 24 (2018).
- [183] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer science & business media (2013).
- [184] J. D. Nickels, J. Katsaras, *Water and lipid bilayers*, en: *Membr. Hydration*, Springer, 2015, pp. 45–67.

- [185] T. Parasassi, M. Di Stefano, M. Loiero, G. Ravagnan, E. Gratton. *Biophys. J.* 66, 120 (1994).
- [186] M. Bacalum, B. Zorila, M. Radu. *Anal. Biochem.* 440, 123 (2013).
- [187] T. Parasassi, G. De Stasio, A. D'Ubaldo, E. Gratton. *Biophys. J.* 57, 1179 (1990).
- [188] L. M. Alarcón, M. de los Angeles Frías, M.A. Morini, M. Belén Sierra, G. A. Appignanesi, E. A. Disalvo. *Eur. Phys. J. E.* 39, 94 (2016).
- [189] D. C. Malaspina, E. P. Schulz, L. M. Alarcón, M. A. Frechero, G. A. Appignanesi. *Eur. Phys. J. E.* 32, 35 (2010).
- [190] L. M. Alarcón, D. C. Malaspina, E. P. Schulz, M.A. Frechero, G. A. Appignanesi. *Chem. Phys.* 388, 47 (2011).
- [191] S. R. Accordino, D. C. Malaspina, J. A. Rodríguez Fris, L. M. Alarcón, G. A. Appignanesi. *Phys. Rev. E* 85 (3), 031503, 16 (2012).
- [192] T. Parasassi, G. Ravagnan, R.M. Rusch, E. Gratton. *Photochem. Photobiol.* 57, 403 (1993).
- [193] S. Damodaran. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 11, 231 (1998).
- [194] E. A. Disalvo, A. Hollmann, M. F. Martini, Hydration in lipid monolayers: correlation of water activity and surface pressure, in: *Membr. Hydration*, Springer, 2015, pp. 213–231.
- [195] T. J. McIntosh, S. A. Simon, J. P. Dilger. *Water Transp. Biol. Membr.* 1, 1 (1989).
- [196] R. Godawat, S. N. Jamadagni, S. Garde. *Proc. Natl Acad Sci U S A.* 106, 15119 (2009).
- [197] S. Jamadagni, R. Godawat, S. Garde. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2, 147 (2011).
- [198] C. A. Menéndez, S. R. Accordino, D. C. Gerbino, G. A. Appignanesi. *PloS one* 11, e0165767 (2016).
- [199] L. M. Alarcón, J. M. Montes de Oca, S. A. Accordino, J. A. Rodríguez Fris, G. A. Appignanesi. *Fluid Phase Equilibria* 362, 81 (2014).

- [200] J. M. Montes de Oca, C. A. Menéndez, S. R. Accordino, D. C. Malaspina, G. A. Appignanesi. *Eur. Phys. J. E* 40, 78 (2017).
- [201] Y. Liu, B. Ren, Y. Zhang, Y. Sun, Y. Chang, G. Liang, L. Xu, J. Zheng. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 2860, 1906 (2018).
- [202] J. Russo H. Tanaka, *Nat. Commun.* 5, 3556 (2014).
- [203] R. Shi H. Tanaka, *J. Chem. Phys.* 148, 124503 (2018).
- [204] R. G. Fernandez, J. L. F. Abascal, C. Vega, *J. Chem. Phys.* 124, 144506 (2006).
- [205] J. M. Montes de Oca, J. A. Rodriguez Fris, S. R. Accordino, D. C. Malaspina, G. A. Appignanesi. *Eur. Phys. J. E* 39, 124 (2016).
- [206] A. R. Verde, J. M. Montes de Oca, S. R. Accordino, L. M. Alarcón, G. A. Appignanesi. *J. Chem. Phys.* 150, 244504 (2019).
- [207] A. Widmer-Cooper, P. Harrowell, H. Fynewever. *Phys. Rev. Lett.* 93, 135701 (2004).
- [208] A. Widmer-Cooper P. Harrowell. *Phys. Rev. Lett.* 96, 185701 (2006).
- [209] A. Widmer-Cooper P. Harrowell. *J. Chem. Phys.* 126, 154503 (2007).
- [210] G. A. Appignanesi, J. A. Rodriguez Fris, M. A. Frechero. *Phys. Rev. Lett.* 96, 237803 (2006).
- [211] J. A. Rodriguez Fris, L. M. Alarcón, G. A. Appignanes. *Phys. Rev. E* 76, 011502 (2007).
- [212] M. A. Frechero, L. M. Alarcón, E. P. Schulz, G. A. Appignanesi, *Phys. Rev. E* 75, 011502 (2007).
- [213] J. A. Rodriguez Fris, L. M. Alarcón, G. A. Appignanesi. *J. Chem. Phys.* 130, 024108 (2009).
- [214] D. Malaspina, E. P. Schulz, M. A. Frechero, G. A. Appignanesi. *Physica A* 388, 3325 (2009).

- [215] D. C. Malaspina, J. A. Rodriguez Fris, G. A. Appignanesi, F. Sciortino, EuroPhys. Lett. 88, 16003 (2009).
- [216] G. S. Matharoo, M. S. Gulam Razul, P. H. Poole. Phys. Rev. E 74, 050502(R) (2006).
- [217] M. Fitzner, G. C. Sosso, S. J. Cox, A. Michaelides. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116, 2009 (2019).
- [218] C. Donati, J. F. Douglas, W. Kob, S. J. Plimpton, P. H. Poole, S. C. Glotzer, Phys. Rev. Lett. 80, 2338 (1998).
- [219] N. Giovambattista, S. V. Buldyrev, F. W. Starr, H. Eugene Stanley. Phys. Rev. Lett. 90, 085506 (2003).
- [220] S. R. Accordino, D.C. Malaspina, J. A. Rodriguez Fris, G. A. Appignanesi. Phys. Rev. Lett. 106, 029801 (2011).
- [221] J. Gelman Constantin, J. A. Rodriguez Fris, G. A. Appignanesi, M. Carignano, I. Szleifer, H. Corti. Eur. Phys. J. E 34, 126 (2011).
- [222] F. Martelli, H.-Y. Ko, E.C. Oğuz. Phys. Rev. B 97, 064105 (2018).
- [223] F. Martelli, H.-Y. Ko, C. Calero Borallo, G. Franzese. Front. Phys. 13, 136801 (2018).
- [224] J. M. Montes de Oca, S. R. Accordino, A. R. Verde, L. M. Alarcón, G. A. Appignanesi. Phys. Rev. E 99, 062601 (2019).
- [225] E. P. Schulz, L. M. Alarcón, G. A. Appignanesi. The European Physical Journal E 34, 1 (2011).
- [226] S. R. Accordino, J. M. Montes de Oca, J. A. Rodriguez Fris, G. A. Appignanesi. The Journal of chemical physics 143, 154704 (2015).
- [227] G. A. Appignanesi, J. A. Rodriguez Fris, R. A. Montani, W. Kob. Physical Review Letters 96, 057801 (2006).

-
- [228] J. A. Rodríguez Fris, G. A. Appignanesi, E. La Nave, F. Sciortino. *Physical Review E* 75, 041501 (2007).
- [229] J. A. Rodríguez Fris, L. M. Alarcón, G. A. Appignanesi. *Physical Review E* 76, 011502 (2007).
- [230] A. R. Bizzarri, S. Cannistraro. *J. Phys. Chem. B* 106, 6617 (2002).

