

**Estudio de dinámica molecular de un modelo de bicapa lipídica del estrato córneo
constituido por CER[NP] y CER[AP]**

Natalia Rivero Arenas

Trabajo de Grado para Optar el título de Química

Director

Markus Hans Oliver Doerr

Dr. rerum naturalium

Codirectora

Martha Cecilia Daza Espinosa

Dra. en Ciencias - Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2019

Dedicatoria

A mi madre.

Por dejar en mí un legado de dulzura.

Por ser siempre la mejor maestra de vida.

Por no dudar un segundo en entregar su infinito amor.

Por ser esa voz que lo alivia todo.

A mi padre.

Por ser ejemplo de resiliencia.

Por impulsarme siempre a mejorar.

Por demostrarme que las barreras no son inquebrantables.

A mi hermana.

Por estar presente en los más bonitos recuerdos de mi infancia.

Por caminar junto a mí y no soltarme durante los momentos buenos y los no tan buenos.

Por ser la mejor compañera de vida.

Por sonreír con cada triunfo.

Su amor es mi energía y mi motor.

Agradecimientos

Durante el proceso de realización de este Trabajo de Grado muchas personas han contribuido de innumerables maneras para su culminación.

En primer lugar, quiero darles mis más sinceros agradecimientos a los directores de este trabajo, *Markus Hans Oliver Doerr* y *Martha Cecilia Daza Espinosa*, por confiar en mí, guiarme, darme sus sabios consejos, corregirme con asertividad y sobre todo por brindarme su valiosa amistad.

A *Yanis Ricardo Espinosa Silva*, quien durante su estancia postdoctoral me orientó con amabilidad y paciencia en el uso de los programas de simulación de dinámica molecular.

A la *Universidad Industrial de Santander* por permitirme acceder a una educación superior pública y de calidad, ayudarme a formar una posición crítica frente la realidad social del país y convertirme en una profesional que desde ahora quiere dejar en alto el nombre de esta institución.

A *todos mis compañeros y próximos colegas* por brindarme sus más sinceras sonrisas y los mejores recuerdos durante el transcurso de la carrera.

A todos, infinitas gracias.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	14
1. Justificación	17
2. Objetivos.....	19
2.1 Objetivo General.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. Marco teórico.....	20
3.1. El estrato córneo y su importancia en la función barrera de la piel.....	20
3.1.1. Composición del estrato córneo.....	21
3.1.2. Ceramidas, constituyente principal de la matriz lipídica del estrato córneo.....	22
3.1.3. Organización molecular de la matriz lipídica del estrato córneo.....	25
3.1.4. Composición y organización de los lípidos en el estrato córneo en algunas enfermedades dermatológicas	28
3.2. Simulaciones de dinámica molecular.....	29
3.2.1. GROMACS (GRONingen MACHine for Chemical Simulations).....	31
3.2.2. Interacciones moleculares: campos de fuerza.....	31
3.2.3. Interacciones de largo alcance	33
3.2.4. Ensamblés en dinámica molecular.....	34
3.2.5. Análisis de resultados de las simulaciones de dinámica molecular de bicapas lipídicas....	37
4. Metodología.....	42
4.1. Obtención de las estructuras iniciales de la CER[NP] y CER[AP]	42

4.2. Obtención de las bicapas lipídicas CER[NP]/CER[AP] 1:2 y 2:1.....	43
4.3. Simulaciones de dinámica molecular.....	44
4.4. Análisis	45
5. Resultados y análisis	46
5.1. Espesor y dimensiones del modelo de bicapa durante la dinámica molecular	48
5.2. Análisis de los parámetros de orden	50
5.3. Análisis de los perfiles de densidad lipídicos	53
5.4. Análisis de los ángulos de inclinación de las ceramidas.....	59
5.5. Análisis de las interacciones del modelo de bicapa del estrato córneo.....	62
6. Conclusiones.....	67
Referencias bibliográficas.....	68
Apéndices.....	81

Lista de Tablas

Tabla 1 <i>Proporción de cada tipo de CER en la matriz extracelular lipídica del estrato córneo humano.</i>	24
Tabla 2 <i>Visión general de las enfermedades de la piel y las alteraciones de las propiedades lipídicas.</i>	28
Tabla 3 <i>Programas y herramientas utilizadas para el análisis de los resultados de las simulaciones de dinámica molecular.</i>	45
Tabla 4 <i>Espesor de las bicapas lipídicas.</i>	48
Tabla 5 <i>Número total de enlaces de hidrógeno formados por las CER de cada bicapa.</i>	63

Lista de Figuras

Figura 1. Disposición propuesta para CER[NP]/ [AP] 2:1 y 1:2 por Schmitt *et al.* (2018)..... 18

Figura 2. Una representación diagramática de la estructura de la piel humana en sección transversal. 20

Figura 3. Subclases de CER. 23

Figura 4. Conformaciones de las ceramidas en función del ángulo de inclinación γ de la cadena. 24

Figura 5. Organización molecular de los lípidos en el SC..... 26

Figura 6. Medición del ángulo Θ entre el enlace C-H y el eje z de la bicapa..... 39

Figura 7. Opciones de cálculo de ángulos de *gmx gangle*. 40

Figura 8. Criterio geométrico del enlace de hidrógeno..... 41

Figura 9. Definición de las rebanadas en *gmx rdf*..... 42

Figura 10. Estructura de la CER[NS]. 43

Figura 11. Estructuras químicas de las ceramidas en estudio 46

Figura 12. Vista frontal (en dirección al eje z) de las bicapas al final de la simulación de 500 ns. 47

Figura 13. Dimensiones de la bicapa CER[NP]/CER[AP]: I) 1:2 y II) 2:1..... 50

Figura 14. Esquemas de las diferentes fases de la bicapa..... 50

Figura 15. Parámetros de orden obtenidos por: I) c1 de CER[NP] y CER[AP], II) c2 de CER[NP] y CER[AP] y III) cadena de ácido lignocérico en las bicapas CER[NP]/ [AP] 2:1 y 1:2. 52

Figura 16. Perfiles de densidad de los componentes individuales de las bicapas a lo largo del eje z, calculados en el modelo CER[NP]/ [AP]: I) 1:2 y II) 2:1. Z=0 corresponde al centro de la bicapa. 55

Figura 17. Perfiles de densidad de las cadenas de acilo de los componentes individuales de las bicapas a lo largo del eje z en el modelo CER[NP]/ [AP]: I) 1:2 y II) 2:1. Z=0 corresponde al centro de la bicapa. 56

Figura 18. Perfiles de densidad de las ceramidas a lo largo del eje z en cada modelo CER[NP]: [AP]. Z=0 corresponde al centro de la bicapa..... 57

Figura 19. Perfil de densidad de la cadena de acilo y del C38 al C42 de la CER[NP] a lo largo del eje z en el modelo CER[NP]/[AP]: I) 1:2 y II) 2:1. Z=0 corresponde al centro de la bicapa. 58

Figura 20. Vista frontal de las bicapas al final de la simulación de 500 ns: I) CER[NP]/CER[AP] 1:2 y II) CER[NP]/CER[AP] 2:1 59

Figura 21. Ángulos de inclinación de cada una de las moléculas de CER en el modelo CER[NP]: [AP]: I) 1:2 y II) 2:1..... 60

Figura 22. Ángulos de inclinación entre el C38 y el C42 de cada una de las moléculas de CER en el modelo CER[NP]/[AP] 2:1. 61

Figura 23. Distribución relativa del número de enlaces de hidrógeno entre las CER y el átomo de oxígeno del agua 64

Figura 24. Función de distribución radial g(r) entre el átomo de oxígeno de las moléculas de agua y el carbono α de las CER..... 65

Figura 25. Perfiles de densidad del carbono α de cada CER a lo largo del eje z..... 66

Lista de Apéndices

Apéndice A. Topología CER[NP]	81
Apéndice B. Topología CER[AP].....	99
Apéndice C. Script para el ensamble de la bicapa lipídica CER[NP]/CER[AP] 1:2.....	118
Apéndice D. Script para el ensamble de la bicapa lipídica CER[NP]/CER[AP] 2:1	120
Apéndice E. Restricciones moleculares para CER	121
Apéndice F. Restricciones moleculares para el ácido lignocérico.....	122
Apéndice G. Restricciones moleculares para el colesterol	122

Resumen

Título: Estudio de dinámica molecular de un modelo de bicapa lipídica del estrato córneo constituido por CER[NP] y CER[AP]*

Autor: Natalia Rivero Arenas**

Palabras clave: Ceramidas, simulación, membrana celular, matriz lipídica.

Descripción:

La matriz lipídica del estrato córneo (SC) es esencial para la supervivencia humana, puesto que actúa como una barrera que previene la deshidratación rápida, manteniendo al mismo tiempo al cuerpo protegido frente a virus, bacterias y radiación UV. Muchas enfermedades cutáneas, como psoriasis, dermatitis atópica e ictiosis se derivan de alteraciones en la concentración de las ceramidas en la matriz extracelular lipídica del SC. La compleja estructura del SC presenta un reto para la comunidad científica, ya que es difícil determinar experimentalmente la relación entre su organización molecular y sus propiedades. Por lo tanto, en este trabajo de investigación, para estudiar el efecto de la concentración de las ceramidas no hidroxifitosfingosina (CER[NP]) y α -hidroxifitosfingosina (CER[AP]) sobre las propiedades de la matriz lipídica, se desarrolló un modelo de bicapa con colesterol (CHOL, *cholesterol*) y ácido lignocérico (LA, *lignoceric acid*), variando la proporción CER[NP]/CER[AP] en 1:2 y 2:1, adicionalmente, se realizaron simulaciones de dinámica molecular usando el programa GROMACS 2019. Los resultados de este estudio muestran que la CER[NP] y la CER[AP] tienen un impacto diferente sobre la estructura del modelo de bicapa lipídica. En ambas proporciones la CER[NP] mostró una evidente superposición, mientras que la CER[AP] no. Además, las cadenas acilo de los lípidos no presentaron un único ángulo de inclinación durante la simulación, por el contrario, este osciló considerablemente y la CER[AP] exhibió un mayor número de enlaces de hidrógeno de tipo agua-lípido y lípido-lípido en comparación a la CER[NP]. En consecuencia, la solvatación de la CER[NP] es menor, por tanto, se favorecen las interacciones hidrofóbicas con las cadenas acilo de la capa opuesta.

* Trabajo de grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Markus Hans Oliver Doerr, Dr. rerum naturalium

Abstract

Title: Study of molecular dynamics of a lipidic bilayer model of the stratum corneum made up of CER[NP] and CER[AP]*

Author: Natalia Rivero Arenas**

Keywords: Ceramides, simulation, cell membrane, lipid matrix.

Description:

The lipid matrix of the stratum corneum (SC) is essential for human survival, as it acts as a barrier that prevents rapid dehydration while keeping the body protected against viruses, bacteria and UV radiation. Many skin diseases such as psoriasis, atopic dermatitis and ichthyosis result from alterations in the concentration of ceramides in the extracellular lipid matrix of SC. The complex structure of SC presents a challenge to the scientific community, as it is difficult to determine experimentally the relationship between its molecular organization and its properties. Therefore, in this research work, to study the effect of the concentration of non-hydroxyphitosphingosine ceramide (CER[NP]) and α hydroxyphitosphingosine ceramide (CER[AP]) on the properties of the lipid matrix, a membrane model with cholesterol and lignoceric acid was developed, varying the CER[NP]/CER[AP] ratio in 1:2 and 2:1, and molecular dynamics simulations were performed using the GROMACS 2019 program. The results of this study show that CER[NP] and [AP] have a different influence on the structure of the lipid bilayer model. In both proportions CER[NP] showed an evident overlap while CER[AP] did not. Furthermore, the acylo chains of the lipids did not have a single angle of inclination during the simulation, on the contrary, it oscillated considerably. CER[AP] exhibited a higher number of water-lipid and lipid-lipid type hydrogen bonds compared to CER[NP]. Consequently, CER[NP] solvation is lower, therefore hydrophobic interactions with the acylo chains of the opposite layer are favored.

* Bachelor thesis.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Markus Hans Oliver Doerr, Dr. rerum naturalium

Introducción

La piel actúa como una barrera que protege al cuerpo humano de las amenazas de su entorno, varios estudios señalan que la capa superior, el estrato córneo (SC, *stratum corneum*), es el elemento crucial en esta función de defensa (Winsor y Burch, 1944). La comprensión de la estructura y la función del SC ha avanzado desde las primeras nociones de una barrera física contra la deshidratación (Blank, 1952) hasta una visión actual en la que se define como un tejido complejo y dinámico capaz de adaptar su composición, organización y actividad en respuesta a las influencias ambientales, asegurando así la homeostasis de la piel. Además de evitar la pérdida de agua, proporciona una barrera en constante renovación de alta integridad mecánica y flexibilidad contra el ingreso de microorganismos y de rayos UV (Kligman, 2011).

Las diversas tareas de protección que cumple el SC se localizan en la matriz extracelular lipídica que rodea los corneocitos (Brody, 1966), la cual está constituida por una mezcla compleja de lípidos: aproximadamente 40% de ceramidas (CER), 25% de colesterol (CHOL), 25% de ácidos grasos libres (FFA), 6% de colesterol sulfato (ChS) y otros lípidos que se encuentran en menor proporción (Schmitt y Neubert, 2018).

Varias enfermedades de la piel, tales como psoriasis, dermatitis atópica, ictiosis (incluyendo ictiosis arlequín e ictiosis lamelar), ictiosiforme ampolloso, entre otras, se caracterizan por la reducción de la concentración de ceramidas en la matriz extracelular del SC, causada a menudo por la alteración de la actividad de una o más enzimas involucradas en la síntesis de estos lípidos, por ejemplo, en la dermatitis atópica, las enzimas esfingomielina deacilasa ceramidasa y glucosilceramida desacilasa tienen una actividad incrementada que produce una disposición alterada de las ceramidas en estos pacientes (Bouwstra y Ponc, 2006).

Actualmente, parte de la investigación está orientada a esclarecer la organización molecular de la estructura lipídica del SC, impulsada por el conocimiento limitado que se tiene de la misma, debido a su complejidad y a las dificultades experimentales en su estudio. A pesar del uso de métodos experimentales (difracción de rayos X; espectroscopia FTIR, RMN y cryo-EM) y computacionales (Das y Olmsted, 2016), la estructura molecular detallada, sus propiedades de permeabilidad y los roles individuales de los diferentes constituyentes lipídicos aún no son claros.

Por lo tanto, la comprensión de los detalles moleculares de la organización dentro de la matriz lipídica del SC es esencial tanto para comprender la biofísica y la fisiología de la piel como para el desarrollo de terapias eficaces para los trastornos y las enfermedades de este tejido.

En un estudio experimental reciente (Schmitt *et al.*, 2018) usando difracción de neutrones y un modelo de bicapa de la matriz extracelular del estrato córneo constituido por la ceramida no hidroxifitoesfingosina (CER[NP]) y la ceramida α -hidroxifitoesfingosina (CER[AP]), se encontró que la estructura de las bicapas lipídicas depende de las concentraciones relativas de las dos ceramidas involucradas. Aunque estas dos ceramidas difieran solo en un grupo OH en la cadena del ácido graso, los autores encontraron que aumentando la proporción de CER[AP] se generan cambios estructurales significativos. Un mayor contenido de CER[AP] causa una inclinación de las cadenas acilo de las ceramidas.

Por consiguiente, a través de esta investigación, requisito para obtener el título de Química, se complementaron estos resultados experimentales mediante simulaciones de dinámica molecular realizadas en GROMACS (Abraham *et al.*, 2015), puesto que estas simulaciones han sido útiles en el estudio de sistemas de alta complejidad como las bicapas lipídicas, ya que proporcionan una visión detallada que experimentalmente no es posible. En efecto, se evaluó la presencia de la inclinación en las cadenas acilo, el efecto de la proporción de las CER[NP] y CER[AP], así como

las interacciones que estabilizan estructuralmente el modelo de bicapa lipídica del SC construido en PACKMOL (Martínez, Andrade, Birgin y Martínez, 2009).

1. Justificación

La matriz lipídica del SC es esencial para la supervivencia humana. Actúa como una barrera para prevenir la deshidratación rápida, manteniendo al mismo tiempo al cuerpo protegido frente a las amenazas del medio. La complejidad de las láminas lipídicas dificulta la determinación experimental de la relación que existe entre la organización molecular de los lípidos y las propiedades que exhiben. Además, no es posible estudiar la estructura de las bicapas con resolución atómica. Por tanto, las simulaciones de dinámica molecular desempeñan un papel importante en el examen de la estructura, sus cambios, composición y propiedades.

De esta manera, los estudios realizados a través de dinámica molecular se han centrado, principalmente, en modelos constituidos por CER [NS] (esfingosina ligada a un ácido no hidroxilado) y han proporcionado hasta ahora mayor comprensión en el papel de la longitud de la cadena de ceramida (Schmitt *et al.*, 2018) y de la adición de otros lípidos sobre las propiedades del SC (Moore, Iacovella, Leonhard, Bunge y McCabe, 2018), así como la permeabilidad de pequeñas moléculas a través de bicapas basadas en CER.

Debido a que la reducción de dos de las ceramidas más abundantes en el SC, CER[NP] y CER [AP], está directamente relacionada con algunas enfermedades cutáneas, es importante establecer el impacto de estas ceramidas sobre su estructura. Recientemente, Schmitt *et al.* (2018), utilizando difracción de neutrones, lograron esclarecer que existe una evidente disminución de la superposición dentro del espacio laminar, arrojando una estructura inclinada (*tilted structure*) en modelos donde la concentración de CER[AP] es mayor (Figura 1). Sin embargo, el arreglo estructural que proponen Schmitt *et al.* (2018) es hasta ahora una hipótesis que explica los resultados experimentales, puesto que no es completamente claro cómo se forman estas estructuras

inclinadas, y tampoco se expone una explicación del efecto de esta disposición sobre la estructura microscópica y las interacciones en este tipo de arreglo molecular. Adicionalmente, la resolución en este experimento es limitada (la longitud de onda de los neutrones en el experimento fue de 4,6 Å), la información estructural es unidimensional y dada las restricciones experimentales no fue posible dilucidar las causas moleculares de los cambios estructurales.

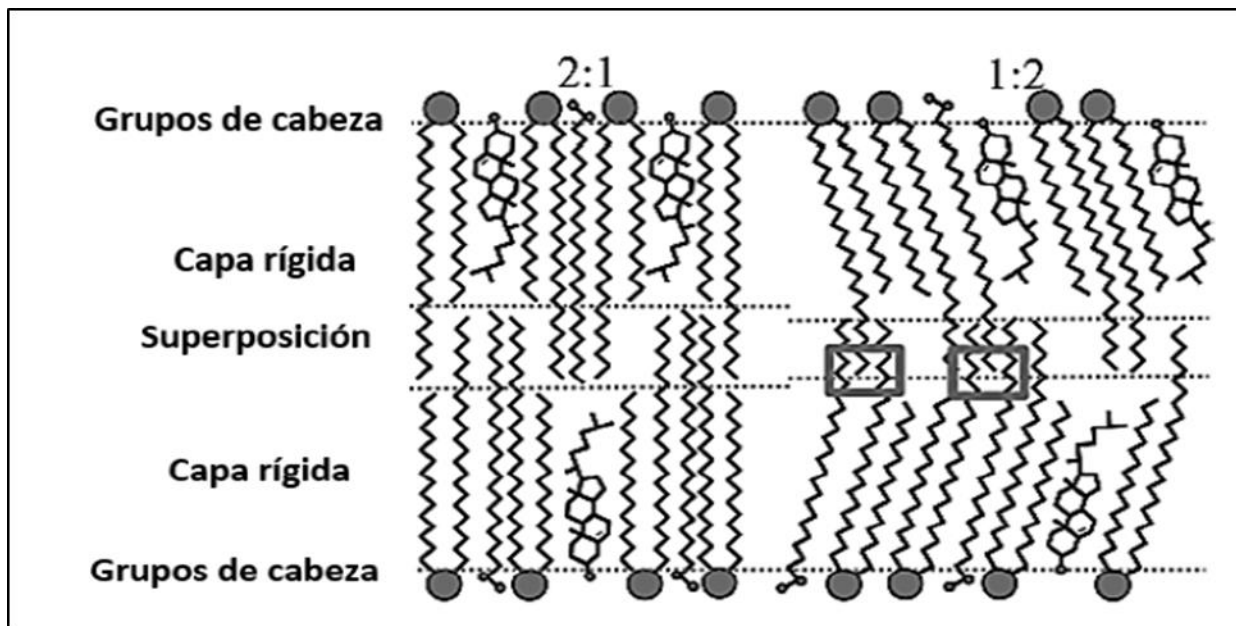


Figura 1. Disposición propuesta para CER[NP]/ [AP] 2:1 y 1:2 por Schmitt *et al.* (2018). Esta imagen fue tomada y modificada de Schmitt *et al.* (2018).

De tal forma que, al estudiar este modelo por medio de dinámica molecular, se corrobora si es posible esta disposición dentro de la bicapa lipídica, asimismo, el modelo es útil para comprender la influencia de las CER [NP] y [AP] a nivel atómico; y a su vez, arroja predicciones que pueden guiar estudios futuros. Puesto que, la matriz lipídica del SC ha sido estudiada exitosamente mediante dinámica molecular (véase por ejemplo Schmitt *et. al.*, 2018; Moore *et al.*, 2018; Lundborg *et al.*, 2018; Regno y Notman, 2018). Cabe destacar que, aunque la simulación a través de una mezcla compleja de CER es interesante para observar y obtener una visión general del SC, esta mezcla no permite una evaluación detallada de la influencia estructural de una tipo de CER.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Estudiar la estructura y las interacciones que estabilizan estructuralmente al sistema de bicapas lipídicas que constituyen al estrato córneo.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudiar un modelo de bicapa lipídica del estrato córneo constituido por CER[AP], CER[NP], colesterol y ácido lignocérico.
- Adquirir destreza en la modelización de membranas biológicas mediante dinámica molecular y en la interpretación de los resultados obtenidos.
- Evaluar el efecto de la proporción de las ceramidas [NP] y [AP] sobre la estructura de una bicapa lipídica del estrato córneo.
- Analizar el rol de las interacciones que estabilizan estructuralmente al modelo de bicapa lipídica del estrato córneo.

3. Marco teórico

3.1. El estrato córneo y su importancia en la función barrera de la piel humana

La piel es el órgano más pesado y extenso del cuerpo humano, representa el 10% de la masa corporal y cubre casi 2 m² de su superficie (McGrath, Eady y Pope, 2004), así mismo, permite que las funciones vitales ocurran dentro de un entorno fisiológico controlado, puesto que demarca el límite entre el cuerpo y su entorno. No obstante, la piel no es solo una partición física, además, proporciona una interfaz en la que ocurre el intercambio de sustancias entre el cuerpo y el entorno.

La piel humana es un epitelio estratificado, cada capa de tejido está formada por diferentes tipos de células que cumplen varias funciones. Puede dividirse en epidermis, dermis e hipodermis como se observa en la Figura 2. A su vez, la epidermis se subdivide, desde el exterior hacia el interior, en el SC, el estrato granuloso (capa granular), el estrato espinoso (capa de células espinosas) y el estrato basal (capa basal también llamada estrato germinativo) (Monteiro y Larese, 2017).

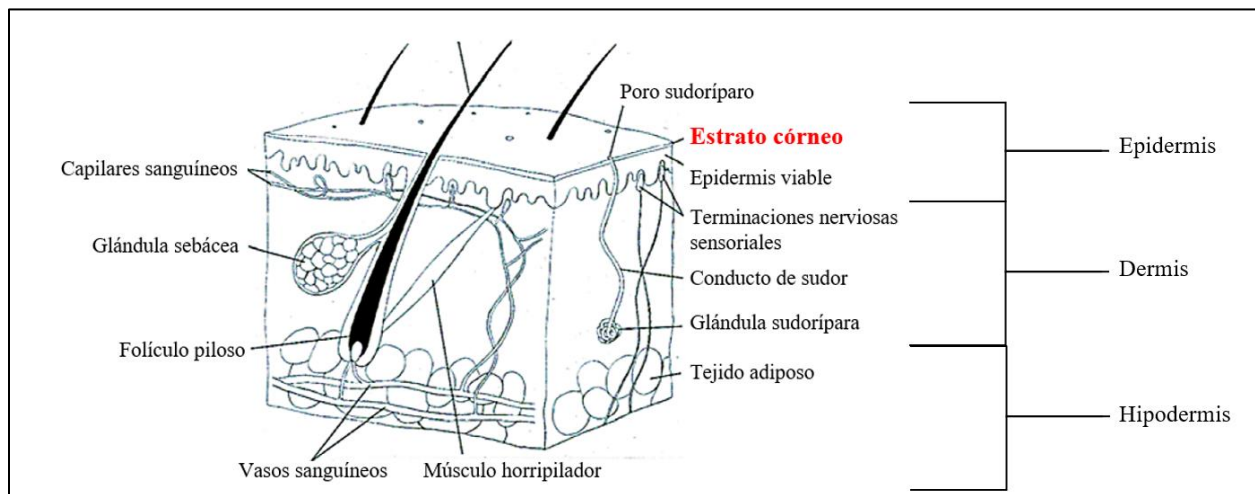


Figura 2. Una representación diagramática de la estructura de la piel humana en sección transversal. La epidermis está compuesta por el SC y la epidermis viable. Tomada y modificada de Wooi y Man (2015).

El SC es un tejido complejo y dinámico capaz de adaptar su composición, organización y actividad en respuesta a las influencias ambientales, asegurando así la homeostasis de la piel. Además de proteger al cuerpo humano contra la pérdida de agua y la entrada de productos químicos y microorganismos, el SC protege a los tejidos vivos del daño oxidativo y de los rayos UV, proporciona una barrera mecánica en constante renovación, da flexibilidad y fuerza cohesiva, y participa en la interfaz psico- y neuro-sensorial (Kligman, 2011; Elias, 2012). Las diversas tareas de protección realizadas por el SC se localizan en la matriz extracelular lipídica que rodea los corneocitos (Elias, 2005).

3.1.1. Composición del estrato córneo: El SC es la capa más externa de la piel. Generalmente, presenta de 10 a 20 μm de espesor y está compuesto de 10 a 15 capas de corneocitos (Williams, 2003). Los corneocitos son células muertas derivadas de la diferenciación final de los queratinocitos originados en las capas más profundas de la epidermis. Morfológicamente, los corneocitos son aplanados y alargados, con dimensiones aproximadamente de 0.2 μm de espesor y 40-60 μm de ancho (Kashibuchi, Hirai, O'Goshi y Tagami, 2002). Adicionalmente, los corneocitos tienen una envoltura cornificada en lugar de una membrana plasmática que está rodeada por una capa de lípidos, carecen de núcleo y orgánulos citoplasmáticos, pero están llenos de filamentos de queratina y están embebidos en una matriz extracelular enriquecida de lípidos (Elias, 2012). Los corneocitos están conectados por corneodesmosomas y son liberados continuamente a la superficie de la piel mediante el proceso de descamación.

Los lípidos que componen la matriz extracelular del SC difieren de los lípidos característicos de las membranas de las células de los mamíferos, debido a que los fosfolípidos están en una baja proporción (Wertz y Downing, 1991). Tres clases de lípidos representan el 85-95% en masa de la

matriz del SC: ceramidas (alrededor del 50% en masa), ácidos grasos libres (10-20% en masa) y colesterol (alrededor del 25% en masa) (Feingold, 2007).

3.1.2. Ceramidas, constituyente principal de la matriz lipídica del estrato córneo: Las ceramidas (CER), un grupo de esfingolípidos estructuralmente heterogéneos, consisten en un ácido graso saturado de cadena larga unido al grupo amino de una base esfingoide (esfingosina, fitoesfingosina y 6-hidroxisfingosina). El ácido graso puede ser hidroxilado en la posición α o en la posición ω , o no contener ningún otro grupo hidroxilo (Coderch, Lopez, de la Maza y Parra, 2003).

La primera nomenclatura utilizada para nombrar a las CER se basó en su movilidad en cromatografía de capa fina (Wertz y Downing, 1983). Con el aumento en el número de CER identificadas, este método se tornó obsoleto. Debido a esto se desarrolló una nomenclatura basada en su estructura química (Motta *et al.*, 1993). En este sistema las ceramidas se etiquetan con letras, la última letra identifica el tipo de base esfingoide: esfingosina (S), fitoesfingosina (P), 6-hidroxisfingosina (H) y la primera al ácido graso: sin grupo hidroxilo (N), con un hidroxilo en la posición alfa u omega (A u O, respectivamente), además, en las ceramidas que se esterifican con un ácido graso insaturado la letra E se antepone a las dos letras anteriores.

La composición de CER en la matriz lipídica es compleja (Masukawa *et al.*, 2008; van Smeden *et al.*, 2011). En el espacio extracelular del SC se han identificado 12 subclases de ceramidas (ver Figura 3). Las ceramidas tienen cadenas de diferentes longitudes tanto en la base esfingoide (18 a 20 átomos de carbono), como en el ácido graso dando origen a más de 340 ceramidas (Masukawa *et al.*, 2008).

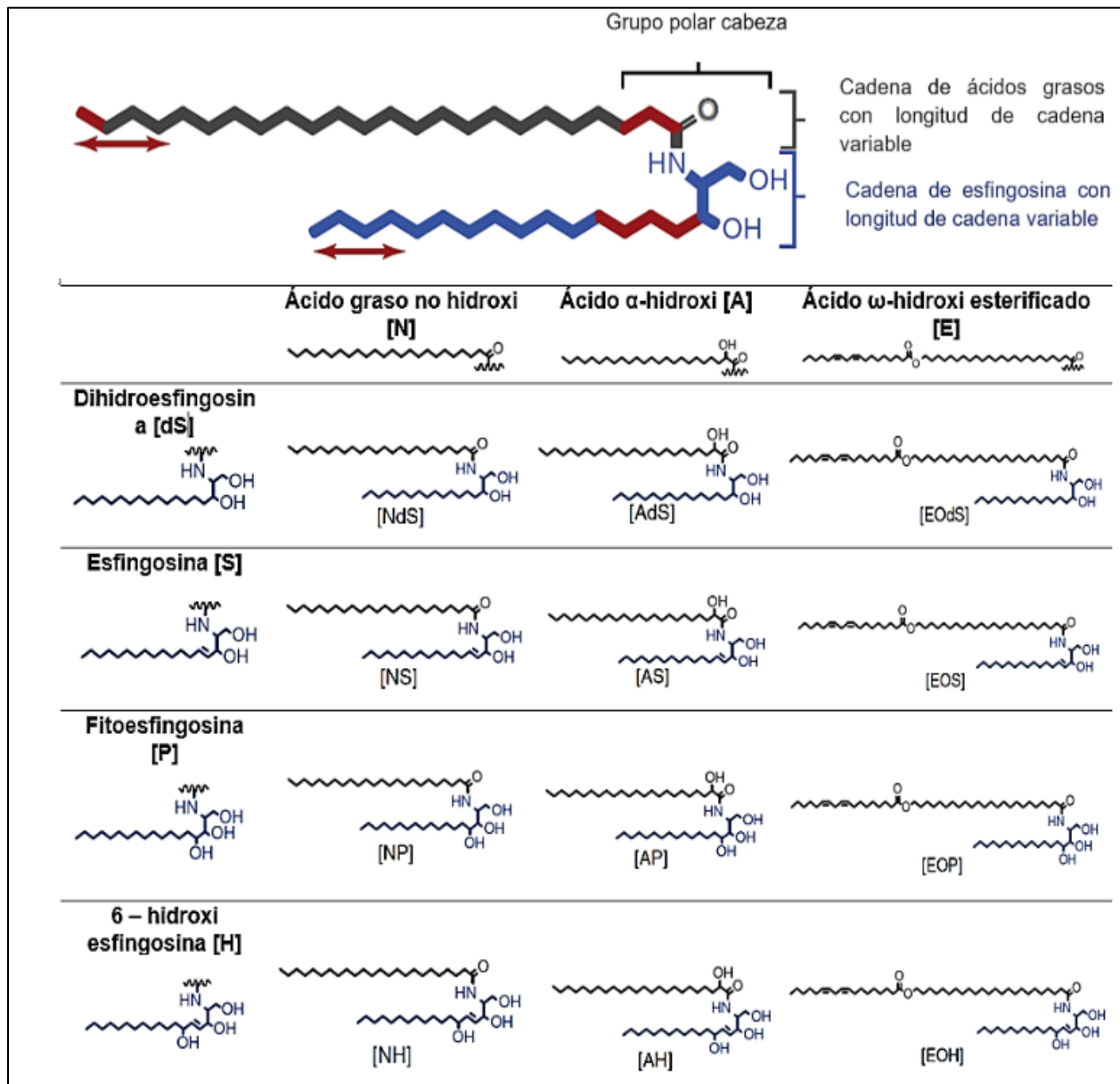


Figura 3. Subclases de CER. Las CER están compuestas por una cadena de ácido graso unida a la base de la esfingosina. Ambas cadenas muestran variación en su longitud de cadena de carbono (indicada por las flechas). Tomada y modificada de van Smeden, Janssens, Gooris y Bouwstra (2014).

Las ceramidas más abundantes en el SC son la CER[NP] y CER[NH]. En la Tabla 1 se muestra la proporción individual para cada una de las especies de CER (Masukawa *et al.*, 2009; t'Kindt *et al.*, 2012; Schmitt y Neubert, 2018). Sin embargo, el contenido de CER puede variar dependiendo la estación, la edad, la salud y otros factores.

Tabla 1

Proporción de cada tipo de CER en la matriz extracelular lipídica del estrato córneo humano. Tomada y modificada de Schmitt y Neubert (2018). En rojo se señalan las CER en estudio.

CER	M (g/mol)*	Masukawa 2009 (Masukawa <i>et al.</i> , 2009)		Kindt 2012 (Kindt <i>et al.</i> , 2012)	
		Proporción (%peso)	Proporción (%mol)	Proporción (%peso)	Proporción (%mol)
NS	677,69	6,35	5,95	7,44	6,80
NP	695,70	21,31	20,48	22,10	26,19
NH	693,69	22,58	21,64	14,51	12,59
NDS	679,70	5,95	5,59	9,83	8,73
AS	693,69	3,56	3,41	9,58	3,86
AP	711,70	16,11	15,84	8,78	13,60
AH	709,69	15,73	15,42	10,77	12,59
ADS	677,69	0,82	0,76	1,63	1,93
EOS	1025,98	4,28	6,07	6,48	5,48
EOP	1043,99	0,86	1,23	1,14	2,74
EOH	1041,98	2,50	3,60	4,26	5,48
EODS	1021,99	-	-	0,40	-

*Las masas molares se estimaron en un promedio de 24-28 carbonos para el ácido.

Las dos cadenas de las moléculas CER dan lugar a la posibilidad de formación de tres conformaciones básicas diferentes (Figura 4), dependiendo del ángulo de inclinación γ de la cadena. Pueden asumir una conformación de horquilla con $\gamma=0^\circ$ y una conformación extendida completa con $\gamma=180^\circ$. Cada ángulo intermedio produce alguna conformación en forma de V (Iwai *et al.*, 2012).

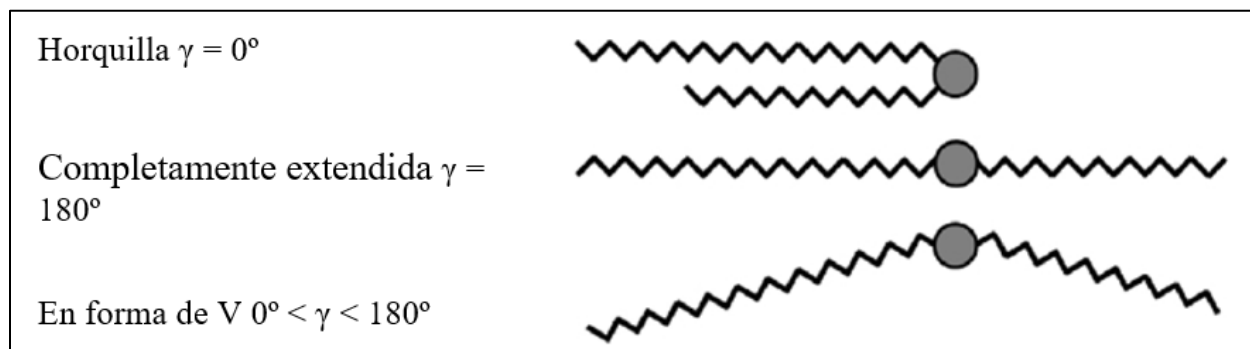


Figura 4. Conformaciones de las ceramidas en función del ángulo de inclinación γ de la cadena. Tomada y modificada de Schmitt y Neubert (2018).

Algunas de las características estructurales de las ceramidas que las hacen fundamentales para la función de barrera de la piel son: (1) la asimetría y la longitud variable de las cadenas de hidrocarburos que facilitan la mezcla intermolecular entre las diferentes subclases de ceramidas, los ácidos grasos libres y el colesterol (Brief *et al.*, 2009), originando regiones de alta movilidad de la cadena; (2) los grupos de cabezas polares son pequeños y coinciden estrechamente con la sección transversal de las cadenas de hidrocarburos, lo que permite la formación de estructuras de bicapa laminares; (3) el tamaño pequeño de los grupos funcionales en la región de cabeza impide la hidratación excesiva y la pérdida de rigidez en condiciones de alta humedad; (4) la presencia de varios grupos donantes y receptores en los grupos de cabeza de las ceramidas permite la formación de una red de enlaces de hidrógeno, mejorando de esta manera la impermeabilidad y estabilidad de las láminas (Pascher, 1976; Rerek y Moore, 2007; Mendelsohn, Rerek y Moore, 2000).

3.1.3. Organización molecular de la matriz lipídica del estrato córneo: Las posibles conformaciones de la cadena y las disposiciones de empaquetamiento que existen en las bicapas de lípidos lamelares se muestran en la Figura 5. En la fase ortorrómbica (OR) más compacta, las cadenas de lípidos adoptan una conformación totalmente trans y están organizadas en una red cristalina rectangular sin movilidad rotacional ni traslacional. En la fase hexagonal (HEX), las cadenas de lípidos trans están inclinadas con respecto al plano cristalino y forman una red hexagonal menos densa; las moléculas de lípidos tienen un poco de movilidad rotacional a lo largo del eje z, pero su movilidad traslacional es nula. En la fase líquido-cristalina (LIQ), las cadenas presentan un alto grado de isomerización gauche, y la organización lateral se pierde por completo; las moléculas de lípidos tienen una alta movilidad rotacional y traslacional en el plano de la bicapa. Las tres fases mencionadas están presentes en las láminas lipídicas del SC con preferencia en la fase OR (Damien y Boncheva, 2010). La abundancia de fases cristalinas OR en las láminas de

lípidos del SC contrasta con el predominio de las fases LIQ en las membranas plasmáticas de las células vivas (Mukherjee y Maxfield, 2000). Esta diferencia en la composición de las fases es debida a la permeabilidad de los dos tipos de estructuras lipídicas y las diferentes condiciones a las que están expuestas.

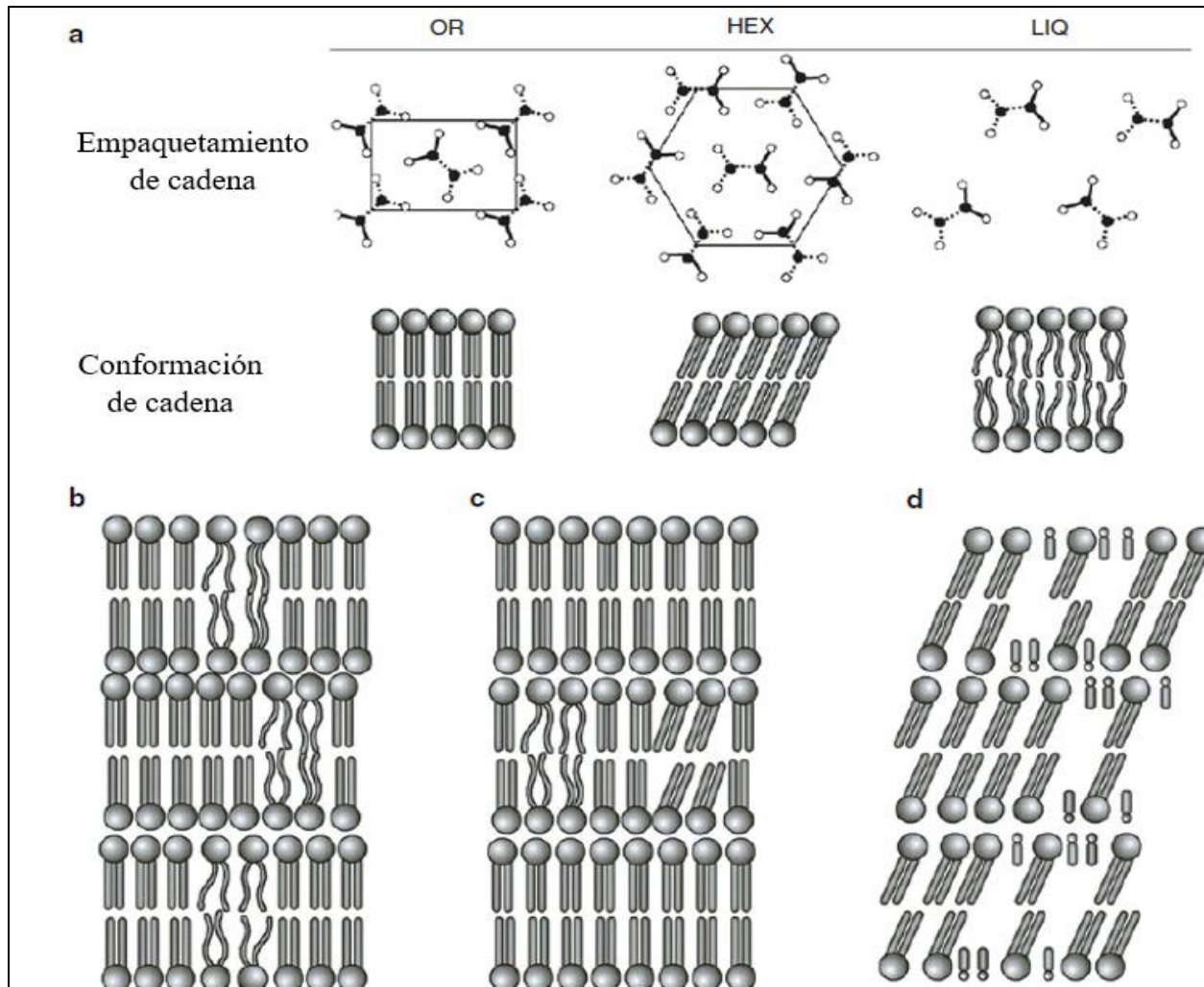


Figura 5. Organización molecular de los lípidos en el SC. (a) Esquema de empaquetamiento de la cadena (fila superior) y conformación de la cadena (fila inferior) en las fases ortorrómbica (OR), hexagonal (HEX) y líquido-cristalina (LIQ) de los lípidos. (b - d) Modelos de organización molecular de la matriz lipídica del SC que muestran diferentes contenidos y distribución de las fases lipídicas. Los esquemas ilustran: el modelo de mosaico de dominio (b), el modelo sándwich (c) y el modelo monofásico (d). Ceramidas y ácidos grasos se representan con el dibujo esquemático de la cadena larga lípidos utilizados en (a); la presencia de colesterol es explícitamente mostrado sólo en (d). Las diferentes fases lipídicas están representadas por la conformación de orden de las colas de hidrocarburos como se indica en (a). Tomada y modificada de Boncheva (2012).

En dirección normal a la superficie las dos capas de lípidos se ubican una encima de otra y forman un patrón repetitivo de unidades estructurales (láminas). En la matriz lipídica del SC existen dos tipos de estructuras laminares que difieren en su distancia de repetición característica, es decir, en su espesor: una con un espesor aproximado de 13 nm, denominada fase de periodicidad larga (LPP), y otra con un espesor aproximado de 6 nm, denominada fase de periodicidad corta (SPP) (Hill y Wertz, 2003).

Actualmente, los modelos propuestos para la organización molecular de los lípidos en el SC se dividen en función de la presencia y la distribución de las principales fases lipídicas en tres grandes categorías: (1) El modelo de mosaico de dominio de Forslind (Forslind, 1994; Forslind, Engstrom, Engblom, y Norlén, 1997) detalla la matriz de lípidos como un sistema de dos fases en el que los dominios cristalinos discontinuos OR están incrustados en una fase de gel continua HEX o LIQ (Figura 5.b). (2) Los modelos tipo sándwich de Bouwstra, Dubbelaar, Gooris y Ponc (2000), Swartzendruber, Wertz, Kitko, Madison y Downing (1989), Hill y Wertz (2003), y McIntosh (2003) describen la matriz lipídica como un sistema multifase en el que las láminas contienen una zona central de mayor movilidad HEX o LIQ intercaladas entre dos zonas de movilidad de lípidos inferiores OR, gel, u ordenada en fase líquida (Figura 5.c). (3) El modelo monofásico de Norlén (2001) representa la matriz de lípidos como una fase de gel única y coherente sin separación de fases, pero contiene dominios ricos en colesterol de alta permeabilidad y dominios pobres en colesterol de baja permeabilidad (Figura 5.d).

3.1.4. Composición y organización de los lípidos en el estrato córneo en algunas enfermedades dermatológicas: La piel en enfermedades como Ictiosis Lamelar (LI, *Lamellar ichthyosis*), Psoriasis, Dermatitis Atópica (AD, *Atopic dermatitis*) y el Síndrome de Netherton (NTS, *Netherton syndrome*), se caracteriza por tener una función de barrera dañada. En la Tabla 2 se resumen los hallazgos sobre la composición lipídica y su organización en las diferentes enfermedades mencionadas.

Tabla 2

Visión general de las enfermedades de la piel y las alteraciones de las propiedades lipídicas. Tomada y modificada de van Smeden, Janssens, Gooris y Bouwstra (2014)

Enfermedad	Composición lipídica*	Organización lipídica	Referencias
Ictiosis Lamelar	CER [NP] y [EOS] ↓ CER [AP] ↑	LPP alterada, periodicidades laminares más cortas	(Paige, Morse-Fisher y Harper, 1994; Pilgram <i>et al.</i> , 2001)
Psoriasis	CER [EOP], [NP] ↓ CER [AS], [NS] y [AP] ↑	LPP alterada, periodicidades laminares más cortas	(Motta <i>et al.</i> , 1994)
Dermatitis Atópica	CER [EOS], [EOP], [EOH], [EOdS] ↓ CER [AS], [AH], [AP], [AdS] ↑ Lípidos de cadena corta ↑ Ácidos grasos insaturados ↑	LPP alterada, periodicidades laminares más cortas, ortorrumbicidad ↓	(Williams y Flohr, 2006; Werner y Lindberg, 1985)

* Consenso general entre todos los estudios.

Sobre la ictiosis lamelar se han realizado algunos estudios que informan sobre la composición y la organización de los lípidos en SC. Ghadially, Williams, Hou y Elias (1992) y Fartasch (1997) indicaron que además de la ausencia de la enzima transglutaminasa 1 (responsable de la reticulación de la envoltura cornificada de los corneocitos), los cambios en los lípidos del SC también pueden jugar un papel en la barrera cutánea dañada de los pacientes con LI, por medio de secciones de SC teñidas con RuO₄, mostraron una distribución irregular de las láminas con regiones que contenían un número excesivo de bicapas de lípidos. Paige *et al.* (1994) determinaron

cuantitativamente las subclases CER en LI y observaron una reducción en CER[EOS] y [NP] en estos pacientes (Paige *et al.*, 1994). Estudios de microscopia electrónica ilustraron que las láminas estaban menos ordenadas y eran más onduladas en comparación con las láminas de la piel sana, además, observaron un aumento de los lípidos organizados en un empaquetamiento hexagonal (Pilgram *et al.*, 2001).

Otra enfermedad dermatológica es la psoriasis. Motta *et al.* (1993) fueron los primeros en analizar la composición lipídica en el SC en lesiones de psoriasis y demostraron una disminución relativa para las subclases CER[EOS], [NP] y [AP] (alrededor del 40%, 65% y 25%, respectivamente), mientras que las CER[AS] y [NS] aumentaron (alrededor del 33% y 65%, respectivamente).

Con respecto a la composición lipídica en los pacientes con AD, se han observado varios cambios en comparación con la piel sana, Fischer *et al.* (2011) y Di Nardo, Wertz, Giannetti y Seidenari (1998) reportaron una reducción en la relación CER/CHOL en la piel con AD. Adicionalmente, Imokawa *et al.* (1991) informaron que el nivel de CER[EOS] disminuye, mientras que CER[NS], CER[AS] y CER[AP] aumentan. Pilgram *et al.* (2001) indicaron que los pacientes con AD tienen un aumento del nivel de lípidos que adoptan un empaquetamiento hexagonal, además, evidenciaron una distancia de repetición reducida de las láminas, la misma publicación también informó que los cambios en la composición de lípidos se correlacionan en gran medida con la formación de la estructura laminar LPP.

3.2. Simulaciones de dinámica molecular

La dinámica molecular (MD, Molecular Dynamics) es una técnica de simulación por ordenador en la que se determina la evolución temporal de un conjunto de átomos que interactúan entre sí, a

partir de la solución de las ecuaciones de movimiento de Newton para un sistema de N átomos (Ercolessi, 1997):

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i, i = 1, \dots, N \quad (3.1)$$

Las ecuaciones se resuelven simultáneamente en pequeños pasos de tiempo, y la temperatura y la presión son monitoreadas, para mantener los valores requeridos. Además, las coordenadas se escriben en un archivo de salida a intervalos de tiempo fijos. Las coordenadas del sistema en función del tiempo representan la trayectoria del sistema. La trayectoria resultante es, en esencia, una película tridimensional que describe la configuración a nivel atómico del sistema en cada punto del tiempo simulado (Hollingsworth y Dror, 2018).

Las primeras simulaciones de MD se realizaron a finales de la década de 1950 (Alder y Wainwright, 1957) sobre gases simples. La primera simulación de MD de una proteína se realizó a finales de los años setenta (McCammon, Gelin y Karplus, 1977). Sin embargo, las simulaciones de MD son más reconocidas en los últimos años, especialmente en modelos biológicos. Las simulaciones se utilizan tanto para interpretar los resultados experimentales como para guiar el trabajo experimental y se han empleado para estudiar proteínas críticas para la señalización neuronal (Dawe *et al.*, 2016), para ayudar en el desarrollo de fármacos dirigidos al sistema nervioso (Spahn *et al.*, 2008) y para predecir cómo cada átomo de una proteína u otro sistema molecular se moverá con el tiempo (Karplus y McCammon, 2002).

En general, estas simulaciones pueden capturar una amplia variedad de procesos biomoleculares importantes, incluyendo el cambio conformacional, la unión de ligandos y el plegado de proteínas, revelando las posiciones de todos los átomos a una determinada resolución temporal. Es importante destacar que estas simulaciones también pueden predefinir la forma en

que las biomoléculas responden a nivel atómico a perturbaciones como mutaciones, fosforilación, protonación, adición o eliminación de un ligando (Hollingsworth y Dror, 2018).

3.2.1. GROMACS (GRONingen MACHine for Chemical Simulations): El uso extensivo de simulaciones de MD en la investigación química, toxicológica y bioquímica ha permitido el perfeccionamiento de paquetes de software eficaces y eficientes como GROMACS (Abraham *et al.*, 2015), NAMD (NANoscale Molecular Dynamics) (Phillips *et al.*, 2005), CHARMM (*Chemistry at HARvard Molecular Mechanics*) (Brooks *et al.*, 2009), entre otros, basados en algoritmos compatibles con sistemas altamente complicados, como los sistemas biológicos. Estos programas cuentan con diferentes herramientas y una amplia gama de funciones para analizar los archivos de trayectoria generados en una simulación.

GROMACS es un software libre y abierto muy utilizado en química para simulaciones dinámicas de biomoléculas. Proporciona un amplio conjunto de cálculos, herramientas de preparación y análisis. Permite el uso de varios campos de fuerza, como GROMOS96 (van Gunsteren *et al.*, 1996), CHARMM y potenciales optimizados para simulaciones de líquidos (Jorgensen, Maxwell y Tirado, 1996). Es compatible con la aceleración de la GPU a través del paquete externo OpenMM (Eastman *et al.*, 2017).

3.2.2. Interacciones moleculares: campos de fuerza: Las trayectorias de un arreglo de átomos que interactúan entre sí están determinadas por las ecuaciones de movimiento de Newton:

$$m_i \ddot{\vec{r}}_i = -\Delta_{\vec{r}_i} U(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N), i = 1, 2, \dots, N \quad (3.2)$$

Donde, cada átomo experimenta una fuerza determinada por el potencial U . En dinámica molecular, el potencial se representa mediante una función de campo de fuerza $U(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N)$, la

cual expresa las interacciones de cada átomo con el resto de los átomos del sistema (Hollingsworth y Dror, 2018).

Dentro de los campos de fuerza se incluyen dos términos, uno de ellos es las contribuciones “enlazantes”, que describen las interacciones entre los átomos que se encuentran ligados con enlaces covalentes, y el segundo es las contribuciones “no enlazantes”, que describen las interacciones electrostáticas y de van der Waals.

GROMACS usa una función de energía potencial con cinco contribuciones que corresponden tanto a las interacciones enlazantes como a las no enlazantes:

$$U = U_{enlace} + U_{ángulo} + U_{torsión} + U_{vdW} + U_{Coulomb} \quad (3.3)$$

Donde:

$$U_{enlace} = \sum_{enlaces\ i} k_i^{enlaces} (r_i - r_{01})^2 \quad (3.4)$$

$$U_{ángulo} = \sum_{ángulos\ i} k_i^{ángulo} (\theta_i - \theta_{01})^2 \quad (3.5)$$

$$U_{torsión} = \sum_{torsión\ i} \{k_i^{ángulo} [1 + \cos(n_i \phi_i - \gamma_i)] k_i^{ángulo} (\phi_i - \gamma_i)^2\}, n_i \neq 0, n = 0 \quad (3.6)$$

$$U_{vdW} = \sum_i \sum_{j>i} 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (3.7)$$

$$U_{Coulomb} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 r_{ij}} \quad (3.8)$$

Cada una de las contribuciones pertenece a la interacción entre pares de átomos con enlaces covalentes, descrita mediante un potencial armónico que puede representar: el estiramiento o contracción del enlace (ecuación 3.4), la flexión angular asociada a las variaciones de los ángulos

entre cada par de enlaces covalentes que comparten un átomo en el vértice (ecuación 3.5), la variación del ángulo diedro formado entre átomos unidos por tres enlaces covalentes que se encuentra sometidos a torsión (ecuación 3.6), la interacción de van der Waals, aproximada por el potencial de Lennard-Jones (ecuación 3.7) y la interacción electrostática, modelada mediante el potencial de Coulomb (ecuación 3.8). Las constantes de cada una de las contribuciones se determinan a través de técnicas empíricas, cálculos mecánico-cuánticos y se encuentran almacenadas en los archivos del parámetro de campo de fuerza empleado (Morales, 2013).

3.2.3. Interacciones de largo alcance: En la determinación de la dinámica de sistemas biológicos, las interacciones electrostáticas son fundamentales, sin embargo, su cálculo exacto en las simulaciones de MD tiene un elevado costo computacional, puesto que se considera que una partícula interactúa con todas las partículas del modelo de simulación. Por tanto, la energía potencial total está dada por dos contribuciones:

$$U_1 = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (3.9)$$

$$U_2 = \frac{1}{2} \sum_{\substack{|\vec{n}| \neq 0 \\ i=1}}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_{ij} + \vec{n}|} \quad (3.10)$$

Donde r_{ij} es la distancia entre las cargas i y j dentro del sistema de simulación $\vec{n} = n_x \vec{a}_x + n_y \vec{a}_y + n_z \vec{a}_z$. La sumatoria de la ecuación 3.10 converge muy lentamente, sin embargo, el método de la suma de Ewald mejora la convergencia de esta sumatoria, transformándola en la suma de dos series que convergen rápidamente (Abdulnour, Toukmaji y Board, 1996). De este modo, la energía electrostática según el método de Ewald se obtiene así:

$$U = U_{real} + U_{res} - U_{self} + U_{surf} \quad (3.11)$$

Con:

$$U_{real} = \frac{1}{2} \sum_{|\vec{n}| \neq 0} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{\text{erfc}(\alpha|\vec{r}_{ij} + \vec{n}|)}{|\vec{r}_{ij} + \vec{n}|} \quad (3.12)$$

$$U_{res} = \frac{1}{2} \sum_{|\vec{n}| \neq 0} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{\pi V} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{4\pi^2}{k^2} \exp\left(\frac{-k^2}{4\alpha^2}\right) \cos(\vec{k} \cdot \vec{r}_{ij}) \quad (3.13)$$

$$U_{self} = \frac{-\alpha}{\sqrt{\pi}} \sum_{k=1}^N \frac{q_k^2}{4\pi\epsilon_0} \quad (3.14)$$

$$U_{surf} = \frac{-2\pi}{2V} \left| \sum_{u=1}^N \frac{q_k^2}{4\pi\epsilon_s} \vec{r} \right|^2 \quad (3.15)$$

Donde *erfc* son las funciones de error complementarias y están dadas por:

$$\text{erfc}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^\infty \exp(-t^2) dt \quad (3.16)$$

V es el volumen del sistema de simulación y ϵ_s es la constante dieléctrica del medio. El primer término (U_{real}) corresponde al potencial debido a las cargas apantalladas, el segundo (U_{res}) al potencial de las distribuciones de cargas compensadoras, el tercero (U_{self}) al potencial de la interacción de cada distribución de apantallamiento consigo misma y el cuarto (U_{surf}) a la interacción del sistema con su entorno (Ewald, 1921).

3.2.4. Ensamblajes en dinámica molecular: En las simulaciones de MD se suelen emplear ensambles como: *NVE* (número de partículas constantes, volumen constante y energía total constantes), *NVT* (número de partículas, volumen y temperatura constantes) y *NPT* (número de partículas, presión y temperatura constantes) (Morales, 2013).

En este trabajo se implementaron los ensambles de temperatura constante (NVT y NPT), también conocidos como conjuntos canónicos. En la fase de equilibración del modelo, la temperatura y la presión se controlaron con el termostato y el baróstato de Berendsen, y, en la producción final la temperatura y la presión fueron controladas por el termostato Nose-Hover y el baróstato Parrinello-Rahman.

Para simular el fenómeno de temperatura constante, el algoritmo de acoplamiento Berendsen implementa una cinética de primer orden a un baño térmico externo con temperatura T_0 dada. Usando este algoritmo, la temperatura del sistema se corrige lentamente con la implementación de la relación:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (3.17)$$

Lo anterior implica que la desviación de la temperatura decae exponencialmente con una constante de tiempo τ . La ventaja de implementar este esquema es que la resistencia del acoplamiento puede basarse en la intervención del usuario. Por ejemplo, el acoplamiento puede ser relativamente corto, 0.01 ps, y para otras simulaciones de equilibrio, puede extenderse hasta 0.5 ps, lo que no afecta la dinámica de conservación. Sin embargo, el termostato de Berendsen suprime las variaciones en la energía cinética, lo que resulta en una generación inadecuada del conjunto canónico y un muestreo incorrecto (Berendsen, Postma, van Gunsteren, Dinola y Haak, 1984). Por tanto, para corregir lo anterior, se usa el termostato Berendsen de escala de velocidad, descrito como:

$$dK = (K_0 - K) \frac{dt}{\tau_t} + 2 \sqrt{\frac{KK_0}{N_f}} \frac{dW}{\sqrt{\tau_t}} \quad (3.18)$$

En contraste, el barostato de Berendsen redimensiona los vectores y las coordenadas del sistema de simulación con una matriz μ hacia una presión dada P_0 , así:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_P} \quad (3.19)$$

La matriz de escalado μ se define como:

$$\mu_{ij} = \delta_{ij} - \frac{n_{PC}\Delta t}{3\tau_P} \beta_{ij} \{P_{0ij} - P_{ij}(t)\} \quad (3.20)$$

donde β es la compresibilidad isotérmica del sistema.

Para mantener una temperatura específica, el termostato de Berendsen es eficiente para la relajación de un sistema. Sin embargo, una vez alcanzado el equilibrio, también es importante emplear un conjunto canónico correcto. Para aplicar el conjunto canónico en tal equilibrio GROMACS emplea el ensamble extendido, propuesto por Nosé (1984), que fue modificado posteriormente por Hoover (1985). En este caso, se agrega en las ecuaciones de movimiento un término de fricción. En este contexto, las ecuaciones de movimiento de las partículas se sustituyen por:

$$\frac{d^2r_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i} - \frac{p\xi dr_i}{Qdt} \quad (3.21)$$

donde el parámetro del factor de fricción viene dado por:

$$\frac{dp_\xi}{dt} = (T - T_0) \quad (3.22)$$

donde T_0 indica la temperatura de referencia y T es la temperatura actual del sistema. La constante Q se suele denominar "parámetro de masa del ensamble":

$$Q = \frac{\tau_T^2 T_0}{4\pi^2} \quad (3.23)$$

Así mismo, GROMACS también soporta una simulación de presión constante, utilizando el enfoque Parrinello-Rahman, que tiene similitud con el acoplamiento Nose-Hoover y que teóricamente proporciona el verdadero conjunto NPT.

Implementando el baróstato Parrinello-Rahman los vectores del sistema de simulación son representados por la matriz b que obedece la ecuación matricial de movimiento:

$$\frac{db^2}{dt^2} = VW^{-1}b'^{-1}(P - P_{ref}) \quad (3.24)$$

donde V denota el volumen del sistema de simulación y W representa el parámetro de la matriz, el cual determina la resistencia del acoplamiento. Por tanto, las ecuaciones de movimiento cambian, así:

$$\frac{d^2r}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i} - M \frac{dr_i}{dt} \quad (3.25)$$

$$M = b^{-1} \left[b \frac{db'}{dt} + \frac{db}{dt} b' \right] b'^{-1} \quad (3.26)$$

La matriz de parámetros inversa W^{-1} especifica la resistencia del acoplamiento. Cuando los elementos de W^{-1} son cero, la restricción de la caja se cumplirá automáticamente (Parrinello y Rahman, 1981). La resistencia del acoplamiento se puede calcular automáticamente en GROMACS, y la compresibilidad isotérmica aproximada β y la constante de tiempo de presión τ_p se deben proporcionar en el archivo de entrada.

3.2.5. Análisis de resultados de las simulaciones de dinámica molecular de bicapas lipídicas: Existen varios parámetros para analizar los resultados de las simulaciones de MD de las bicapas lipídicas que constituyen las membranas celulares. En este trabajo se utilizaron:

3.2.5.1. Espesor de la bicapa: Este parámetro permite monitorear la equilibración del sistema, y verificar si el modelo simulado, en este caso la bicapa lipídica, presenta el grosor de una bicapa lipídica del estrato córneo de la epidermis humana.

Para determinar el espesor de las bicapas lipídicas utilizamos el programa GridMAT-MD (Allen, Lemkul y Bevan, 2009). Este programa permite una interacción fácil con los archivos de coordenadas generados en una simulación de MD realizada con GROMACS.

Para GridMAT-MD el concepto más importante en el cálculo del espesor de la bicapa es el valor Z. Para esto, a cada átomo de referencia en la capa superior e inferior se le asigna un valor Z que representa el espesor en nanómetros de la bicapa en ese punto. Para determinar el valor Z, el programa considera un átomo de referencia a la vez, empezando por la capa superior, busca el vecino más cercano a ese punto de referencia en la capa opuesta, sólo en las direcciones x e y. Entonces, la diferencia de las coordenadas z entre los dos átomos de referencia es el valor Z.

3.2.5.2. Parámetro de orden de deuterio: Los parámetros de orden proporcionan una medida de la alineación del lípido en la bicapa, es decir, cuan ordenados están los lípidos. El parámetro de orden (S_z) para el enlace C-H se obtiene a través de la siguiente expresión (Moradi, Nowroozi y Shahlai, 2019):

$$S_z = 0,5\langle 3\cos\theta^2 - 1 \rangle \quad (3.27)$$

Como se observa en la Figura 6, θ es el ángulo entre el enlace C-H y el eje z. Los corchetes hacen referencia al promedio temporal.

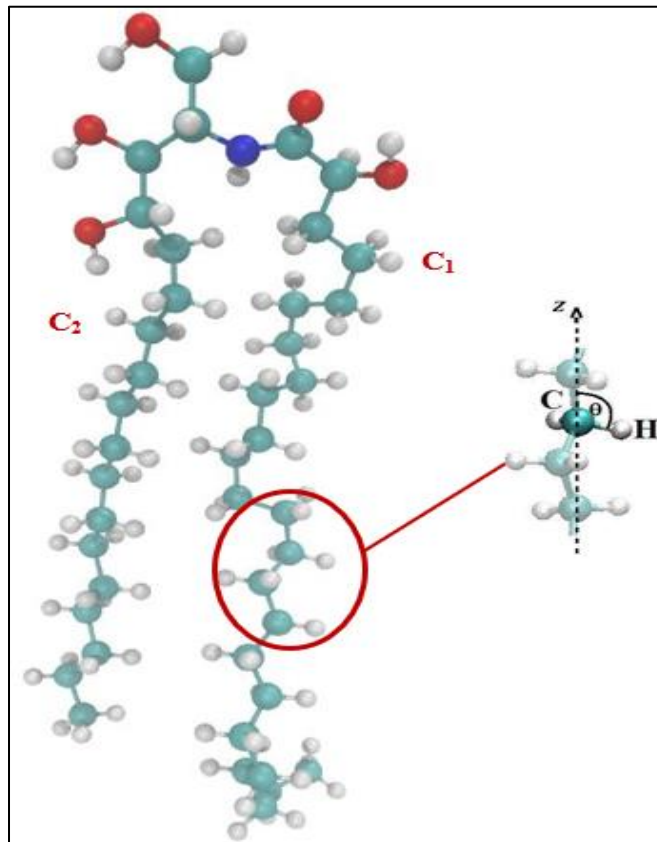


Figura 6. Medición del ángulo Θ entre el enlace C-H y el eje z de la bicapa.

3.2.5.3. Ángulo de inclinación de las cadenas acilo de los lípidos: Para definir la orientación de los lípidos que constituyen la bicapa, se determina el ángulo formado entre el eje z (perpendicular a la superficie de la bicapa) y el vector formado por los carbonos que constituyen la cadena de acilo de cada lípido.

GROMACS proporciona una herramienta, *gmx gangle*, con capacidad para calcular ángulos entre dos vectores, un vector y un plano, dos planos (definidos por 2 o 3 puntos, respectivamente), un vector/plano y el eje z, o un vector/plano y lo normal de una esfera (ver Figura 7) (Abraham *et al.*, 2019).

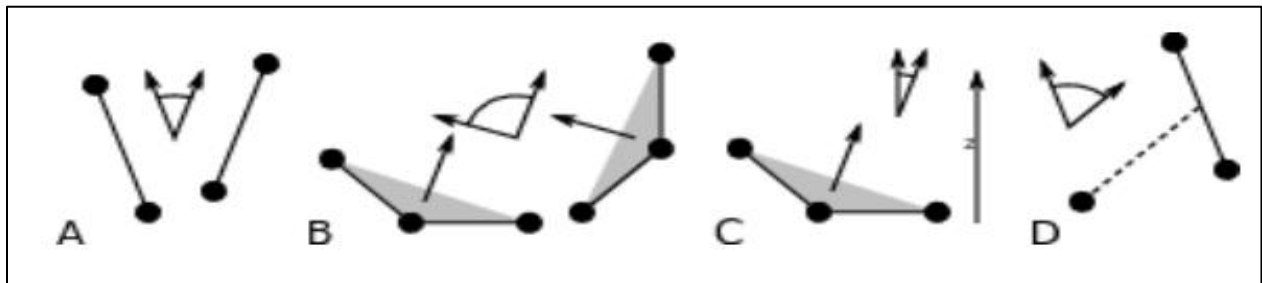


Figura 7. Opciones de cálculo de ángulos de *gmx gangle*: A. Ángulo entre dos vectores. B. Ángulo entre dos planos. C. Ángulo entre un vector y el eje z. D. Ángulo entre un vector y lo normal de una esfera. También se admiten otras combinaciones: los planos y los vectores se pueden utilizar de forma intercambiable. Tomado de Abraham *et al.* (2019).

3.2.5.4. Perfil de densidad de masa: El perfil de densidad de masa a través de la bicapa muestra cómo se distribuye la masa de los lípidos a lo largo del eje z de la bicapa. Debido a que el centro de masa de la bicapa puede fluctuar durante la simulación, para calcular el perfil de densidad de masa se determinan las coordenadas (x, y, z) de todos los átomos en relación con el centro de masa instantáneo ($z = 0$) (Moradi *et al.*, 2019).

3.2.5.5. Número de enlaces de hidrógeno: Las interacciones entre los lípidos de la membrana y las moléculas de agua en las interfaces lípido/agua son responsables de la dinámica de muchas funciones de la membrana, la estabilidad de la membrana biológica y están asociadas con varios procesos biológicos. Debido a la presencia de grupos de cabeza polares en los lípidos de las membranas, estos tienen la capacidad de formar enlaces de hidrógeno entre sí y con moléculas de agua. Por tanto, cuando se aplican condiciones diferentes a las condiciones normales, la capacidad de formación de enlaces de hidrógeno puede alterarse. En consecuencia, es necesario revisar durante las simulaciones el cambio en el número de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de lípido, y entre las moléculas de lípido y las moléculas de agua (Falck *et al.*, 2004).

Los enlaces de hidrógeno entre todos los posibles donores (D) y aceptores (A) se pueden calcular con GROMACS utilizando la herramienta *gmx hbond*. Para determinar si existe un enlace

de hidrógeno se utiliza el criterio geométrico observado en la Figura 8, en el cual: $r \leq r_{HB} = 0.35$ nm y $\alpha_{HB} \leq 30^\circ$ (Abraham *et al.*, 2019).

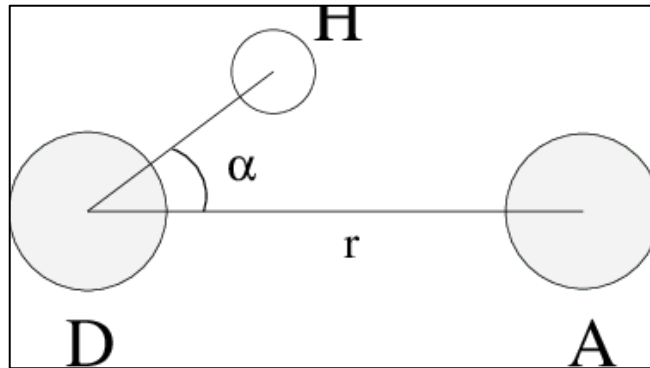


Figura 8. Criterio geométrico del enlace de hidrógeno. Tomado de Abraham *et al.* (2019).

3.2.5.6. Funciones de distribución radial (RDF, Radial distribution functions): Las funciones de distribución radial $g(r)$ representan la probabilidad de encontrar un átomo a una distancia r de otro átomo dado. La interpretación de una curva de RDF es sencilla. Las diferentes posiciones de los picos indican la distancia más probable a los átomos vecinos, los anchos de los picos representan la dispersión de estas distancias, y las áreas de los picos están relacionadas con el número de átomos dentro de una distancia específica. La distancia del primer pico corresponde a la distancia más probable al primer vecino (Moradi *et al.*, 2019).

La herramienta *gmx rdf* de GROMACS define la RDF o función de correlación de pares $g_{AB}(r)$ entre partículas de tipo A y B de la siguiente manera:

$$g_{AB}(r) = \frac{\langle \rho_B(r) \rangle}{\langle \rho_B \rangle_{local}} \quad (3.28)$$

$$\frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{local}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2} \quad (3.29)$$

con $\langle \rho_B(r) \rangle$ como la densidad de partículas del tipo B a una distancia r alrededor de las partículas A, y $\langle \rho_B(r) \rangle_{\text{local}}$ como la densidad de partículas del tipo B promediada en todas las esferas alrededor de las partículas A con radio $r_{\text{máx}}$ (ver Figura 9) (Abraham *et al.*, 2019).

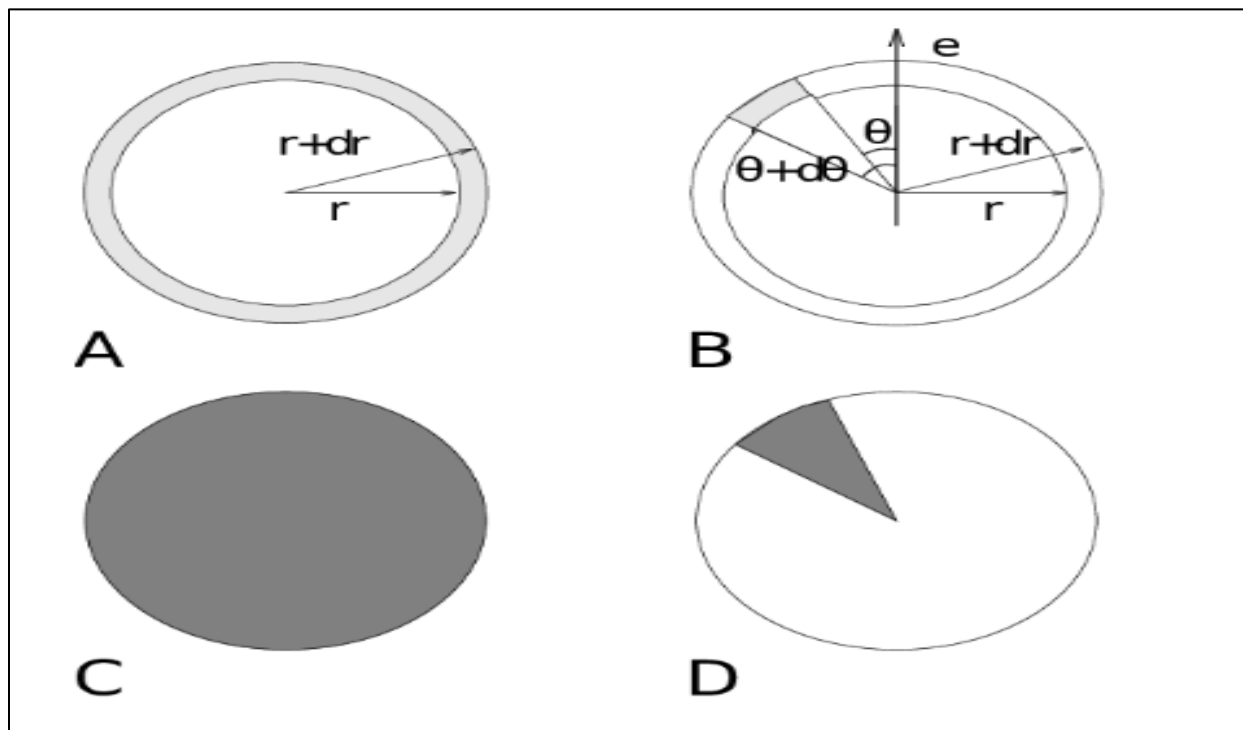


Figura 9. Definición de las rebanadas en gmx rdf: A. $g_{AB}(r)$. B. $g_{AB}(r,\theta)$. Las rebanadas son de color gris. C. Normalización $\langle \rho_B(r) \rangle_{\text{local}}$ D. Normalización $\langle \rho_B \rangle_{\text{local},\theta}$ Los volúmenes de normalización son de color gris. Tomado de Abraham *et al.* (2019)

4. Metodología

4.1. Obtención de las estructuras iniciales de la CER[NP] y CER[AP]

Inicialmente, a partir de la plataforma virtual de CHARMM-GUI (Jo, Kim, Iyer e Im, 2008), se generó un archivo de coordenadas en formato .pdb para la molécula CER[NS] por medio de la siguiente ruta de opciones: *Input generator > Membrane builder > Monolayer builder > SM (sphingo) Lipids > CER240*. Posteriormente, este archivo de coordenadas fue usado como plantilla para crear las ceramidas CER[NP] y CER[AP] utilizando el editor molecular Avogadro Version 1.2.0 (Hanwell *et al.*, 2012), se modificó la estructura inicial de la CER[NS] (ver Figura 10),

eliminando el doble enlace ubicado entre el C4 y el C5 de la cadena de la esfingosina, obteniendo así la CER[NP]. Una vez establecida la estructura de CER[NP] se adicionó un grupo OH en el C α de la cadena del ácido graso generando de esta manera la estructura de la CER[AP].

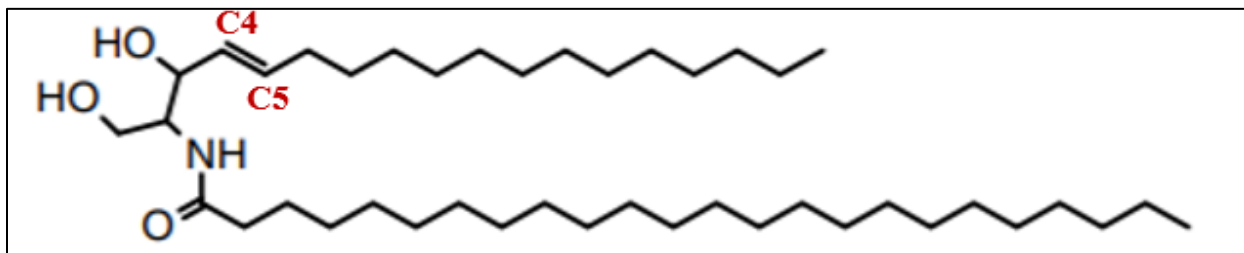


Figura 10. Estructura de la CER[NS].

Cada una de las estructuras fue optimizada por medio del campo de fuerza predeterminado en Avogadro, UFF (*Universal Force Field*), de la herramienta de optimización automática. Después, las estructuras optimizadas fueron guardadas en formato. mol, y en la opción *Ligand Reader & Modeler* de CHARMM-GUI se cargaron las coordenadas optimizadas para generar la topología molecular según el campo de fuerza CHARMM36 (Kim *et al.*, 2017) (ver Apéndice A y B).

4.2. Obtención de las bicapas lipídicas CER[NP]/CER[AP] 1:2 y 2:1

Las bicapas CER[NP]/[AP] 1:2 y 2:1, constaban de 270 lípidos (CER[NP], CER[AP], CHOL y LA) y 10.800 moléculas de agua. Las proporciones molares de CHOL y LA fueron 0,7 y 1, respectivamente, es decir, 70 moléculas de CHOL, 100 de LA, 66 o 34 moléculas de CER[NP] y 66 o 34 moléculas de CER[AP] según la proporción requerida. Se empleó una menor proporción de CHOL para evitar una fase cristalina separada, típica de los modelos simples. La construcción de la bicapa se realizó mediante el software PACKMOL (Martínez *et al.*, 2009) (ver script en el Apéndice C y D), generando una caja inicial de simulación de dimensiones X = Y = 8,0 nm y Z = 10,4 nm. Las bicapas creadas fueron hidratadas con solvente explícito usando el modelo de agua TIP3P (Jorgensen, Chandrasekhar, Madura, Impey y Klein, 1983).

Para eliminar los contactos energéticamente desfavorables entre las moléculas durante la construcción de la bicapa, se llevó a cabo una minimización de energía, utilizando el método *steepest descent* (van Der Spoel *et al.*, 2005) para cada modelo durante 5000 pasos, hasta alcanzar un valor de gradiente de energía potencial $\Delta E \leq 1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$.

A continuación, el átomo de oxígeno en la región de cabeza de cada lípido, al igual que los ángulos diedros en las cadenas acilo de CER[NP], CER[AP] y ácido lignocérico, fueron armónicamente restringidos con una constante de fuerza de $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$, asignando velocidades iniciales a partir de una distribución aleatoria Maxwell-Boltzmann de 303,15 K. Así, el modelo fue equilibrado en seis pasos durante los cuales cada restricción fue uniformemente relajada hasta llegar a cero (ver Apéndice E, F y G).

Durante la equilibración, la bicapa y el solvente fueron acoplados por separado en un baño de calor, usando el termostato de Berendsen *et al.* (1984) con una constante de relajación $\tau_T = 1 \text{ ps}$. En los primeros dos pasos de equilibración los modelos fueron simulados en un ensamble NVT. Posteriormente, pasos tres a seis, estos fueron acoplados a un ensamble NPT usando el baróstato de Berendsen *et al.* (1984) con una constante de relajación de $\tau_P = 5 \text{ ps}$ y un acople de presión semi-isotrópico con un valor de compresibilidad $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$.

4.3. Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de producción se realizaron utilizando el paquete de simulación GROMACS 2019 (Abraham *et al.*, 2019) generando trayectorias de 500 ns con un paso de integración de 2 fs. La temperatura y la presión fueron controladas por el termostato Nose-Hoover (Nosé, 1984; Hoover, 1985) y el baróstato Parrinello-Rahman (Parrinello y Rahman, 1981), respectivamente, manteniendo las constantes de relajación utilizadas en la equilibración.

Las interacciones electrostáticas fueron controladas usando el método *Particle Mesh Ewald* (Abraham y Gready, 2011); aplicando un radio corte de 1,2 nm para el cálculo de las interacciones coulombianas y de van der Waals. La longitud de los enlaces de hidrógeno fue restringida usando el algoritmo LINCS (Hess, Bekker, Berendsen y Fraaije, 1997). Todos los cálculos fueron llevados a cabo en un servidor Linux Intel Xeon CPU E5 – 2687W 3.0 GHz, con 48 procesadores y una NVIDIA GeForce GTX 1080 GPU.

4.4. Análisis

Para caracterizar la estructura de las bicapas, se midieron los siguientes parámetros: el ángulo de inclinación de las colas de los lípidos con respecto a la normal de la bicapa (es decir, el eje z), dimensiones de la caja de simulación, el parámetro de orden de deuterio, los perfiles de densidad de los lípidos a través de la normal de la bicapa, el espesor de la bicapa, el número de enlaces de hidrógeno formados (lípidos – lípidos y lípidos – agua) y la RDF sobre el carbono alfa ($C\alpha$) de cada CER en relación con el átomo de oxígeno de las moléculas de agua. En la Tabla 3 se muestran las herramientas y los programas utilizados para calcular las propiedades del modelo de bicapa lipídica sobre los 500 ns de la simulación a 303,15 K.

Tabla 3

Programas y herramientas utilizadas para el análisis de los resultados de las simulaciones de dinámica molecular

Parámetro	Programa	Herramienta	Referencia
Espesor de la bicapa	GridMAT-MD	-	Allen, 2009
Perfiles de densidad	GROMACS	gmx density	Abraham <i>et al.</i> , 2019
Ángulo de inclinación de los lípidos	GROMACS	gmx gangle	Abraham <i>et al.</i> , 2019
Número de enlaces de hidrógeno formados	GROMACS	gmx hbond	Abraham <i>et al.</i> , 2019
Función de distribución radial	GROMACS	gmx rdf	Abraham <i>et al.</i> , 2019

5. Resultados y análisis

En la Figura 11 se muestran las estructuras de las ceramidas CER[AP] y CER[NP] en las que se señalan los átomos relevantes para la comprensión de los resultados. Estas estructuras se obtuvieron por la modificación estructural de la CER[NS] con el editor molecular AVOGADRO (Hanwell *et al.*, 2012). Es evidente que la CER[NP] y la CER[AP] sólo difieren por un OH en el C α del ácido graso.

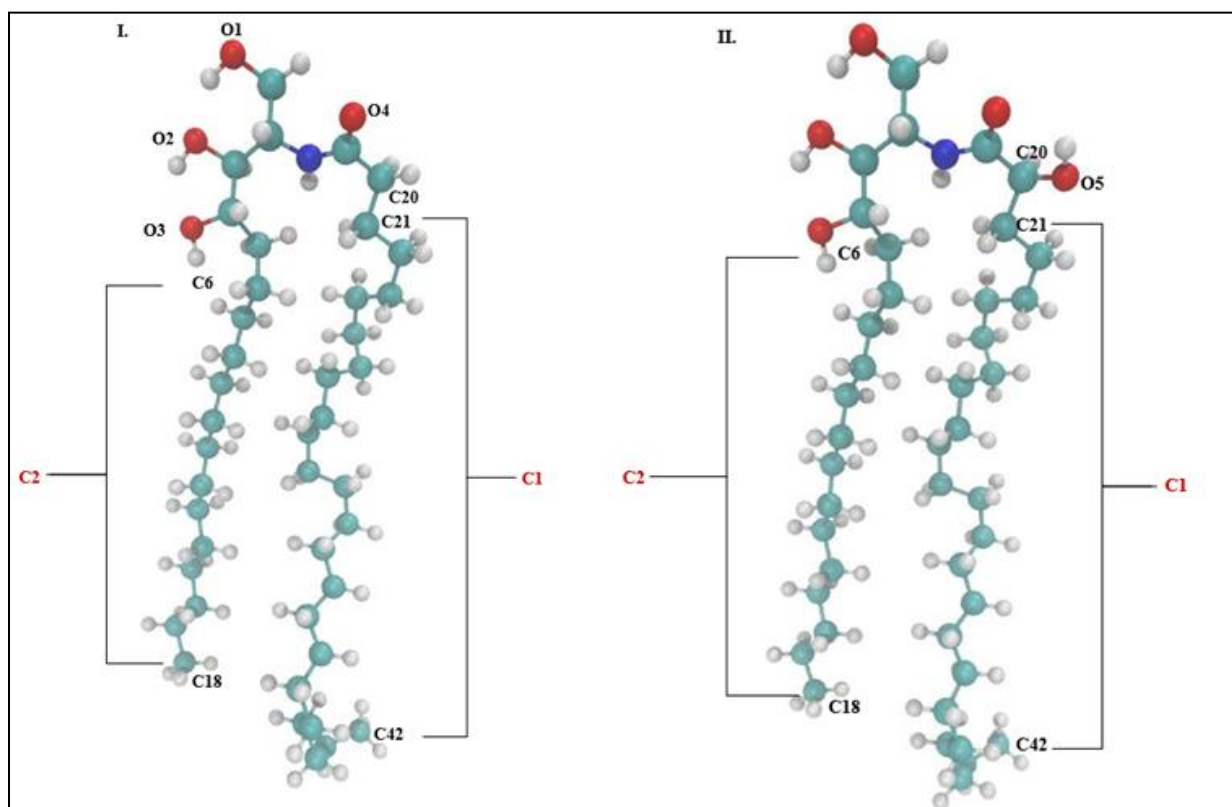


Figura 11. Estructuras químicas de las ceramidas en estudio: I) CER[NP] y II) CER[AP]. Se señalan los átomos que se utilizan para cálculos posteriores.

Con las topologías de la CER[NP], la CER[AP] (ver Apéndice A y B), el ácido lignocérico y el colesterol, usando el software PACKMOL (Martínez *et al.*, 2009) se construyeron las bicapas de proporciones CER[NP]/CER[AP] 1:2 y 2:1, constituidas por 270 lípidos e hidratadas con 10.800 moléculas de agua. Adicionalmente, para eliminar las interacciones y las conformaciones

energéticamente desfavorables entre las moléculas, producidas durante la construcción de las bicapas, se llevó a cabo un proceso de minimización de energía y equilibración del modelo, utilizando un parámetro de varios pasos descrito en la sección de metodología.

A partir de cada modelo de bicapa se realizaron simulaciones de dinámica molecular con un tiempo de simulación de 500 ns utilizando el paquete GROMACS 2019 (Abraham *et al.*, 2019).

En la Figura 12 se muestra la conformación final de las bicapas después de 500 ns de simulación.

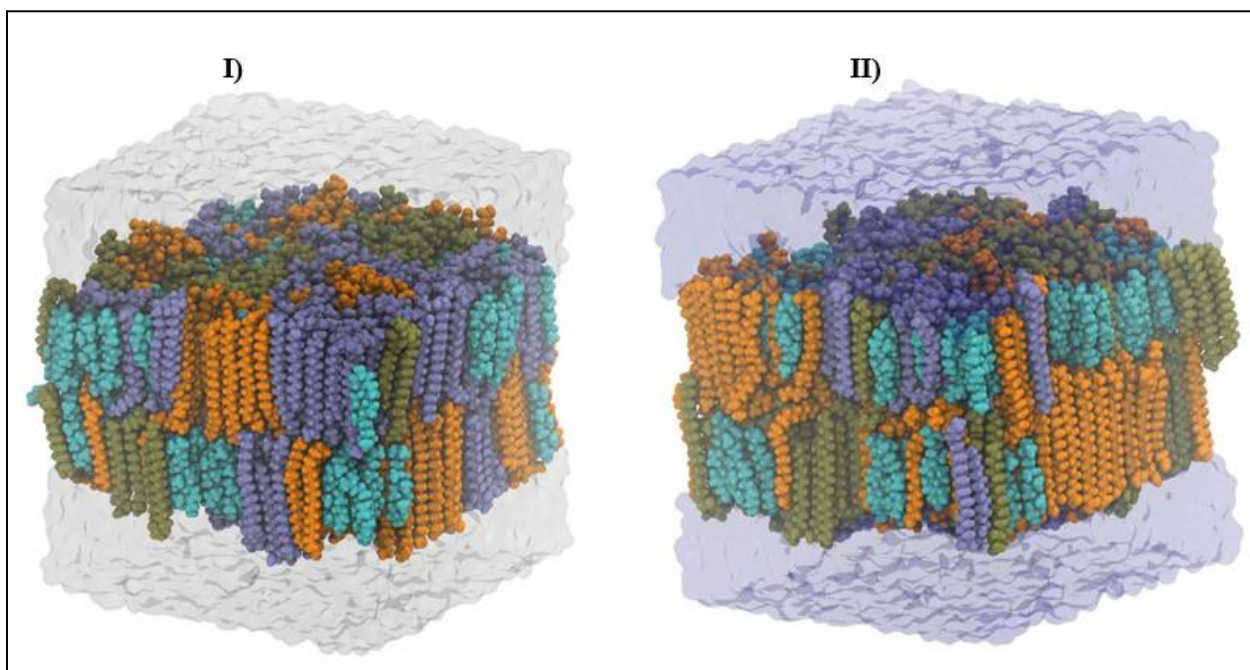


Figura 12. Vista frontal (en dirección al eje z) de las bicapas al final de la simulación de 500 ns: I) CER[NP]/CER[AP] 1:2 y II) CER[NP]/CER[AP] 2:1. La CER[NP] se muestra en verde, la CER[AP] se muestra en púrpura, el ácido lignocérico se muestra en naranja y el colesterol se muestra en cian. En la vista I, el agua se representa en gris transparente, y en la vista II en azul transparente. Las imágenes se elaboraron utilizando el software VMD (Humphrey, Dalke y Shulten, 1996).

Para caracterizar estructuralmente los modelos de bicapa del estrato córneo se midieron sobre los 500 ns de simulación las siguientes propiedades: el espesor de la bicapa, el parámetro de orden de deuterio, los perfiles de densidad a través de la bicapa, el ángulo de inclinación de los lípidos, el número de enlaces de hidrógeno (lípidos – lípidos y lípidos – agua) y la función de distribución radial (RDF, *radial distribution function*) sobre el carbono α ($C\alpha$) de cada CER en relación con el

átomo de oxígeno de las moléculas de agua. A continuación, se muestran los resultados y el análisis de los mismos.

5.1. Espesor y dimensiones del modelo de bicapa durante la dinámica molecular

Una de las propiedades centrales en la descripción de bicapas lipídicas es el espesor (Moradi *et al.*, 2019). En este caso, este parámetro es necesario para comprobar que el modelo simulado presenta dimensiones similares al modelo experimental de comparación y, a su vez, con una bicapa lipídica del estrato córneo de la epidermis humana. Para el cálculo de este parámetro se utilizó el programa GridMAT-MD (Allen *et al.*, 2009), el cual lee un archivo de coordenadas generado durante la simulación de dinámica molecular, considera un átomo de referencia en la capa superior, busca el átomo de referencia más cercano en la capa opuesta y la diferencia entre las coordenadas la define como el valor de espesor. En la Tabla 4 se muestra el espesor de la bicapa lipídica simulada. El cálculo de este parámetro se realizó considerando simultáneamente todos los átomos de referencia ubicados en las cabezas polares de los lípidos que conforman la bicapa (Total_{Simu}) y considerando un átomo de referencia por cada tipo de lípido de manera individual. Los resultados se comparan con el valor reportado por Schmitt *et al.* (2018) (Total_{Exp}).

Tabla 4
Espesor de las bicapas lipídicas. El TotalExp, representa el valor experimental reportado por Schmitt et al. (2018). El TotalSim representa el valor obtenido por las bicapas simuladas durante 500 ns. El espesor en nm fue calculado con el programa GridMAT-MD

Bicapa CER[NP]/CER[AP]	Espesor (nm)					
	Total _{Exp}	Total _{Simu}	CER[NP]	CER[AP]	Ácido lignocérico	Colesterol
1:2	5,45 ± 0,10	5,1 ± 0,62	5,4 ± 0,43	5,5 ± 0,57	5,2 ± 0,54	4,5 ± 0,36
2:1	5,45 ± 0,10	5,0 ± 0,48	5,4 ± 0,32	5,5 ± 0,38	4,8 ± 0,35	4,5 ± 0,42

Con estos resultados se puede observar que los modelos de bicapa CER[NP]/CER[AP] 1:2 y 2:1 representan la matriz lipídica del SC, formando un sistema laminar continuo de espesor de 5,1 ± 0,62 nm para la bicapa [NP]/[AP] 1:2 y 5,0 ± 0,48 nm para la bicapa [NP]/[AP] 2:1, lo que es

consistente con el valor estimado (5,0 – 6,0 nm) para la fase de periodicidad corta (SPP, *short periodicity phase*) en el SC humano nativo (Madison, Swartzendruber, Wertz y Downing, 1987; Bouwstra, Gooris, van der Spek y Bras, 1991; Bouwstra, Gooris y Ponec, 2002). Además, el espesor de los modelos se asemeja al reportado por Schmitt *et al.* (2018). Sin embargo, en este caso el espesor es ligeramente menor en la bicapa con proporción [NP]/[AP] 2:1, causado posiblemente por un mayor solapamiento de las cadenas acilo de algunos de los lípidos constituyentes.

Otro parámetro importante por considerar es la variación de las dimensiones de los modelos bicapa durante la simulación. Cabe destacar que, las dimensiones iniciales de cada una de las bicapas preparadas con PACKMOL fueron $X = Y = 8,0$ nm y $Z = 10,4$ nm. Después de la equilibración del modelo estas dimensiones cambiaron debido a que la bicapa se hizo más compacta (reducción del eje Z). En la Figura 13 se puede evidenciar que hasta ≈ 20 ns las dimensiones se estabilizan en un valor, fluctuando en el eje X y Y $\approx \pm 0,1$ nm y en el eje Z $\approx \pm 0,2$ nm durante los 480 ns de simulación restantes. Por tanto, los 20 ns iniciales de simulación no se incluyeron en el análisis de resultados.

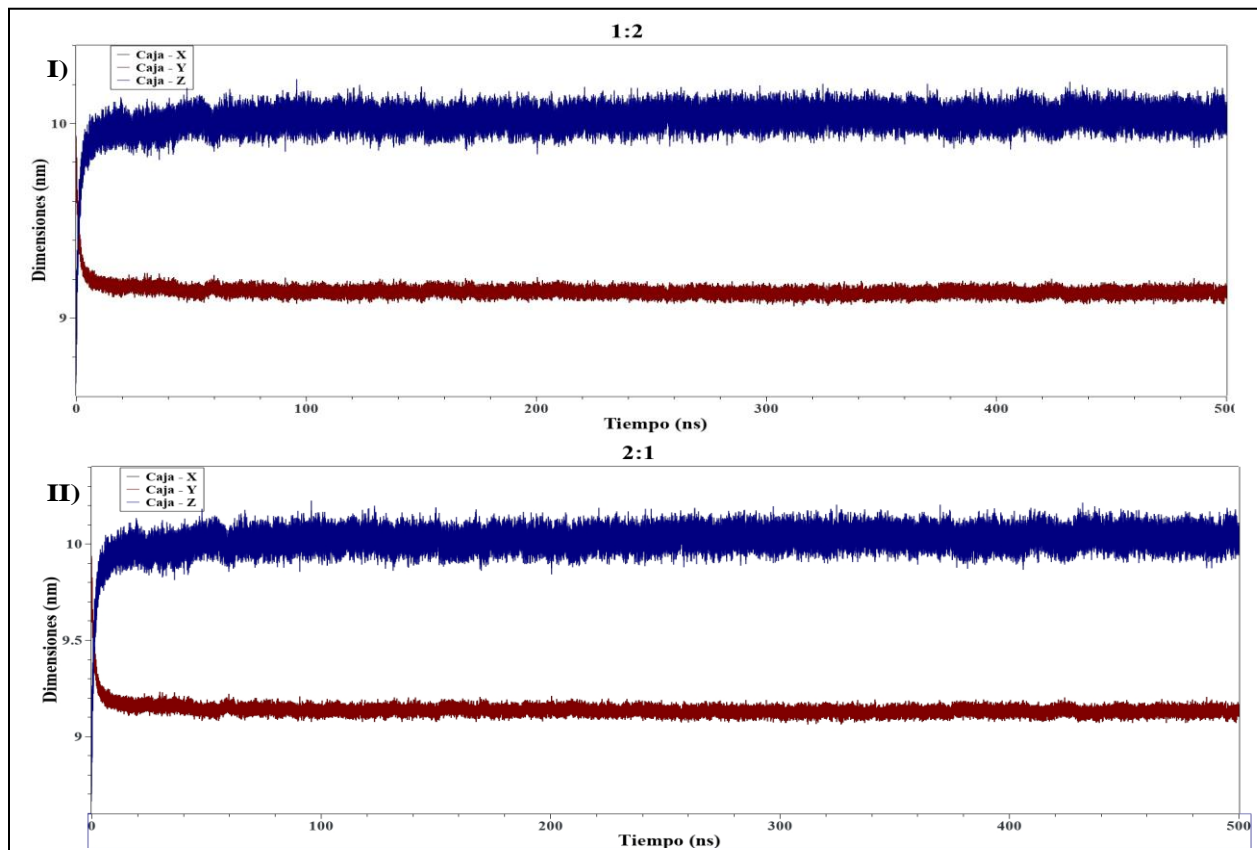


Figura 13. Dimensiones de la bicapa CER[NP]/CER[AP]: I) 1:2 y II) 2:1 a lo largo de los ejes X (negro), Y (rojo) y Z (azul) durante los 500 ns de simulación.

5.2. Análisis de parámetros de orden

En función de su fluidez, las membranas biológicas, dependiendo de la temperatura, presión e hidratación, y de sus propiedades estructurales, como la longitud de las colas de hidrocarburos y la composición del grupo de cabeza, pueden dividirse en diferentes fases como se muestra en la Figura 14.

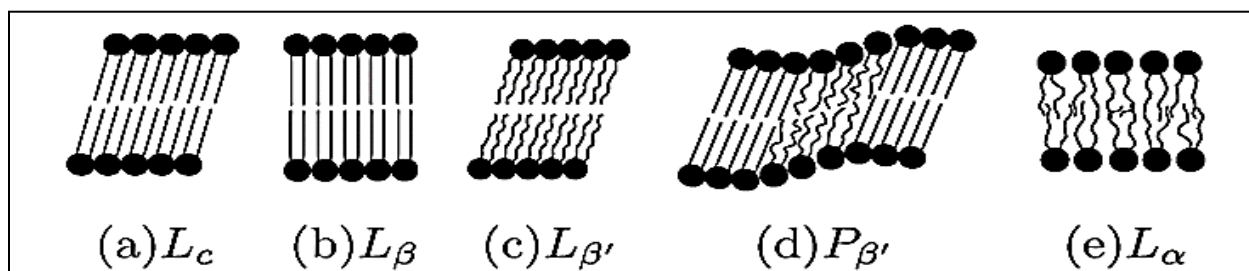


Figura 14. Esquemas de las diferentes fases de la bicapa. Los círculos llenos representan el grupo de cabeza hidrofílico de un fosfolípido y las líneas representan las colas hidrofóbicas. Tomado de Kranenburg y Smit (2005).

Una de estas es la fase subgel (L_c), en la que las colas de hidrocarburos están altamente ordenadas y muestran una inclinación con respecto a la bicapa. Dependiendo de la composición estructural del grupo de cabeza de los lípidos, la fase de gel puede ser la fase L_β o la fase $L_{\beta'}$, en estas fases de gel, la bicapa está más hidratada que en la fase L_c y las colas de hidrocarburos siguen mostrando un orden alto, pero menor que en la fase L_c . En la fase L_β las colas se ordenan paralelas al eje z de la bicapa, mientras que en la fase $L_{\beta'}$ las colas muestran un ángulo de inclinación con respecto a este eje. Otra fase es la fase líquida cristalina o fluida (L_α), en la que las colas están desordenadas y no muestran ninguna inclinación constante, es decir el ángulo varía constantemente (Kranenburg y Smit, 2005).

De este modo, con el fin de determinar cuan ordenados están los lípidos y su orientación en las bicapas simuladas, se calcularon los parámetros de orden como se indica en la Figura 5. El perfil de parámetros de orden obtenido por la cadena uno (c_1 representa la cadena acilo del ácido graso) y la cadena dos (c_2 representa la cadena acilo de la fitoesfingosina) de cada CER y el ácido lignocérico se muestra en la Figura 15.

Las curvas fueron trazadas en función de la posición de cada uno de los carbonos a lo largo de la cadena acilo de los lípidos. El átomo de carbono más cercano al grupo hidroxilo se designa con el número 1.

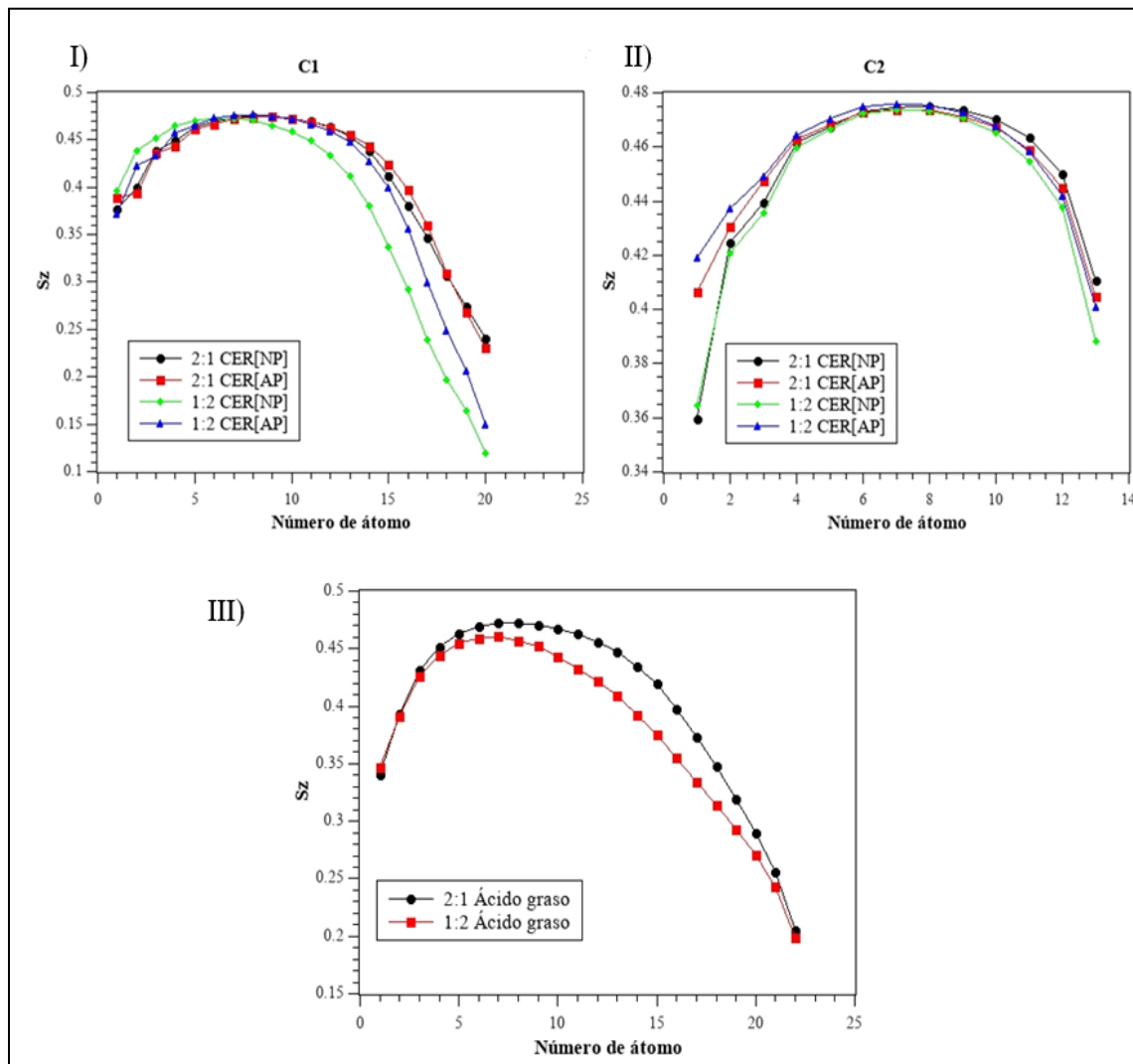


Figura 15. Parámetros de orden obtenidos por: I) c1 de CER[NP] y CER[AP], II) c2 de CER[NP] y CER[AP] y III) cadena de ácido lignocérico en las bicapas CER[NP]/[AP] 2:1 y 1:2.

En las gráficas I-II se observa que hay un mayor grado de desorden, representado por un valor de S_z más bajo con respecto al de los carbonos subsiguientes, en los grupos alquilo cercanos a la interfase lípido/agua, lo cual es resultado de las interacciones electrostáticas existentes entre los grupos de cabeza polar de los lípidos con las moléculas de agua. El parámetro de orden de las colas aumenta al descender por la cadena y disminuye de nuevo hacia el centro de la bicapa. El desorden en el centro de la bicapa se debe a que las cadenas tienen un mayor grado de flexibilidad

conformacional, particularmente en las cadenas más largas (c_1 y la cadena del ácido lignocérico), resultado de las interacciones hidrofóbicas con las colas de la capa opuesta.

Al examinar el parámetro de orden para la c_1 de cada una de las CER, los valores de S_z permanecen constantes a lo largo de la zona central (C6 - C12) y descienden hacia el final de la cola de la cadena hidrocarbonada. Los átomos de carbono terminales (C13 - C20) en el modelo [NP]/[AP] 2:1 con ambas CER exhiben parámetros de orden similares, por el contrario, en el modelo [NP]/[AP] 1:2 el orden conformacional disminuye más abruptamente en la CER[NP] que en la CER[AP], esto puede atribuirse al hecho de que las cadenas de hidrocarburos están más inclinadas y su orientación general ya no es paralela a la bicapa con respecto al eje z.

Al no observarse un perfil de parámetros de orden con valores similares entre los constituyentes de cada modelo, se puede predecir que cada bicapa presenta características de una fase fluida, es decir, las colas están desordenadas y no muestran una inclinación constante. Sin embargo, para concluir que es una bicapa de tipo fluida es necesario calcular los ángulos de inclinación de las cadenas lipídicas con respecto al eje z, y observar que las moléculas no presentan un ángulo definido durante la simulación.

5.3. Análisis de los perfiles de densidad lipídicos

Como ya se mencionó, el espesor y el parámetro de orden para la c_1 en la bicapa [NP]/[AP] 1:2 son menores, en comparación con los de la bicapa [NP]/[AP] 2:1, esto puede ser debido a que existe un mayor solapamiento en este modelo. No obstante, con los resultados previos no es posible identificar cuáles lípidos presentan este entrecruzamiento.

Para evidenciar qué lípidos presentan el entrecruzamiento es necesario examinar los perfiles de densidad lipídicos, puesto que en estos perfiles se muestra cómo se distribuye la densidad de masa de cada lípido a lo largo del eje Z de la bicapa.

Los perfiles de densidad lipídica de cada uno de los modelos son mostrados en la Figura 16. Se observa que presentan las características esperadas para una bicapa lipídica (Moradi, Nowroozi y Shahlaei, 2019; Egberts y Berendsen, 1988), puesto que cerca de la interfaz lípido/agua los perfiles de cada uno de los lípidos presentan un pico correspondiente a los átomos de los grupos de cabeza. Además, justo después de la región del grupo de cabeza, hay una región de cola de alta densidad donde las colas están densamente empaquetadas (puntos negros), y en el centro de la bicapa ($Z=0$) se presentan distintas densidades, donde algunas de las colas lipídicas son menos densas, picos en forma de V (puntos rojos), y otras presentan una mayor densidad en esta región (puntos amarillos).

Es importante mencionar que, el colesterol y el ácido lignocérico tienen dos efectos en los perfiles de densidad. En primer lugar, al tener grupos de cabeza más pequeños, estos lípidos conducen a picos de tamaño reducido, en comparación con los picos de CER en esta región. En segundo lugar, el ácido lignocérico muestra un pico pronunciado en el centro del perfil de densidad debido a la mayor longitud de su cola (Moore, Hartkamp, Iacovella, Bunge y McCabe, 2018).

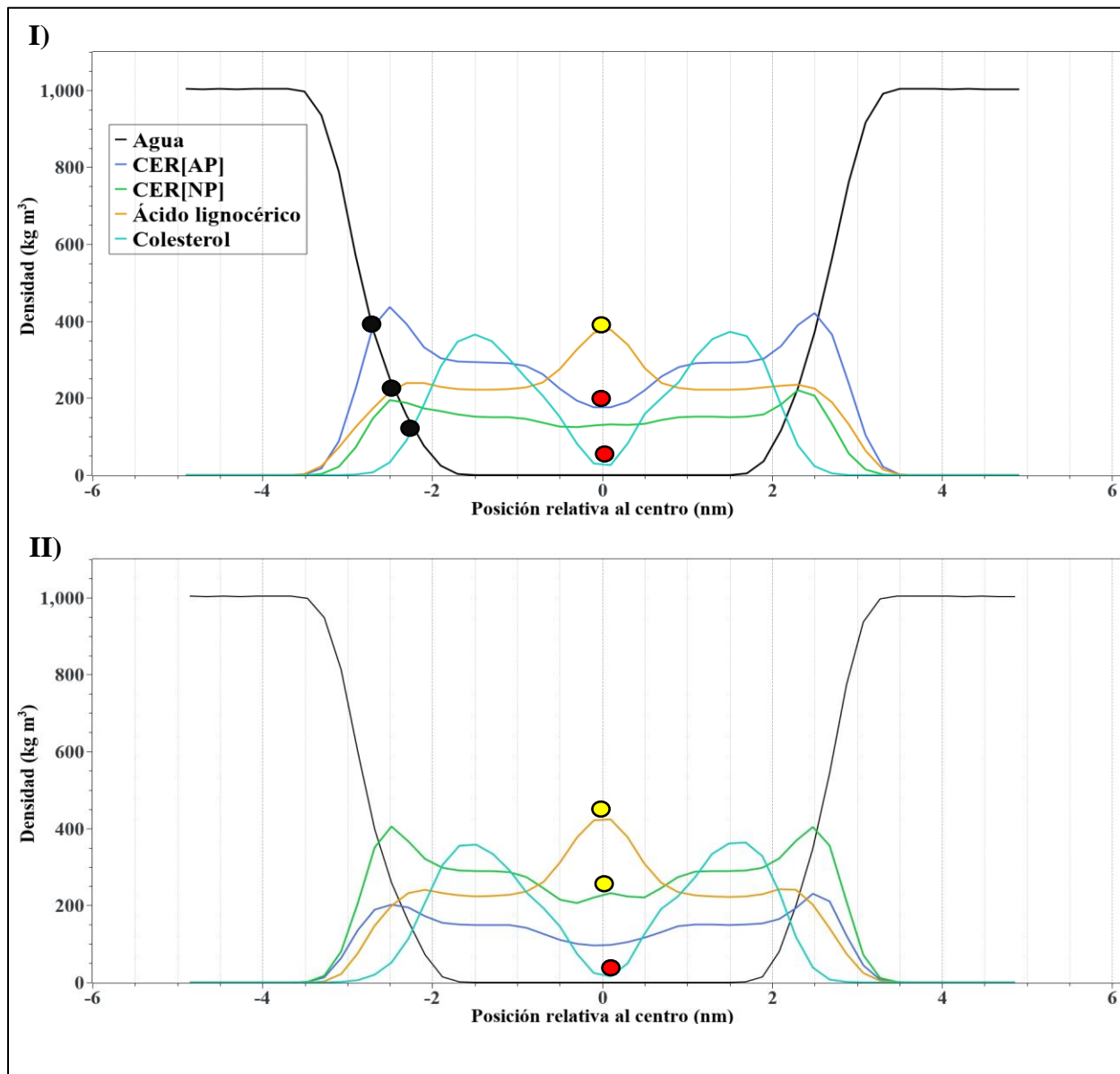


Figura 16. Perfiles de densidad de los componentes individuales de las bicapas a lo largo del eje z, calculados en el modelo CER[NP]/[AP]: I) 1:2 y II) 2:1. Z=0 corresponde al centro de la bicapa. Los puntos negros señalan los picos de densidad correspondientes a la interfase lípido/agua, los puntos rojos la zonas de baja densidad y los puntos amarillos las zonas de alta densidad en centro de la bicapa

La picos de alta densidad Z=0 está compuesta por los carbonos terminales de las colas de la CER[NP] y del ácido lignocérico, como se muestra en la Figura 17, en donde se puede evidenciar la densidad de los carbonos que constituyen las cadenas de acilo (en las CER: C6 – C42, exceptuando el C α) de cada uno de los lípidos. En ambos modelos, el perfil tiene forma de V para

la CER[AP] y el colesterol, esto permite verificar que no hay solapamiento entre las colas de estos lípidos con las colas de la capa opuesta.

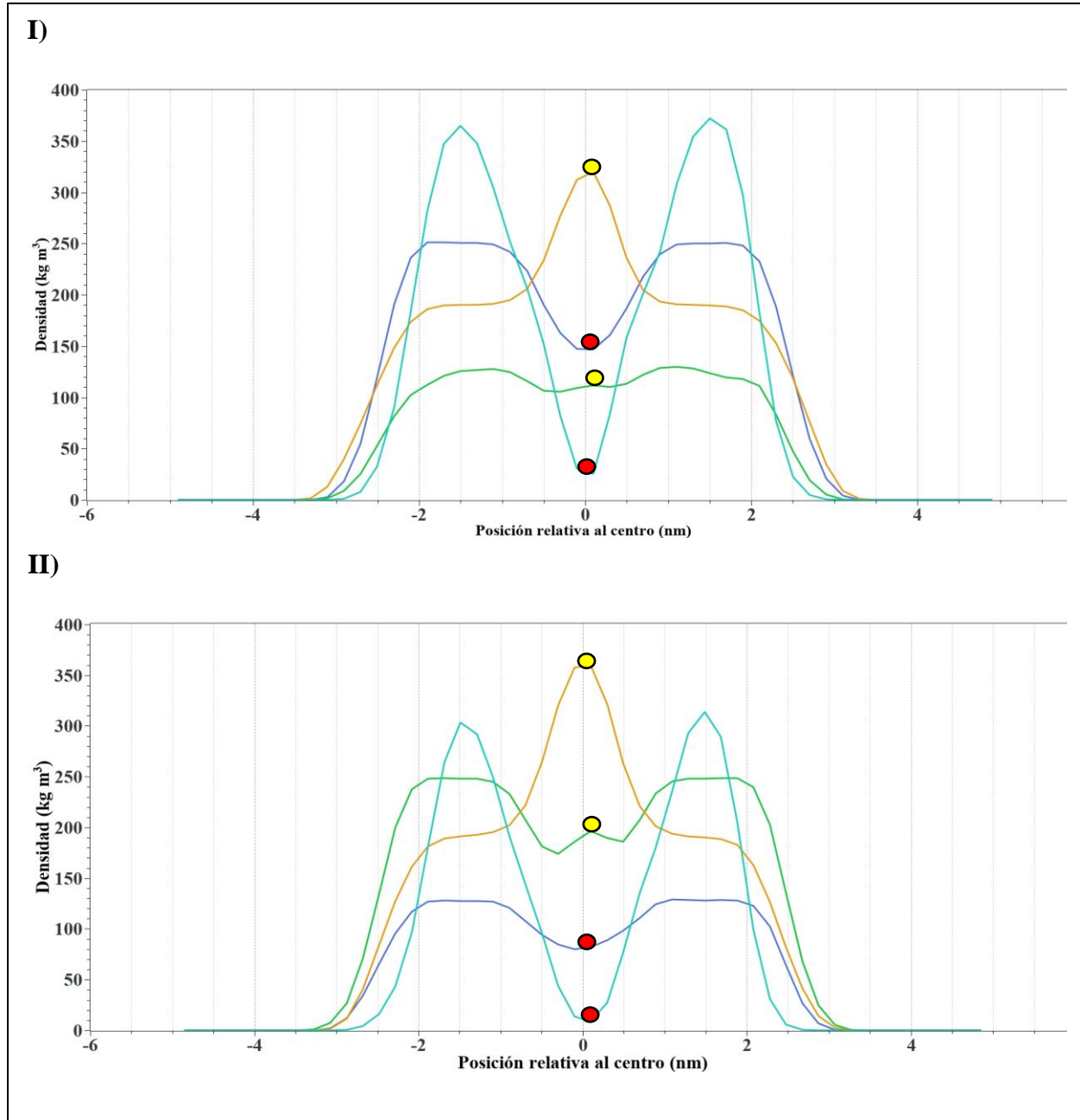


Figura 17. Perfiles de densidad de las cadenas de acilo de los componentes individuales de las bicapas a lo largo del eje z en el modelo CER[NP]/[AP]: I) 1:2 y II) 2:1. Z=0 corresponde al centro de la bicapa. Los puntos negros señalan los picos de densidad correspondientes a la interfase lípido/agua, los puntos rojos la zonas de baja densidad y los puntos amarillos las zonas de alta densidad en centro de la bicapa

En la Figura 18 se muestra el perfil de densidad total para cada tipo de CER en ambas bicapas. Se evidencia que independientemente de la concentración, la CER[NP] presenta entrecruzamiento con las colas de la capa opuesta, mientras que la CER[AP] no muestra el mismo comportamiento. Adicionalmente, en la Figura 19 se comparan los perfiles de densidad de las cadenas acilo de la CER[NP] con los carbonos terminales (C38 – C42) de esta misma cadena. En este caso, se observa que a una menor concentración de la CER el solapamiento disminuye.

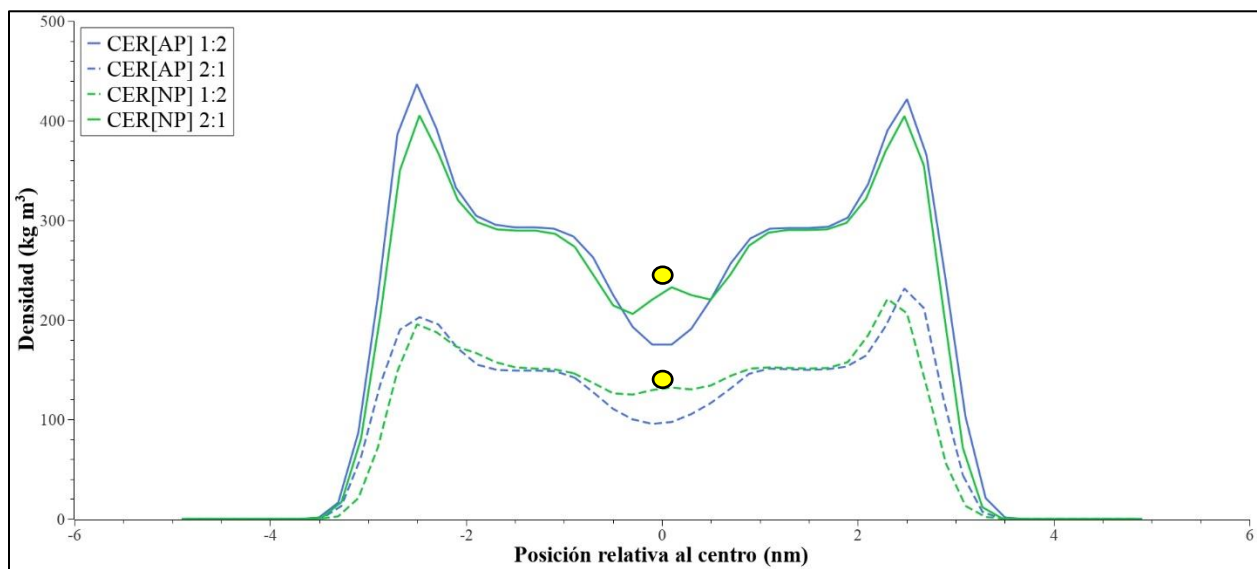


Figura 18. Perfiles de densidad de las ceramidas a lo largo del eje z en cada modelo CER[NP]/ [AP]. Z=0 corresponde al centro de la bicapa. Los puntos amarillos señalan el solapamiento, representado por picos que incrementan su altura.

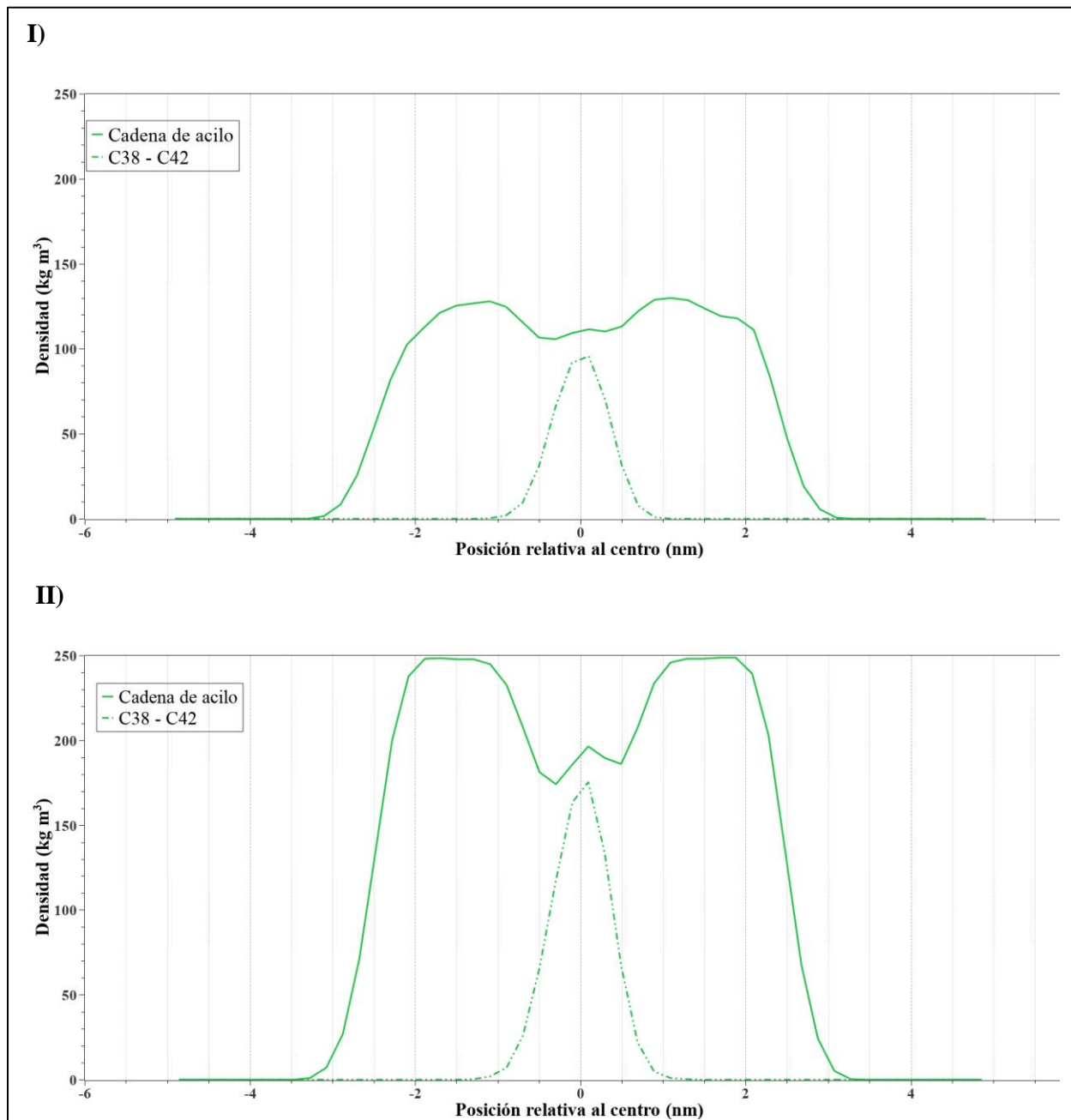


Figura 19. Perfil de densidad de la cadena de acilo y del C38 al C42 de la CER[NP] a lo largo del eje z en el modelo CER[NP]/[AP]: I) 1:2 y II) 2:1. Z=0 corresponde al centro de la bicapa.

En síntesis, en el centro de las bicapas simuladas se observa un entrecruzamiento entre las colas de del ácido lignocérico y la CER[NP] con las colas de la capa opuesta, lo que discrepa de lo que concluyen Schmitt *et al.* (2018); ellos reportan que las colas de todos los lípidos se superponen en el centro laminar, pero observan que la CER[AP] presenta una reducción de este comportamiento,

lo que origina una disposición inclinada de las cadenas. No obstante, en los perfiles mostrados en las Figuras 17 y 18 la CER[AP] presenta forma de V, lo que indica que no hay solapamiento.

5.4. Análisis de los ángulos de inclinación de las ceramidas

Al realizar una fotografía de la vista frontal de cada una de las bicapas al finalizar los 500 ns de simulación, y resaltando moléculas aleatoriamente, se obtienen las imágenes mostradas en la Figura 20, en las cuales se puede corroborar la interpretación molecular realizada anteriormente sobre los parámetros de orden, puesto que las moléculas anfifílicas están ancladas con sus grupos polares en la interfaz lípido-agua, generando un estado de compactación en las cabezas polares que impone restricciones estéricas en las cadenas de hidrocarburos cercanas, reduciendo la libertad conformacional, es por esta razón que el parámetro de orden es casi constante en la cabeza polar de los lípidos. En la parte central de la bicapa, que es la región de los extremos libres, se alivian las restricciones estéricas y disminuye el parámetro de orden (Seelig, 1977).

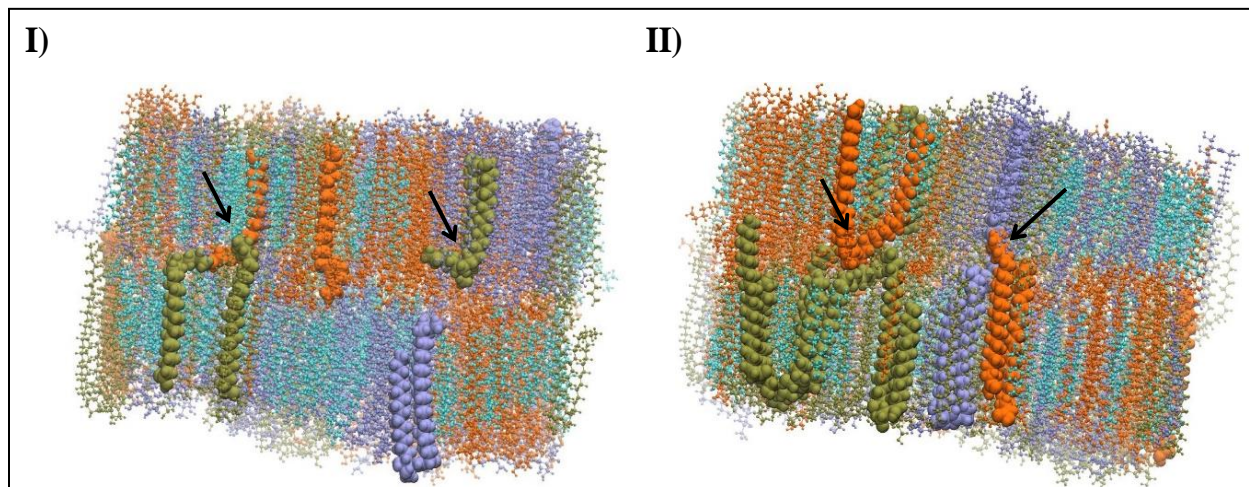


Figura 20. Vista frontal de las bicapas al final de la simulación de 500 ns: I) CER[NP]/CER[AP] 1:2 y II) CER[NP]/CER[AP] 2:1. Se señalan algunas moléculas aleatoriamente, con el fin de evidenciar las diferentes conformaciones para un mismo tipo de lípido. La CER[NP] se muestra en verde, la CER[AP] se muestra en púrpura, el ácido lignocérico se muestra en naranja y el colesterol se muestra en cian. Las imágenes fueron creadas utilizando el software VMD. Las flechas indican las torceduras.

Sin embargo, en la Figura 20 se observa la formación de pliegues o torceduras en algunas de las moléculas de CER[NP] y de ácido lignocérico seleccionadas. Estos segmentos no se reflejan

en los parámetros de orden, ya que sus vectores de cadena son paralelos entre sí y no afectan este valor. Así mismo, para un mismo tipo de lípido se notan diferentes ángulos de inclinación. Por tanto, en la Figura 21 se ilustra el promedio del ángulo de inclinación con respecto al eje Z calculado por la herramienta *gmx gangle* del paquete GROMACS 2019 para cada una de las moléculas que constituyen las bicapas, igualmente, se puede visualizar la desviación estándar de este valor representada como barras de error en el eje Y de la gráfica.

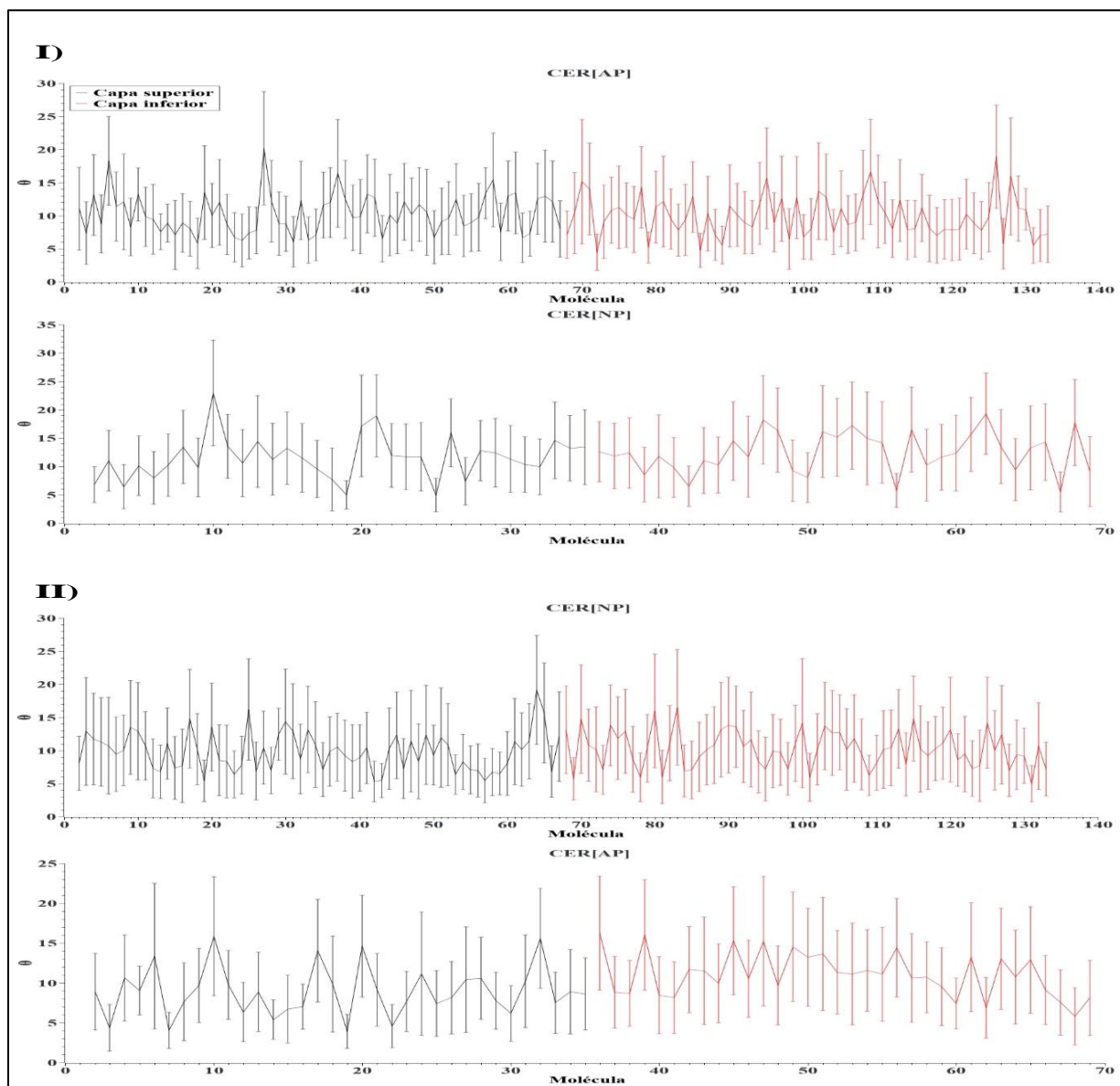


Figura 21. Ángulos de inclinación de cada una de las moléculas de CER en el modelo CER[NP]/[AP]: I) 1:2 y II) 2:1.

A partir de la gráfica se puede establecer que durante la simulación no se observa que los lípidos presenten un único ángulo de inclinación, por el contrario, este oscila considerablemente durante toda la simulación. Por consiguiente, se puede demostrar que ambos modelos de bicapa son fuertemente fluidos. Igualmente, en la Figura 22, se ilustra el ángulo de inclinación de los cinco carbonos terminales con respecto al eje Z de cada CER en el modelo [NP]/[AP] 2:1, en los cuales se presentan los pliegues. En este caso, ocurre el mismo comportamiento, no existe un ángulo de inclinación fijo, en cambio, la desviación de este parámetro es mayor con respecto al de la cadena completa.

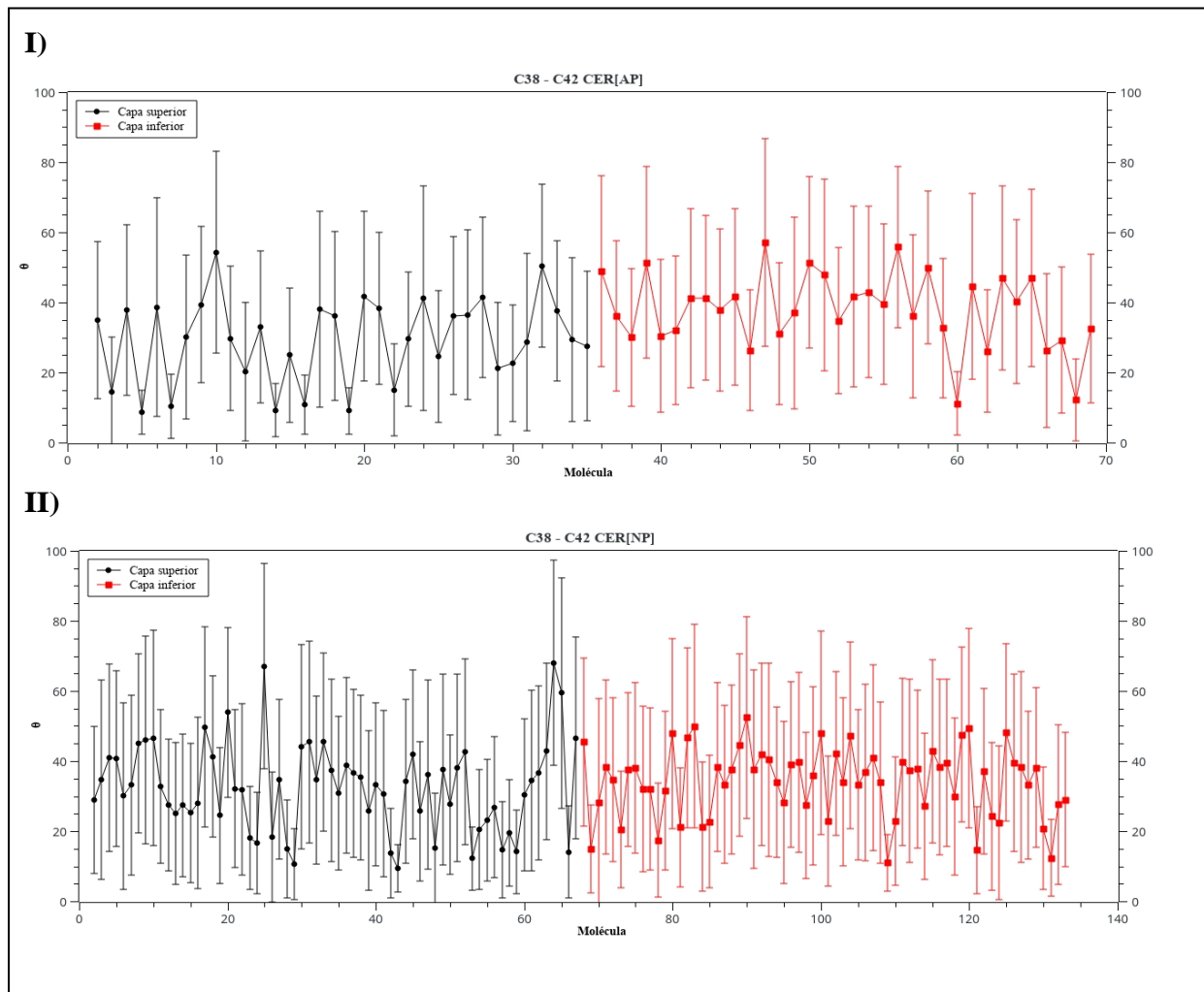


Figura 22. Ángulos de inclinación entre el C38 y el C42 de cada una de las moléculas de CER en el modelo CER[NP]/[AP] 2:1.

Por lo tanto, estos resultados difieren de los reportados por Schmitt *et al.* (2018), en los cuales se establece la inclinación de las cadenas acilo de los lípidos en el modelo [NP]/[AP] 1:2 es causada por un menor solapamiento entre las cadenas de las ceramidas opuestas. Esta hipótesis de inclinación está limitada a la longitud de onda de los neutrones (4,6 Å), que no permite una resolución atómica. Además, el análisis de la densidad de la longitud de dispersión de neutrones (NSLD, neutron scattering length density) solamente da información estructural alrededor de una única línea perpendicular a la bicapa. En consecuencia, las simulaciones computacionales realizadas complementan estos resultados experimentales, aportando información con resolución atómica que permite constatar que la inclinación se presenta en ambos modelos, pero las moléculas adquieren diferentes conformaciones estructurales a través de los 500 ns, lo que conlleva a que el ángulo con respecto al eje Z varíe constantemente, sin embargo, es importante destacar que una de las limitaciones de esta simulación es que hasta ahora solo ha sido simulada una sola bicapa y la matriz lipídica del estrato córneo está constituida por múltiples bicapas.

5.5. Análisis de las interacciones del modelo de bicapa del estrato córneo

Debido a la presencia de grupos de cabeza polares en los lípidos, estos tienen la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua y con las cabezas polares de otros lípidos. Por esto, en la Tabla 5 se presenta el promedio del número de enlaces de hidrógeno formados entre las moléculas de agua y las moléculas de CER, y las moléculas de CER entre sí, con el fin de analizar los cambios en la capacidad de formación de esta interacción electrostática producidos por las diferencias estructurales entre las dos CER en estudio. Cabe destacar que, se adoptó como criterio para la medición de un enlace de hidrógeno una distancia donante-aceptor inferior a 0,35 nm, y un ángulo entre este vector inferior a 35° (Luzar, 2000).

Tabla 5

Número total de enlaces de hidrógeno formados por las CER de cada bicapa.

Tipo de enlace de hidrógeno	Número de enlaces de hidrógeno formados por molécula*	
	Bicapa CER[NP]/CER[AP]	
	1:2	2:1
Lípido – Lípido		
CER[NP] – CER[NP]	2,48 ± 0,62	2,51 ± 0,80
CER[AP] – CER[AP]	2,85 ± 0,93	2,82 ± 0,49
CER[NP] – CER[AP]	1,35 ± 0,55	1,37 ± 0,23
CER[AP] – CER[NP]	1,37 ± 0,55	1,35 ± 0,23
Lípido – Agua		
CER[NP] – Agua	7,38 ± 0,13	7,31 ± 0,19
CER[AP] – Agua	9,09 ± 0,21	9,15 ± 0,14

*Los valores reportados fueron determinados por herramienta gmx hbond del paquete GROMACS 2019 con base en la distancia de corte (0,35 nm) Donante – Aceptante del enlace de hidrógeno derivado con el modelo de Luzar (2000). Los grupos OH y NH son considerados como donantes, O y N son aceptantes por defecto.

En general, el número de enlaces de hidrógeno entre CER de la misma especie no aumenta en relación con una mayor concentración del lípido. Al comparar el número de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua y las CER, es evidente que la CER[AP] en ambas proporciones favorece de manera significativa esta interacción electrostática, evidenciándose que el grupo OH adicional aumenta la probabilidad de formación del enlace.

Para obtener una perspectiva cualitativa de las asociaciones electrostáticas, se trazaron distribuciones gaussianas promediadas del número de enlaces de hidrógeno totales formados para cada una de las CER en relación con los átomos de oxígeno del agua. Estas gráficas de distribución se reportan en la Figura 23. En general, el grupo OH ubicado en el C α de la CER[AP] aumenta el número de enlaces de hidrógeno existentes con los átomos de oxígeno del agua, incrementando la solvatación en ambos modelos.

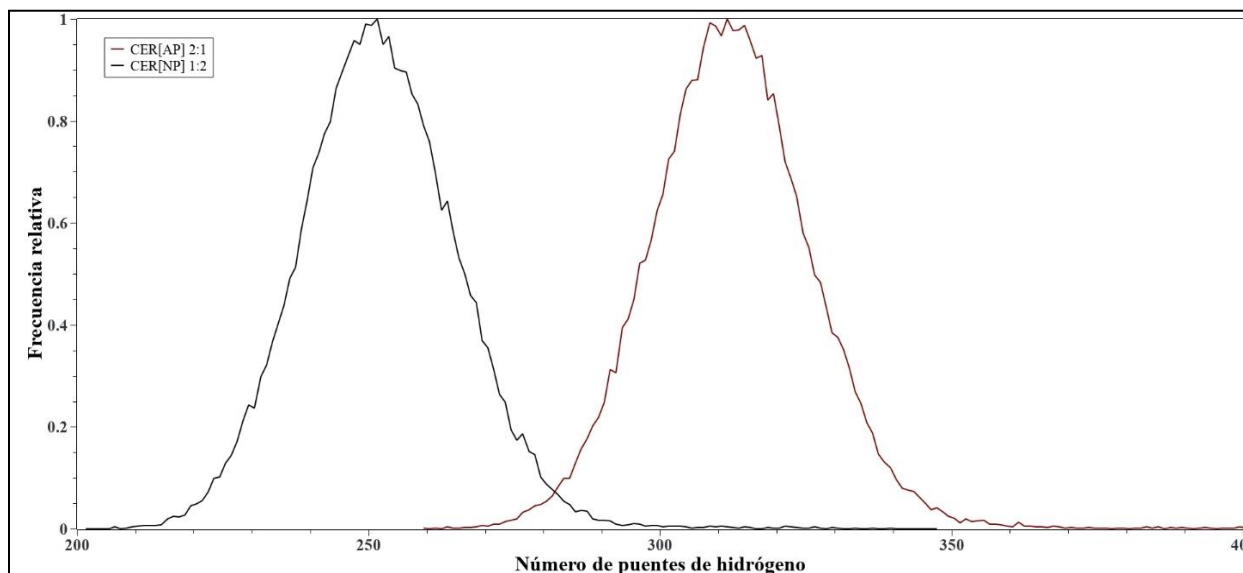


Figura 23. Distribución relativa del número de enlaces de hidrógeno entre las CER y el átomo de oxígeno del agua: I) CER[NP] y CER[AP] en la bicapa donde presentan menor proporción y II) CER[NP] y CER[AP] en la bicapa donde presentan mayor proporción.

En la Figura 24 se muestra la función de distribución radial calculada entre el átomo de oxígeno de las moléculas de agua y el C α de la CER[AP], con el fin de corroborar que el grupo hidroxilo adicional incrementa la solvatación. Cabe destacar que, la RDF es un parámetro utilizado en modelos de bicapa con el objetivo de determinar la densidad de moléculas (o átomos) sobre una región en especial, lo cual está dado por la altura del pico más alto en la curva obtenida (Mason, 1968).

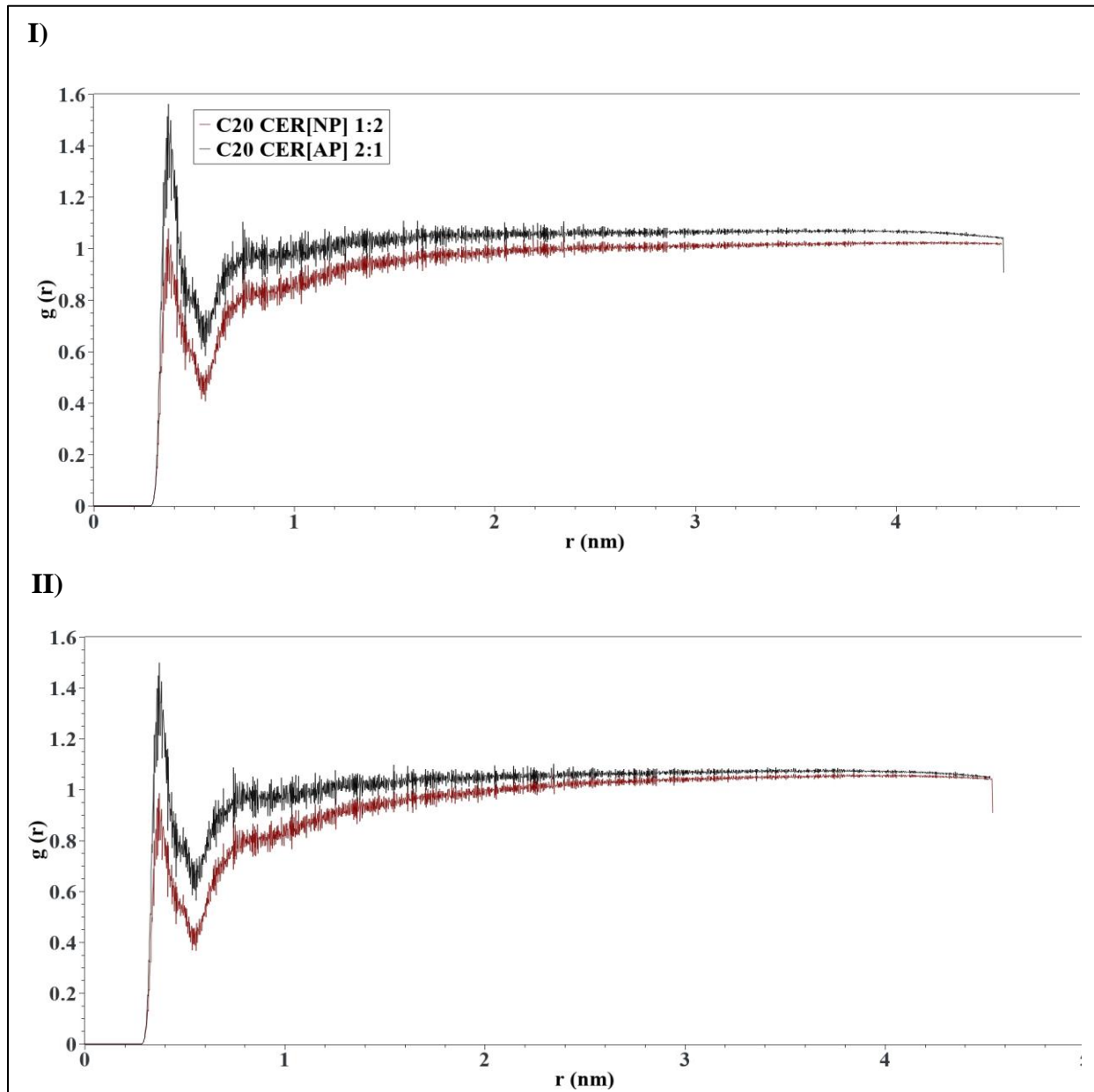


Figura 24. Función de distribución radial $g(r)$ entre el átomo de oxígeno de las moléculas de agua y el Ca de las CER: I) CER[NP] y CER[AP] en menor proporción y II) CER[NP] y CER[AP] en mayor proporción.

En la gráfica I el primer y gran pico aparece en $\approx 0,3$ nm, con $g(r)$ teniendo un valor de $\approx 1,6$ para CER[AP], esto significa que es 1,6 veces más probable que se encuentren los dos átomos en cuestión en esta separación. La función de distribución radial entonces cae y pasa a través de un valor mínimo alrededor de $\approx 0,6$ nm, entonces, la posibilidad de encontrar dos átomos con esta

separación es menor. A grandes distancias, $g(r)$ se acerca a uno lo que indica que no hay posibilidad de encuentro a largo alcance.

Al realizar el mismo análisis sobre las curvas restantes se puede corroborar por medio de la altura del primer pico, que hay una mayor solvatación del agua con el $C\alpha$ de la CER[AP] con respecto a la CER[NP] en ambas proporciones. De esta manera, al calcular el perfil de densidad del $C\alpha$ de cada una de las CER (Figura 25) se puede observar que la CER[AP] presenta un corrimiento hacía la interfase lípido/agua, mientras que la CER[NP] se encuentra ubicada más hacía el centro de la bicapa. Por consiguiente, la ausencia de entrecruzamiento por parte de la CER[AP] es debida al mayor número de interacciones electrostáticas (enlaces de hidrógeno formados con el agua) en relación con la CER[NP], que favorecen su corrimiento hacía la interfase lípido/agua.

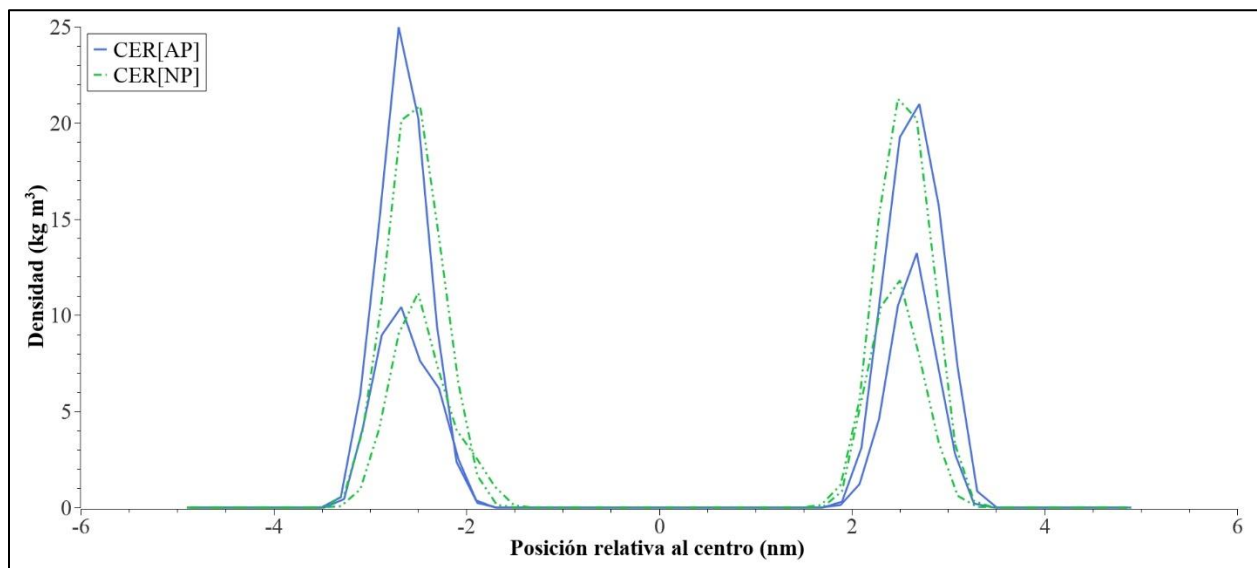


Figura 25. Perfiles de densidad del $C\alpha$ de cada CER a lo largo del eje z.

6. Conclusiones

Se construyeron dos modelos de bicapa lipídica del estrato córneo constituidos por CER[NP], CER[AP], colesterol y ácido lignocérico. Un modelo con una relación CER[NP]/CER[AP] de 1:2, colesterol de 0,7 y ácido lignocérico de 1. Y el otro modelo con una relación CER[NP]/CER[AP] de 2:1, colesterol de 0,7 y ácido lignocérico de 1.

Los resultados obtenidos indican que: (1) el modelo de bicapa con una relación CER[NP]/CER[AP] de 1:2 presenta un espesor de $5,1 \pm 0,62$ nm, y que el modelo de bicapa con una relación CER[NP]/CER[AP] de 2:1 un espesor de $5,0 \pm 0,48$ nm. Estos valores de espesor están en el rango 5,0 – 6,0 nm reportado para la fase de periodicidad corta característica de las bicapas de la matriz lipídica del estrato córneo. (2) Los dos modelos de bicapa lipídica presentan características de una bicapa dada la flexibilidad en la inclinación de las cadenas hidrocarbonadas de CER[NP] y CER[AP] con relación al eje Z de la bicapa. (3) Las cadenas acilo de la CER[NP] y del ácido lignocérico de una monocapa presentan solapamiento con las de la otra monocapa. (4) El número de enlaces de hidrógeno formados por la CER[NP] de tipo lípido-agua es menor con respecto a los formados por la CER[AP].

Referencias bibliográficas

- Abdulnour, Y., Toukmaji, J & Board, J. (1996). Ewald summation techniques in perspective: a survey. *Computer Physics Communications*, 95 (3), 73-92. doi: 10.1016/0010-4655(96)00016-1
- Abraham, M. J. & Gready, J. E. (2011). Optimization of parameters for molecular dynamics simulation using smooth particle-mesh Ewald in GROMACS 4.5. *Journal of Computational Chemistry*, 32(9), 2031–2040. doi:10.1002/jcc.21773
- Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B. & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX*, 1 (2), 19 – 25. doi: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
- Abraham, M.J., van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B. & the GROMACS development team. (2019). *GROMACS User Manual version 2019*, www.gromacs.org.
- Alder, B.J. & Wainwright, T. E. (1957). Phase transition for a hard sphere system. *The Journal of Chemical Physics*, 27, 1208–1209.
- Allen, W. J., Lemkul, J. A., & Bevan, D. R. (2009). GridMAT-MD: A grid-based membrane analysis tool for use with molecular dynamics. *Journal of Computational Chemistry*, 30(12), 1952–1958. doi:10.1002/jcc.21172
- Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., Dinola, A. & Haak, J.R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *Journal of Chemical Physics*, 8, 3684 – 3690.

- Blank, I. (1952). Factors which influence the water content of the stratum corneum. *Journal of Investigative Dermatology*, 18, 433 – 440.
- Boncheva, M. (2012). Molecular Organization of the Lipid Matrix in Stratum Corneum and Its Relevance for the Protective Functions of Human Skin. En M. Lodén & H. I. Maibach (Eds), *Treatment of Dry Skin Syndrome* (pp. 125 - 147). Berlin: Springer.
- Bouwstra, J. A., Dubbelaar, F. E., Gooris, G. S. & Ponec, M. (2000). The lipid organization in the skin barrier. *Acta Dermato – Venereologica. Supplementum*, 208, 23 – 30. doi: 10.1080/000155500750042826
- Bouwstra, J. A., Gooris, G. & Ponec, M. (2002). The lipid organisation of the skin barrier: liquid and crystalline domains coexist in lamellar phases. *Journal of Biological Physics*, 28 (2), 211-223. doi: 10.1023/A:1019983715589
- Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., van der Spek, G. S. & Bras, W. (1991). Structural investigations on human stratum corneum by small angle X-ray scattering. *Journal of Investigative Dermatology*, 97 (6), 1005 – 1012. doi: 10.1111/1523-1747.ep12492217
- Bouwstra, J. A. & Ponec, M. (2006). The Skin Barrier in Healthy and Diseased State. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(12), 2080–2095. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.06.021.
- Brief, E., Kwak, S., Cheng, J. T., Kitson, N., Thewalt, J. & Lafleur, M. (2009). Phase behavior of an equimolar mixture of N -palmitoyl-d-erythrospingosine, cholesterol, and palmitic acid, a mixture with optimized hydrophobic matching. *Langmuir*, 25 (13), 7523–7532. doi: 10.1021/la9003643
- Brody, I. (1966) Intercellular space in normal human stratum corneum. *Nature*, 209 (5022), 472 – 476. doi: 10.1038/209472a0

- Brooks, B., Bruccoleri, R., Olafson, B., States, D., Swaminathan, S. & Karplus, M. (2009). CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *Journal of Computational Chemistry*, 30 (10), 1545 – 1614. doi: 10.1002/jcc.21287
- Coderch, L., Lopez, O., de la Maza, A. & Parra, J. L. (2003). Ceramides and skin function. *American Journal of Clinical Dermatology*, 4 (2), 107–129.
- Damien, F. & Boncheva, M. (2010). The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 130 (2), 611 – 614. doi: 10.1038/jid.2009.272
- Das, C & Olmsted, P.D. (2016). The Physics of Stratum Corneum Lipid Membranes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A. Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374 (2072), 2015 - 2126. doi:10.1098/rsta.2015.0126
- Dawe, G.B., Musgaard, M., Aourousseau, M.R.P., Nayeem, N., Green, T., Biggin, P.C. & Bowie, D. (2016). Distinct structural pathways coordinate the activation of AMPA receptor-auxiliary subunit complexes. *Neuron*, 89 (6), 1264 – 1276. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.038
- Di Nardo, A., Wertz, P., Giannetti, A. & Seidenari, S. (1998). Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Dermato Venereologica*, 78 (1), 27 – 30.
- Eastman, P., Swails, J., Chodera, J., McGibbon, R., Zhao, Y. & Beauchamp, K. (2017). OpenMM: Rapid development of high-performance algorithms for molecular dynamics. *PLOS Computational Biology*, 13 (7). doi:10.1371/journal.pcbi.1005659
- Egberts, E. & Berendsen, H. J. C. (1988). Molecular dynamics simulation of a smectic liquid crystal with atomic detail. *Journal of Chemical Physics*, 89 (6), 3718 - 3732. doi: 10.1063/1.454893

- Elias, P. M. (2012). Structure and function of the stratum corneum extracellular matrix. *Journal of Investigative Dermatology*, 132 (9), 2131 – 2133. doi: 10.1038/jid.2012.246
- (2005). Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *Journal of Investigative Dermatology*, 125 (2), 183–200.
- Ercolessi, F. (1997). *A molecular dynamics primer*. Trieste, Italy: International School for Advanced Studies (SISSA – ISAS).
- Ewald, P. (1921). Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Annalen der physik*, 369 (3), 253-287.
- Falck, E., Patra, M., Karttunen, M., Hyvönen, M. T. & Vattulainen, I. (2004). Lessons of Slicing Membranes: Interplay of Packing, Free Area, and Lateral Diffusion in Phospholipid/Cholesterol Bilayers. *Biophysical Journal*, 87 (2), 1076 – 1091. doi:10.1529/biophysj.104.041368
- Fartasch, M. (1997). Epidermal barrier in disorders of the skin. *Microscopy Research and Technique*, 38 (4), 361 – 372. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19970815)38:4<361::AID-JEMT4>3.0.CO;2-M
- Feingold, K. R. (2007). Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *Journal of Lipid Research*, 48 (12), 2531 – 2546.
- Fischer, I., Mannheimer, A. C., Hinder, A., Ruether, A., Franke, A., Neubert, R. H., Fischer, T. W. & Zillikens, D. (2011). Distinct barrier integrity phenotypes in filaggrinrelated atopic eczema following sequential tape stripping and lipid profiling. *Experimental Dermatology*, 20 (4), 351 – 356. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01259.x

- Forslind, B. (1994). A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Dermato-Venereologica*, 74 (1), 1 – 6. doi: 10.2340/000155557416
- Forslind, B., Engstrom, S., Engblom, J. & Norlén, L. (1997). A novel approach to the understanding of human skin barrier function. *Journal of Dermatological Science*, 14 (2), 115–125.
- Ghadially, R., Williams, M. L., Hou, S. Y. & Elias, P. M. (1992). Membrane structural abnormalities in the stratum corneum of the autosomal recessive ichthyoses. *Journal of Investigative Dermatology*, 99 (6), 755–763. doi: 10.1111/1523-1747.ep12614489
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E. & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4 (1), 17. doi:10.1186/1758-2946-4-17
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. & Fraaije, J. G. E. M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18(12), 1463–1472. doi:10.1002/(sici)1096-987x(199709)18:12<1463::aid-jcc4>3.0.co;2-h
- Hill, J. R. & Wertz, P. W. (2003). Molecular models of the intercellular lamellae from epidermal stratum corneum. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1616 (2), 121 – 126. doi: 10.1016/s0005-2736(03)00238-4
- Hollingsworth, S. A. & Dror, R. O. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 99 (6), 1129 – 1143. doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.011
- Hoover, W.G. (1985). Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions, *Physical Review A*, 31, 1695 – 1697.
- Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14 (1), 33 – 38. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5

- Imokawa, G., Abe, A., Jin, K., Higaki, Y., Kawashima, M. & Hidano, A. (1991). Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *Journal of Investigative Dermatology*, 96 (4), 523 – 526. doi: 10.1111/1523-1747.ep12470233
- Iwai, I., Han, H., den Hollander, L., Svensson, S., Ofverstedt, L.-G., Anwar, J., Brewer, J., Bloksgaard, M., Laloef, A., Nosek, D., Masich, S., Bagatolli, L.A., Skoglund, U. & Norlén, L. (2012). The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. *Journal of Investigative Dermatology*, 132 (9), 2215–2225. doi: 10.1038/jid.2012.43
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G. & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29 (11), 1859–1865. doi: 10.1002/jcc.20945.
- Jorgensen, W., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. J. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics*, 79, 926. doi: 10.1063/1.445869
- Jorgensen, W., Maxwell, D. & Tirado-Rives, J. (1996). Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society* 118 (45), 11225–11236. doi:10.1134.2959. doi:10.1021/ja9621760.
- Karplus, M. & McCammon, J.A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Natural Structural Biology*, 9, 646 – 652.
- Kashibuchi, N., Hirai, Y., O’Goshi, K. & Tagami, H. (2002). Three-dimensional analyses of individual corneocytes with atomic force microscope: morphological changes related to age,

- location and to the pathologic skin conditions. *Skin Research and Technology*, 8 (4), 203 – 211.
- Kim, S., Lee, J., Jo, S., Brooks, C. L., Lee, H. S., & Im, W. (2017). CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules. *Journal of Computational Chemistry*, 38 (21), 1879 – 1886. doi:10.1002/jcc.24829
- Kligman, A. (2011). Corneobiology and corneotherapy – a final chapter. *International Journal of Cosmetic Science*, 33 (3), 197 – 209. doi: 10.1111/j.1468-2494.2011.00644.x
- Kranenburg, M. & Smit, B. (2005). Phase Behavior of Model Lipid Bilayers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109 (14), 6553 – 6563. doi:10.1021/jp0457646
- Lundborg, M., Narangifard, A., Wennberg, C. L., Lindahl, E., Daneholt, B. & Norlén, L. (2018). Human Skin Barrier Structure and Function Analyzed by Cryo-EM and Molecular Dynamics Simulation. *J. Struct. Biol.* 203 (2), 149 – 161. doi: 10.1016/j.jsb.2018.04.005.
- Luzar, A. (2000). Resolving the hydrogen bond dynamics conundrum. *Journal of Chemical Physics*, 113 (23), 10663 – 10675. doi: 10.1063/1.1320826
- Madison, K.C., Swartzendruber, D.C., Wertz, P.W. & Downing, D.T. (1987). Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *Journal of Investigative Dermatology*, 88 (6), 714 – 718, doi: 10.1111/1523-1747.ep12470386
- Martínez, L.; Andrade, R.; Birgin, E. G. & Martínez, J. M. (2009). PACKMOL: A Package for Building Initial Configurations for Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 30 (13), 2157–2164. doi:10.1002/jcc.21224
- Mason, G. (1968). Radial Distribution Functions from Small Packings of Spheres. *Nature*, 217(5130), 733–735. doi:10.1038/217733a0

- Masukawa, Y., Narita, H., Sato, H., Naoe, A., Kondo, N., Sugai, Y., Oba, T., Homma, R., Ishikawa, J., Takagi, Y. & Kitahara, T. (2009). Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. *Journal of Lipid Research*, 50 (8), 1708 –1719. doi: 10.1194/jlr.D800055-JLR200
- Masukawa, Y., Narita, H., Shimizu, E., Kondo, N., Sugai, Y., Oba, T., Homma, R., Ishikawa, J., Takagi, Y., Kitahara, T., Takema, Y. & Kita, K. (2008). Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *Journal of Lipid Research*, 49 (7), 1466 – 1476.
- McCammon, J.A., Gelin, B.R. & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature* 267, 585–590.
- McGrath, J.A., Eady, R. A.J. & Pope, F. M. (2004) Anatomy and organization of human skin. En A. Rook & T. Burns (Eds), *Rook's textbook of dermatology*. Wiley Blackwell.
- McIntosh, T. J. (2003). Organization of skin stratum corneum extracellular lipid lamellae: diffraction evidence for asymmetric distribution of cholesterol. *Biophysical Journal*, 85 (3), 1675 – 1681. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74597-4
- Mendelsohn, R., Rerek, M. E. & Moore, D. J. (2000). Infrared spectroscopy and microscopic imaging of stratum corneum models and skin. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2 (20), 4651–4657. doi: 10.1039/b003861j
- Monteiro, N. A. & Larese, F. (2017). Skin. En B. Fadeel, A. Pietroiusti & A. Shvedova, *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials: Exposure, Toxicology and Impact on Human Health* (357 – 381). Londres: Academic Press.
- Moore, T. C., Hartkamp, R., Iacovella, C. R., Bunge, A. L. & McCabe, C. (2018). Effect of Ceramide Tail Length on the Structure of Model Stratum Corneum Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, 114 (1), 113 – 125. doi: 10.1016/j.bpj.2017.10.031

- Moore, T. C., Iacovella, C. R., Leonhard, A. C., Bunge, A. L. & McCabe, C. (2018). Molecular Dynamics Simulations of Stratum Corneum Lipid Mixtures: A Multiscale Perspective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 498 (2), 313 – 318. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.040
- Moradi, S., Nowroozi, A. & Shahlaei, M. (2019). Shedding light on the structural properties of lipid bilayers using molecular dynamics simulation: a review study. *RSC Advances*, 9 (8), 4644 – 4658. doi:10.1039/c8ra08441f
- Morales, H. A. (2013). *Estudio computacional de la interacción del péptido catiónico bacterenecina con una membrana lipídica* (tesis de maestría). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S. & Ghidoni, R. (1993). Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1182 (2), 147–151.
- Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Mellesi, L., Ghidoni, R. & Caputo, R. (1994). Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions. *Archives of Dermatology*, 130 (4), 452 – 456.
- Mukherjee, S. & Maxfield, F. R. (2000). Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking. *Traffic*, 1 (3), 203 – 211.
- Nosé, S. (1984). A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular Physics*, 52, 255–268
- Norlén, L. (2001). Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *Journal of Investigative Dermatology*, 117 (4), 830 – 836. doi: 10.1038/jid.2001.1
- Paige, D. G., Morse-Fisher, N. & Harper, J. I. (1994). Quantification of stratum-corneumceramides and lipid envelope ceramides in the hereditary ichthyoses. *British Journal of Dermatology*, 131 (1), 23 - 27. doi: 10.1111/j.1365-2133.1994.tb08452.x

- Pascher, I. (1976). Molecular arrangements in sphingolipids: conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 455 (2), 433 – 451.
- Parrinello, M & Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method, *Journal of Applied Physics*, 52, 7182–7190.
- Phillips, J., Braun, R., Wang, W., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R., Kalé, L & Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1781 – 802. doi: 10.1002/jcc.20289
- Pilgram, G. S., Vissers, D.C., van der Meulen, H., Pavel, S., Lavrijsen, S. P., Bouwstra, J. A. & Koerten, H. K. (2001). Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 117 (3), 710 – 717. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01455.x
- Regno, A. D. & Notman, R. (2018). Permeation Pathways through Lateral Domains in Model Membranes of Skin Lipids. *Phys. Chem. Chem. Phys*, 20 (4), 2162 – 2174. doi:10.1039/C7CP03258G.
- Rerek, M. E. & Moore, D. J. (2007). Skin lipid structure: Insight into hydrophobic and hydrophilic driving forces for self-assembly using IR spectroscopy. En L. D. Rhein, M. Schlossman, A. O’Lenick & P. Somasundran (Eds.), *Surfactants in personal care products and decorative cosmetics* (pp. 189 – 209). USA: CRC Press.
- Schmitt, T., Gupta, R., Lange, S., Sonnenberger, S., Dobner, B., Hauß, T., Rai, B. & Neubert, R. H. H. (2018). Impact of the Ceramide Subspecies on the Nanostructure of Stratum Corneum Lipids Using Neutron Scattering and Molecular Dynamics Simulations. Part I: Impact of CER[NS]. *Chem. Phys. Lipids*, 214, 58 – 68. doi:10.1016/j.chemphyslip.2018.05.006.

- Schmitt, T & Neubert, R. H. H. (2018). State of the Art in Stratum Corneum Research: The Biophysical Properties of Ceramides. *Chemistry and Physics of Lipids*, 216, 91–103. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2018.09.017
- Schmitt, T.; Lange, S.; Dobner, B.; Sonnenberger, S.; Hauß, T.; Neubert, R. H. H. (2018). Investigation of a CER[NP]- and [AP]-Based Stratum Corneum Modeling Membrane System: Using Specifically Deuterated CER Together with a Neutron Diffraction Approach. *Langmuir*, 34 (4), 1742–1749. doi:10.1021/acs.langmuir.7b01848
- Seelig, J. (1977). Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 10 (3), 353 – 418. doi: 10.1017/S0033583500002948
- Spahn, V., del Vecchio, G., Labuz, D., Rodriguez-Gaztelumendi, A., Massaly, N., Temp, J., Durmaz, V., Sabri, P., Reidelbach, M., Machelska, H., Weber, M. & Stein, C. (2017). A nontoxic pain killer designed by modeling of pathological receptor conformations. *Science*, 355 (6328), 966 – 969. doi: 10.1126/science. aai8636
- Swartzendruber, D. C., Wertz, P. W., Kitko, D. J., Madison, K. C. & Downing, D. T. (1989). Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *Journal of Investigative Dermatology*, 92 (2), 251–257. doi: 10.1111/1523-1747.ep12276794
- t'Kindt, R., Jorge, L., Dumont, E., Couturon, P., David, F., Sandra, P. & Sandra, K. (2012). Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 84 (1), 403 – 411. doi: 10.1021/ac202646v
- van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E. & Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26 (16), 1701 – 1718. doi:10.1002/jcc.20291

- van der Spoel, D., van Maaren, P. J., Larsson, P. & Timneanu, N. (2006). Thermodynamics of Hydrogen Bonding in Hydrophilic and Hydrophobic Media. *Journal of Physical Chemistry B*, 110 (9), 4393 – 4398. doi: 10.1021/jp0572535
- van Gunsteren, W., Billeter, S. R., Eising, A. A., Hünenberger, P. H., Krüger, P., Mark, A. E., Scott, W. R. P. & Tironi, I. G. (1996). Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide. Zürich, Switzerland: Vdf Hochschulverlag AG an der ETH.
- van Smeden, J., Janssens, M., Gooris, G. S. & Bouwstra, J. A. (2014). The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841 (3), 295 – 313. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.11.00
- van Smeden, J., Hoppel, L., van der Heijden. R., Hankemeier, T., Vreeken, R. J. & Bouwstra, J. A. (2011). LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *Journal of Lipid Research*, 52 (6), 1211 – 1221.
- Werner, Y. & Lindberg, M. (1985). Transepidermal water loss in dry and clinically normal skin in patients with atopic dermatitis, *Acta Dermato Venereologica*, 65 (2), 102 – 105.
- Wertz, P. W. & Downing, D. T. (1991). Epidermal lipids. En L. A. Goldsmith (Ed.), *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin* (pp. 205 – 236). Oxford: Oxford University Press.
- (1983). *Ceramides of pig epidermis: structure determination*. *Journal of Lipid Research*, 24 (6), 759–765.
- Williams, A. C. (2003). *Transdermal and topical drug delivery from theory to clinical practice*. London: Pharmaceutical Press.

Williams, H. & Flohr, C. (2006). How epidemiology has challenged 3 prevailing concepts about atopic dermatitis. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 118 (1), 209 – 213. doi: 10.1016/j.jaci.2006.04.043

Winsor, T & Burch, G. (1944). Differential roles of layers in human epigastric skin on diffusion rate of water. *Archives of Internal Medicine*, 74, 428 – 435.

Wooi, K. & Man, W. (2015). Skin deep: The basics of human skin structure and drug penetration. En N. Dragicevic & H. I. Maibach (Eds.), *Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement* (pp. 3 – 11). Berlin: Springer.

Apéndices

Apéndice A. Topología CER[NP]

GROMACS topology file for CNP

```

;;
[ moleculetype ]
; name nrexcl
CNP      3
[ atoms ]
; nr      type      resnr  residu  atom    cgnr    charge  mass
  1      OG311      1      CNP     O1      1      -0.648  15.9994 ; qtot -0.648
  2      HGP1       1      CNP     H1      2       0.420   1.0080 ; qtot -0.228
  3      CG321      1      CNP     C1      3       0.045  12.0110 ; qtot -0.183
  4      HGA2       1      CNP     H2      4       0.090   1.0080 ; qtot -0.093
  5      HGA2       1      CNP     H3      5       0.090   1.0080 ; qtot -0.003
  6      NG2S1      1      CNP     N       6      -0.403  14.0070 ; qtot -0.406
  7      HGP1       1      CNP     H4      7       0.298   1.0080 ; qtot -0.108
  8      CG311      1      CNP     C2      8       0.019  12.0110 ; qtot -0.089
  9      HGA1       1      CNP     H5      9       0.090   1.0080 ; qtot  0.001
 10     CG311      1      CNP     C3     10      0.141  12.0110 ; qtot  0.142
 11     HGA1       1      CNP     H6     11      0.090   1.0080 ; qtot  0.232
 12     OG311      1      CNP     O2     12     -0.658  15.9994 ; qtot -0.426
 13     HGP1       1      CNP     H7     13      0.419   1.0080 ; qtot -0.007
 14     CG311      1      CNP     C4     14      0.150  12.0110 ; qtot  0.143
 15     CG321      1      CNP     C5     15     -0.175  12.0110 ; qtot -0.032
 16     CG321      1      CNP     C6     16     -0.199  12.0110 ; qtot -0.231
 17     HGA2       1      CNP     H8     17      0.090   1.0080 ; qtot -0.141
 18     HGA2       1      CNP     H9     18      0.090   1.0080 ; qtot -0.051
 19     CG321      1      CNP     C7     19     -0.162  12.0110 ; qtot -0.213
 20     HGA2       1      CNP     H10    20      0.090   1.0080 ; qtot -0.123
 21     HGA2       1      CNP     H11    21      0.090   1.0080 ; qtot -0.033
 22     CG321      1      CNP     C8     22     -0.180  12.0110 ; qtot -0.213
 23     HGA2       1      CNP     H12    23      0.090   1.0080 ; qtot -0.123
 24     HGA2       1      CNP     H13    24      0.090   1.0080 ; qtot -0.033
 25     CG321      1      CNP     C9     25     -0.180  12.0110 ; qtot -0.213
 26     HGA2       1      CNP     H14    26      0.090   1.0080 ; qtot -0.123
 27     HGA2       1      CNP     H15    27      0.090   1.0080 ; qtot -0.033
 28     CG321      1      CNP     C10    28     -0.180  12.0110 ; qtot -0.213
 29     HGA2       1      CNP     H16    29      0.090   1.0080 ; qtot -0.123
 30     HGA2       1      CNP     H17    30      0.090   1.0080 ; qtot -0.033
 31     CG321      1      CNP     C11    31     -0.180  12.0110 ; qtot -0.213
 32     HGA2       1      CNP     H18    32      0.090   1.0080 ; qtot -0.123
 33     HGA2       1      CNP     H19    33      0.090   1.0080 ; qtot -0.033
 34     CG321      1      CNP     C12    34     -0.180  12.0110 ; qtot -0.213
 35     HGA2       1      CNP     H20    35      0.090   1.0080 ; qtot -0.123
 36     HGA2       1      CNP     H21    36      0.090   1.0080 ; qtot -0.033
 37     CG321      1      CNP     C13    37     -0.180  12.0110 ; qtot -0.213
 38     HGA2       1      CNP     H22    38      0.090   1.0080 ; qtot -0.123
 39     HGA2       1      CNP     H23    39      0.090   1.0080 ; qtot -0.033
 40     CG321      1      CNP     C14    40     -0.180  12.0110 ; qtot -0.213
 41     HGA2       1      CNP     H24    41      0.090   1.0080 ; qtot -0.123
 42     HGA2       1      CNP     H25    42      0.090   1.0080 ; qtot -0.033
 43     CG321      1      CNP     C15    43     -0.180  12.0110 ; qtot -0.213
 44     HGA2       1      CNP     H26    44      0.090   1.0080 ; qtot -0.123
 45     HGA2       1      CNP     H27    45      0.090   1.0080 ; qtot -0.033
 46     CG321      1      CNP     C16    46     -0.180  12.0110 ; qtot -0.213
 47     HGA2       1      CNP     H28    47      0.090   1.0080 ; qtot -0.123
 48     HGA2       1      CNP     H29    48      0.090   1.0080 ; qtot -0.033
 49     CG321      1      CNP     C17    49     -0.180  12.0110 ; qtot -0.213
 50     HGA2       1      CNP     H30    50      0.090   1.0080 ; qtot -0.123
 51     HGA2       1      CNP     H31    51      0.090   1.0080 ; qtot -0.033
 52     CG331      1      CNP     C18    52     -0.270  12.0110 ; qtot -0.303
 53     HGA3       1      CNP     H32    53      0.090   1.0080 ; qtot -0.213
 54     HGA3       1      CNP     H33    54      0.090   1.0080 ; qtot -0.123
    
```

55	HGA3	1	CNP	H34	55	0.090	1.0080	; qtot -0.033
56	CG201	1	CNP	C19	56	0.534	12.0110	; qtot 0.501
57	OG2D1	1	CNP	O3	57	-0.511	15.9994	; qtot -0.010
58	CG321	1	CNP	C20	58	-0.211	12.0110	; qtot -0.221
59	HGA2	1	CNP	H35	59	0.090	1.0080	; qtot -0.131
60	HGA2	1	CNP	H36	60	0.090	1.0080	; qtot -0.041
61	CG321	1	CNP	C21	61	-0.166	12.0110	; qtot -0.207
62	HGA2	1	CNP	H37	62	0.090	1.0080	; qtot -0.117
63	HGA2	1	CNP	H38	63	0.090	1.0080	; qtot -0.027
64	CG321	1	CNP	C22	64	-0.183	12.0110	; qtot -0.210
65	HGA2	1	CNP	H39	65	0.090	1.0080	; qtot -0.120
66	HGA2	1	CNP	H40	66	0.090	1.0080	; qtot -0.030
67	CG321	1	CNP	C23	67	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
68	HGA2	1	CNP	H41	68	0.090	1.0080	; qtot -0.120
69	HGA2	1	CNP	H42	69	0.090	1.0080	; qtot -0.030
70	CG321	1	CNP	C24	70	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
71	HGA2	1	CNP	H43	71	0.090	1.0080	; qtot -0.120
72	HGA2	1	CNP	H44	72	0.090	1.0080	; qtot -0.030
73	CG321	1	CNP	C25	73	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
74	HGA2	1	CNP	H45	74	0.090	1.0080	; qtot -0.120
75	HGA2	1	CNP	H46	75	0.090	1.0080	; qtot -0.030
76	CG321	1	CNP	C26	76	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
77	HGA2	1	CNP	H47	77	0.090	1.0080	; qtot -0.120
78	HGA2	1	CNP	H48	78	0.090	1.0080	; qtot -0.030
79	CG321	1	CNP	C27	79	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
80	HGA2	1	CNP	H49	80	0.090	1.0080	; qtot -0.120
81	HGA2	1	CNP	H50	81	0.090	1.0080	; qtot -0.030
82	CG321	1	CNP	C28	82	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
83	HGA2	1	CNP	H51	83	0.090	1.0080	; qtot -0.120
84	HGA2	1	CNP	H52	84	0.090	1.0080	; qtot -0.030
85	CG321	1	CNP	C29	85	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
86	HGA2	1	CNP	H53	86	0.090	1.0080	; qtot -0.120
87	HGA2	1	CNP	H54	87	0.090	1.0080	; qtot -0.030
88	CG321	1	CNP	C30	88	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
89	HGA2	1	CNP	H55	89	0.090	1.0080	; qtot -0.120
90	HGA2	1	CNP	H56	90	0.090	1.0080	; qtot -0.030
91	CG321	1	CNP	C31	91	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
92	HGA2	1	CNP	H57	92	0.090	1.0080	; qtot -0.120
93	HGA2	1	CNP	H58	93	0.090	1.0080	; qtot -0.030
94	CG321	1	CNP	C32	94	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
95	HGA2	1	CNP	H59	95	0.090	1.0080	; qtot -0.120
96	HGA2	1	CNP	H60	96	0.090	1.0080	; qtot -0.030
97	CG321	1	CNP	C33	97	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
98	HGA2	1	CNP	H61	98	0.090	1.0080	; qtot -0.120
99	HGA2	1	CNP	H62	99	0.090	1.0080	; qtot -0.030
100	CG321	1	CNP	C34	100	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
101	HGA2	1	CNP	H63	101	0.090	1.0080	; qtot -0.120
102	HGA2	1	CNP	H64	102	0.090	1.0080	; qtot -0.030
103	CG321	1	CNP	C35	103	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
104	HGA2	1	CNP	H65	104	0.090	1.0080	; qtot -0.120
105	HGA2	1	CNP	H66	105	0.090	1.0080	; qtot -0.030
106	CG321	1	CNP	C36	106	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
107	HGA2	1	CNP	H67	107	0.090	1.0080	; qtot -0.120
108	HGA2	1	CNP	H68	108	0.090	1.0080	; qtot -0.030
109	CG321	1	CNP	C37	109	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
110	HGA2	1	CNP	H69	110	0.090	1.0080	; qtot -0.120
111	HGA2	1	CNP	H70	111	0.090	1.0080	; qtot -0.030
112	CG321	1	CNP	C38	112	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
113	HGA2	1	CNP	H71	113	0.090	1.0080	; qtot -0.120
114	HGA2	1	CNP	H72	114	0.090	1.0080	; qtot -0.030
115	CG321	1	CNP	C39	115	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
116	HGA2	1	CNP	H73	116	0.090	1.0080	; qtot -0.120
117	HGA2	1	CNP	H74	117	0.090	1.0080	; qtot -0.030
118	CG321	1	CNP	C40	118	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
119	HGA2	1	CNP	H75	119	0.090	1.0080	; qtot -0.120
120	HGA2	1	CNP	H76	120	0.090	1.0080	; qtot -0.030
121	CG321	1	CNP	C41	121	-0.180	12.0110	; qtot -0.210
122	HGA2	1	CNP	H77	122	0.090	1.0080	; qtot -0.120
123	HGA2	1	CNP	H78	123	0.090	1.0080	; qtot -0.030

124	CG331	1	CNP	C42	124	-0.270	12.0110	; qtot -0.300
125	HGA3	1	CNP	H79	125	0.090	1.0080	; qtot -0.210
126	HGA3	1	CNP	H80	126	0.090	1.0080	; qtot -0.120
127	HGA3	1	CNP	H81	127	0.090	1.0080	; qtot -0.030
128	HGA2	1	CNP	H82	128	0.090	1.0080	; qtot 0.060
129	HGA2	1	CNP	H83	129	0.090	1.0080	; qtot 0.150
130	HGA1	1	CNP	H84	130	0.090	1.0080	; qtot 0.240
131	OG311	1	CNP	O4	131	-0.659	15.9994	; qtot -0.419
132	HGP1	1	CNP	H85	132	0.419	1.0080	; qtot -0.000
[bonds]								
; ai	aj	funct	b0	Kb				
1	2	1						
1	3	1						
3	4	1						
3	5	1						
3	8	1						
6	7	1						
6	8	1						
6	56	1						
8	9	1						
8	10	1						
10	11	1						
10	12	1						
10	14	1						
12	13	1						
14	15	1						
14	130	1						
14	131	1						
15	16	1						
15	128	1						
15	129	1						
16	17	1						
16	18	1						
16	19	1						
19	20	1						
19	21	1						
19	22	1						
22	23	1						
22	24	1						
22	25	1						
25	26	1						
25	27	1						
25	28	1						
28	29	1						
28	30	1						
28	31	1						
31	32	1						
31	33	1						
31	34	1						
34	35	1						
34	36	1						
34	37	1						
37	38	1						
37	39	1						
37	40	1						
40	41	1						
40	42	1						
40	43	1						
43	44	1						
43	45	1						
43	46	1						
46	47	1						
46	48	1						
46	49	1						
49	50	1						
49	51	1						
49	52	1						
52	53	1						
52	54	1						

52	55	1
56	57	1
56	58	1
58	59	1
58	60	1
58	61	1
61	62	1
61	63	1
61	64	1
64	65	1
64	66	1
64	67	1
67	68	1
67	69	1
67	70	1
70	71	1
70	72	1
70	73	1
73	74	1
73	75	1
73	76	1
76	77	1
76	78	1
76	79	1
79	80	1
79	81	1
79	82	1
82	83	1
82	84	1
82	85	1
85	86	1
85	87	1
85	88	1
88	89	1
88	90	1
88	91	1
91	92	1
91	93	1
91	94	1
94	95	1
94	96	1
94	97	1
97	98	1
97	99	1
97	100	1
100	101	1
100	102	1
100	103	1
103	104	1
103	105	1
103	106	1
106	107	1
106	108	1
106	109	1
109	110	1
109	111	1
109	112	1
112	113	1
112	114	1
112	115	1
115	116	1
115	117	1
115	118	1
118	119	1
118	120	1
118	121	1
121	122	1
121	123	1
121	124	1

124	125	1		
124	126	1		
124	127	1		
131	132	1		
[pairs]				
; ai	aj	funct	c6	c12
1	6	1		
1	9	1		
1	10	1		
2	4	1		
2	5	1		
2	8	1		
3	7	1		
3	11	1		
3	12	1		
3	14	1		
3	56	1		
4	6	1		
4	9	1		
4	10	1		
5	6	1		
5	9	1		
5	10	1		
6	11	1		
6	12	1		
6	14	1		
6	59	1		
6	60	1		
6	61	1		
7	9	1		
7	10	1		
7	57	1		
7	58	1		
8	13	1		
8	15	1		
8	57	1		
8	58	1		
8	130	1		
8	131	1		
9	11	1		
9	12	1		
9	14	1		
9	56	1		
10	16	1		
10	56	1		
10	128	1		
10	129	1		
10	132	1		
11	13	1		
11	15	1		
11	130	1		
11	131	1		
12	15	1		
12	130	1		
12	131	1		
13	14	1		
14	17	1		
14	18	1		
14	19	1		
15	20	1		
15	21	1		
15	22	1		
15	132	1		
16	23	1		
16	24	1		
16	25	1		
16	130	1		
16	131	1		
17	20	1		

17	21	1
17	22	1
17	128	1
17	129	1
18	20	1
18	21	1
18	22	1
18	128	1
18	129	1
19	26	1
19	27	1
19	28	1
19	128	1
19	129	1
20	23	1
20	24	1
20	25	1
21	23	1
21	24	1
21	25	1
22	29	1
22	30	1
22	31	1
23	26	1
23	27	1
23	28	1
24	26	1
24	27	1
24	28	1
25	32	1
25	33	1
25	34	1
26	29	1
26	30	1
26	31	1
27	29	1
27	30	1
27	31	1
28	35	1
28	36	1
28	37	1
29	32	1
29	33	1
29	34	1
30	32	1
30	33	1
30	34	1
31	38	1
31	39	1
31	40	1
32	35	1
32	36	1
32	37	1
33	35	1
33	36	1
33	37	1
34	41	1
34	42	1
34	43	1
35	38	1
35	39	1
35	40	1
36	38	1
36	39	1
36	40	1
37	44	1
37	45	1
37	46	1
38	41	1

38	42	1
38	43	1
39	41	1
39	42	1
39	43	1
40	47	1
40	48	1
40	49	1
41	44	1
41	45	1
41	46	1
42	44	1
42	45	1
42	46	1
43	50	1
43	51	1
43	52	1
44	47	1
44	48	1
44	49	1
45	47	1
45	48	1
45	49	1
46	53	1
46	54	1
46	55	1
47	50	1
47	51	1
47	52	1
48	50	1
48	51	1
48	52	1
50	53	1
50	54	1
50	55	1
51	53	1
51	54	1
51	55	1
56	62	1
56	63	1
56	64	1
57	59	1
57	60	1
57	61	1
58	65	1
58	66	1
58	67	1
59	62	1
59	63	1
59	64	1
60	62	1
60	63	1
60	64	1
61	68	1
61	69	1
61	70	1
62	65	1
62	66	1
62	67	1
63	65	1
63	66	1
63	67	1
64	71	1
64	72	1
64	73	1
65	68	1
65	69	1
65	70	1
66	68	1

66	69	1
66	70	1
67	74	1
67	75	1
67	76	1
68	71	1
68	72	1
68	73	1
69	71	1
69	72	1
69	73	1
70	77	1
70	78	1
70	79	1
71	74	1
71	75	1
71	76	1
72	74	1
72	75	1
72	76	1
73	80	1
73	81	1
73	82	1
74	77	1
74	78	1
74	79	1
75	77	1
75	78	1
75	79	1
76	83	1
76	84	1
76	85	1
77	80	1
77	81	1
77	82	1
78	80	1
78	81	1
78	82	1
79	86	1
79	87	1
79	88	1
80	83	1
80	84	1
80	85	1
81	83	1
81	84	1
81	85	1
82	89	1
82	90	1
82	91	1
83	86	1
83	87	1
83	88	1
84	86	1
84	87	1
84	88	1
85	92	1
85	93	1
85	94	1
86	89	1
86	90	1
86	91	1
87	89	1
87	90	1
87	91	1
88	95	1
88	96	1
88	97	1
89	92	1

89	93	1
89	94	1
90	92	1
90	93	1
90	94	1
91	98	1
91	99	1
91	100	1
92	95	1
92	96	1
92	97	1
93	95	1
93	96	1
93	97	1
94	101	1
94	102	1
94	103	1
95	98	1
95	99	1
95	100	1
96	98	1
96	99	1
96	100	1
97	104	1
97	105	1
97	106	1
98	101	1
98	102	1
98	103	1
99	101	1
99	102	1
99	103	1
100	107	1
100	108	1
100	109	1
101	104	1
101	105	1
101	106	1
102	104	1
102	105	1
102	106	1
103	110	1
103	111	1
103	112	1
104	107	1
104	108	1
104	109	1
105	107	1
105	108	1
105	109	1
106	113	1
106	114	1
106	115	1
107	110	1
107	111	1
107	112	1
108	110	1
108	111	1
108	112	1
109	116	1
109	117	1
109	118	1
110	113	1
110	114	1
110	115	1
111	113	1
111	114	1
111	115	1
112	119	1

112	120	1					
112	121	1					
113	116	1					
113	117	1					
113	118	1					
114	116	1					
114	117	1					
114	118	1					
115	122	1					
115	123	1					
115	124	1					
116	119	1					
116	120	1					
116	121	1					
117	119	1					
117	120	1					
117	121	1					
118	125	1					
118	126	1					
118	127	1					
119	122	1					
119	123	1					
119	124	1					
120	122	1					
120	123	1					
120	124	1					
122	125	1					
122	126	1					
122	127	1					
123	125	1					
123	126	1					
123	127	1					
128	130	1					
128	131	1					
129	130	1					
129	131	1					
130	132	1					
[angles]							
; ai	aj	ak	funct	th0	cth	S0	Kub
2	1	3	5				
1	3	4	5				
1	3	5	5				
1	3	8	5				
4	3	5	5				
4	3	8	5				
5	3	8	5				
7	6	8	5				
7	6	56	5				
8	6	56	5				
3	8	6	5				
3	8	9	5				
3	8	10	5				
6	8	9	5				
6	8	10	5				
9	8	10	5				
8	10	11	5				
8	10	12	5				
8	10	14	5				
11	10	12	5				
11	10	14	5				
12	10	14	5				
10	12	13	5				
10	14	15	5				
10	14	130	5				
10	14	131	5				
15	14	130	5				
15	14	131	5				
130	14	131	5				
14	15	16	5				

14	15	128	5
14	15	129	5
16	15	128	5
16	15	129	5
128	15	129	5
15	16	17	5
15	16	18	5
15	16	19	5
17	16	18	5
17	16	19	5
18	16	19	5
16	19	20	5
16	19	21	5
16	19	22	5
20	19	21	5
20	19	22	5
21	19	22	5
19	22	23	5
19	22	24	5
19	22	25	5
23	22	24	5
23	22	25	5
24	22	25	5
22	25	26	5
22	25	27	5
22	25	28	5
26	25	27	5
26	25	28	5
27	25	28	5
25	28	29	5
25	28	30	5
25	28	31	5
29	28	30	5
29	28	31	5
30	28	31	5
28	31	32	5
28	31	33	5
28	31	34	5
32	31	33	5
32	31	34	5
33	31	34	5
31	34	35	5
31	34	36	5
31	34	37	5
35	34	36	5
35	34	37	5
36	34	37	5
34	37	38	5
34	37	39	5
34	37	40	5
38	37	39	5
38	37	40	5
39	37	40	5
37	40	41	5
37	40	42	5
37	40	43	5
41	40	42	5
41	40	43	5
42	40	43	5
40	43	44	5
40	43	45	5
40	43	46	5
44	43	45	5
44	43	46	5
45	43	46	5
43	46	47	5
43	46	48	5
43	46	49	5
47	46	48	5

47	46	49	5
48	46	49	5
46	49	50	5
46	49	51	5
46	49	52	5
50	49	51	5
50	49	52	5
51	49	52	5
49	52	53	5
49	52	54	5
49	52	55	5
53	52	54	5
53	52	55	5
54	52	55	5
6	56	57	5
6	56	58	5
57	56	58	5
56	58	59	5
56	58	60	5
56	58	61	5
59	58	60	5
59	58	61	5
60	58	61	5
58	61	62	5
58	61	63	5
58	61	64	5
62	61	63	5
62	61	64	5
63	61	64	5
61	64	65	5
61	64	66	5
61	64	67	5
65	64	66	5
65	64	67	5
66	64	67	5
64	67	68	5
64	67	69	5
64	67	70	5
68	67	69	5
68	67	70	5
69	67	70	5
67	70	71	5
67	70	72	5
67	70	73	5
71	70	72	5
71	70	73	5
72	70	73	5
70	73	74	5
70	73	75	5
70	73	76	5
74	73	75	5
74	73	76	5
75	73	76	5
73	76	77	5
73	76	78	5
73	76	79	5
77	76	78	5
77	76	79	5
78	76	79	5
76	79	80	5
76	79	81	5
76	79	82	5
80	79	81	5
80	79	82	5
81	79	82	5
79	82	83	5
79	82	84	5
79	82	85	5
83	82	84	5

83	82	85	5
84	82	85	5
82	85	86	5
82	85	87	5
82	85	88	5
86	85	87	5
86	85	88	5
87	85	88	5
85	88	89	5
85	88	90	5
85	88	91	5
89	88	90	5
89	88	91	5
90	88	91	5
88	91	92	5
88	91	93	5
88	91	94	5
92	91	93	5
92	91	94	5
93	91	94	5
91	94	95	5
91	94	96	5
91	94	97	5
95	94	96	5
95	94	97	5
96	94	97	5
94	97	98	5
94	97	99	5
94	97	100	5
98	97	99	5
98	97	100	5
99	97	100	5
97	100	101	5
97	100	102	5
97	100	103	5
101	100	102	5
101	100	103	5
102	100	103	5
100	103	104	5
100	103	105	5
100	103	106	5
104	103	105	5
104	103	106	5
105	103	106	5
103	106	107	5
103	106	108	5
103	106	109	5
107	106	108	5
107	106	109	5
108	106	109	5
106	109	110	5
106	109	111	5
106	109	112	5
110	109	111	5
110	109	112	5
111	109	112	5
109	112	113	5
109	112	114	5
109	112	115	5
113	112	114	5
113	112	115	5
114	112	115	5
112	115	116	5
112	115	117	5
112	115	118	5
116	115	117	5
116	115	118	5
117	115	118	5
115	118	119	5

115	118	120	5				
115	118	121	5				
119	118	120	5				
119	118	121	5				
120	118	121	5				
118	121	122	5				
118	121	123	5				
118	121	124	5				
122	121	123	5				
122	121	124	5				
123	121	124	5				
121	124	125	5				
121	124	126	5				
121	124	127	5				
125	124	126	5				
125	124	127	5				
126	124	127	5				
14	131	132	5				
[dihedrals]							
; ai	aj	ak	al	funct	phi0	cp	mult
2	1	3	4	9			
2	1	3	5	9			
2	1	3	8	9			
1	3	8	6	9			
1	3	8	9	9			
1	3	8	10	9			
4	3	8	6	9			
4	3	8	9	9			
4	3	8	10	9			
5	3	8	6	9			
5	3	8	9	9			
5	3	8	10	9			
7	6	8	9	9			
7	6	8	10	9			
7	6	56	57	9			
7	6	56	58	9			
8	6	56	57	9			
8	6	56	58	9			
3	8	6	7	9			
3	8	6	56	9			
9	8	6	56	9			
10	8	6	56	9			
3	8	10	11	9			
3	8	10	12	9			
3	8	10	14	9			
6	8	10	11	9			
6	8	10	12	9			
6	8	10	14	9			
9	8	10	11	9			
9	8	10	12	9			
9	8	10	14	9			
8	10	12	13	9			
11	10	12	13	9			
8	10	14	15	9			
8	10	14	130	9			
8	10	14	131	9			
11	10	14	15	9			
11	10	14	130	9			
11	10	14	131	9			
12	10	14	15	9			
12	10	14	130	9			
12	10	14	131	9			
13	12	10	14	9			
10	14	15	16	9			
10	14	15	128	9			
10	14	15	129	9			
10	14	131	132	9			
15	14	131	132	9			
130	14	131	132	9			

16	15	14	130	9
16	15	14	131	9
128	15	14	130	9
128	15	14	131	9
129	15	14	130	9
129	15	14	131	9
14	15	16	17	9
14	15	16	18	9
14	15	16	19	9
17	16	15	128	9
17	16	15	129	9
18	16	15	128	9
18	16	15	129	9
19	16	15	128	9
19	16	15	129	9
15	16	19	20	9
15	16	19	21	9
15	16	19	22	9
17	16	19	20	9
17	16	19	21	9
17	16	19	22	9
18	16	19	20	9
18	16	19	21	9
18	16	19	22	9
16	19	22	23	9
16	19	22	24	9
16	19	22	25	9
20	19	22	23	9
20	19	22	24	9
20	19	22	25	9
21	19	22	23	9
21	19	22	24	9
21	19	22	25	9
19	22	25	26	9
19	22	25	27	9
19	22	25	28	9
23	22	25	26	9
23	22	25	27	9
23	22	25	28	9
24	22	25	26	9
24	22	25	27	9
24	22	25	28	9
22	25	28	29	9
22	25	28	30	9
22	25	28	31	9
26	25	28	29	9
26	25	28	30	9
26	25	28	31	9
27	25	28	29	9
27	25	28	30	9
27	25	28	31	9
25	28	31	32	9
25	28	31	33	9
25	28	31	34	9
29	28	31	32	9
29	28	31	33	9
29	28	31	34	9
30	28	31	32	9
30	28	31	33	9
30	28	31	34	9
28	31	34	35	9
28	31	34	36	9
28	31	34	37	9
32	31	34	35	9
32	31	34	36	9
32	31	34	37	9
33	31	34	35	9
33	31	34	36	9
33	31	34	37	9

31	34	37	38	9
31	34	37	39	9
31	34	37	40	9
35	34	37	38	9
35	34	37	39	9
35	34	37	40	9
36	34	37	38	9
36	34	37	39	9
36	34	37	40	9
34	37	40	41	9
34	37	40	42	9
34	37	40	43	9
38	37	40	41	9
38	37	40	42	9
38	37	40	43	9
39	37	40	41	9
39	37	40	42	9
39	37	40	43	9
37	40	43	44	9
37	40	43	45	9
37	40	43	46	9
41	40	43	44	9
41	40	43	45	9
41	40	43	46	9
42	40	43	44	9
42	40	43	45	9
42	40	43	46	9
40	43	46	47	9
40	43	46	48	9
40	43	46	49	9
44	43	46	47	9
44	43	46	48	9
44	43	46	49	9
45	43	46	47	9
45	43	46	48	9
45	43	46	49	9
43	46	49	50	9
43	46	49	51	9
43	46	49	52	9
47	46	49	50	9
47	46	49	51	9
47	46	49	52	9
48	46	49	50	9
48	46	49	51	9
48	46	49	52	9
46	49	52	53	9
46	49	52	54	9
46	49	52	55	9
50	49	52	53	9
50	49	52	54	9
50	49	52	55	9
51	49	52	53	9
51	49	52	54	9
51	49	52	55	9
6	56	58	59	9
6	56	58	60	9
6	56	58	61	9
57	56	58	59	9
57	56	58	60	9
57	56	58	61	9
56	58	61	62	9
56	58	61	63	9
56	58	61	64	9
59	58	61	62	9
59	58	61	63	9
59	58	61	64	9
60	58	61	62	9
60	58	61	63	9
60	58	61	64	9

58	61	64	65	9
58	61	64	66	9
58	61	64	67	9
62	61	64	65	9
62	61	64	66	9
62	61	64	67	9
63	61	64	65	9
63	61	64	66	9
63	61	64	67	9
61	64	67	68	9
61	64	67	69	9
61	64	67	70	9
65	64	67	68	9
65	64	67	69	9
65	64	67	70	9
66	64	67	68	9
66	64	67	69	9
66	64	67	70	9
64	67	70	71	9
64	67	70	72	9
64	67	70	73	9
68	67	70	71	9
68	67	70	72	9
68	67	70	73	9
69	67	70	71	9
69	67	70	72	9
69	67	70	73	9
67	70	73	74	9
67	70	73	75	9
67	70	73	76	9
71	70	73	74	9
71	70	73	75	9
71	70	73	76	9
72	70	73	74	9
72	70	73	75	9
72	70	73	76	9
70	73	76	77	9
70	73	76	78	9
70	73	76	79	9
74	73	76	77	9
74	73	76	78	9
74	73	76	79	9
75	73	76	77	9
75	73	76	78	9
75	73	76	79	9
73	76	79	80	9
73	76	79	81	9
73	76	79	82	9
77	76	79	80	9
77	76	79	81	9
77	76	79	82	9
78	76	79	80	9
78	76	79	81	9
78	76	79	82	9
76	79	82	83	9
76	79	82	84	9
76	79	82	85	9
80	79	82	83	9
80	79	82	84	9
80	79	82	85	9
81	79	82	83	9
81	79	82	84	9
81	79	82	85	9
79	82	85	86	9
79	82	85	87	9
79	82	85	88	9
83	82	85	86	9
83	82	85	87	9
83	82	85	88	9

84	82	85	86	9
84	82	85	87	9
84	82	85	88	9
82	85	88	89	9
82	85	88	90	9
82	85	88	91	9
86	85	88	89	9
86	85	88	90	9
86	85	88	91	9
87	85	88	89	9
87	85	88	90	9
87	85	88	91	9
85	88	91	92	9
85	88	91	93	9
85	88	91	94	9
89	88	91	92	9
89	88	91	93	9
89	88	91	94	9
90	88	91	92	9
90	88	91	93	9
90	88	91	94	9
88	91	94	95	9
88	91	94	96	9
88	91	94	97	9
92	91	94	95	9
92	91	94	96	9
92	91	94	97	9
93	91	94	95	9
93	91	94	96	9
93	91	94	97	9
91	94	97	98	9
91	94	97	99	9
91	94	97	100	9
95	94	97	98	9
95	94	97	99	9
95	94	97	100	9
96	94	97	98	9
96	94	97	99	9
96	94	97	100	9
94	97	100	101	9
94	97	100	102	9
94	97	100	103	9
98	97	100	101	9
98	97	100	102	9
98	97	100	103	9
99	97	100	101	9
99	97	100	102	9
99	97	100	103	9
97	100	103	104	9
97	100	103	105	9
97	100	103	106	9
101	100	103	104	9
101	100	103	105	9
101	100	103	106	9
102	100	103	104	9
102	100	103	105	9
102	100	103	106	9
100	103	106	107	9
100	103	106	108	9
100	103	106	109	9
104	103	106	107	9
104	103	106	108	9
104	103	106	109	9
105	103	106	107	9
105	103	106	108	9
105	103	106	109	9
103	106	109	110	9
103	106	109	111	9
103	106	109	112	9

```

107 106 109 110 9
107 106 109 111 9
107 106 109 112 9
108 106 109 110 9
108 106 109 111 9
108 106 109 112 9
106 109 112 113 9
106 109 112 114 9
106 109 112 115 9
110 109 112 113 9
110 109 112 114 9
110 109 112 115 9
111 109 112 113 9
111 109 112 114 9
111 109 112 115 9
109 112 115 116 9
109 112 115 117 9
109 112 115 118 9
113 112 115 116 9
113 112 115 117 9
113 112 115 118 9
114 112 115 116 9
114 112 115 117 9
114 112 115 118 9
112 115 118 119 9
112 115 118 120 9
112 115 118 121 9
116 115 118 119 9
116 115 118 120 9
116 115 118 121 9
117 115 118 119 9
117 115 118 120 9
117 115 118 121 9
115 118 121 122 9
115 118 121 123 9
115 118 121 124 9
119 118 121 122 9
119 118 121 123 9
119 118 121 124 9
120 118 121 122 9
120 118 121 123 9
120 118 121 124 9
118 121 124 125 9
118 121 124 126 9
118 121 124 127 9
122 121 124 125 9
122 121 124 126 9
122 121 124 127 9
123 121 124 125 9
123 121 124 126 9
123 121 124 127 9
[ dihedrals ]
; ai aj ak al funct q0 cq
 56 58 6 57 2

```

Apéndice B. Topología CER[AP]

```

GROMACS topology file for CAP
;
[ moleculetype ]
; name nrexcl
CAP 3
[ atoms ]
; nr type resnr residu atom cgnr charge mass
 1 OG311 1 CAP O1 1 -0.648 15.9994 ; qtot -0.648
 2 HGP1 1 CAP H1 2 0.420 1.0080 ; qtot -0.228

```

3	CG321	1	CAP	C1	3	0.045	12.0110	; qtot -0.183
4	HGA2	1	CAP	H2	4	0.090	1.0080	; qtot -0.093
5	HGA2	1	CAP	H3	5	0.090	1.0080	; qtot -0.003
6	NG2S1	1	CAP	N	6	-0.444	14.0070	; qtot -0.447
7	HGP1	1	CAP	H4	7	0.311	1.0080	; qtot -0.136
8	CG311	1	CAP	C2	8	0.019	12.0110	; qtot -0.117
9	HGA1	1	CAP	H5	9	0.090	1.0080	; qtot -0.027
10	CG311	1	CAP	C3	10	0.141	12.0110	; qtot 0.114
11	HGA1	1	CAP	H6	11	0.090	1.0080	; qtot 0.204
12	OG311	1	CAP	O2	12	-0.658	15.9994	; qtot -0.454
13	HGP1	1	CAP	H7	13	0.419	1.0080	; qtot -0.035
14	CG311	1	CAP	C4	14	0.150	12.0110	; qtot 0.115
15	CG321	1	CAP	C5	15	-0.175	12.0110	; qtot -0.060
16	CG321	1	CAP	C6	16	-0.199	12.0110	; qtot -0.259
17	HGA2	1	CAP	H8	17	0.090	1.0080	; qtot -0.169
18	HGA2	1	CAP	H9	18	0.090	1.0080	; qtot -0.079
19	CG321	1	CAP	C7	19	-0.162	12.0110	; qtot -0.241
20	HGA2	1	CAP	H10	20	0.090	1.0080	; qtot -0.151
21	HGA2	1	CAP	H11	21	0.090	1.0080	; qtot -0.061
22	CG321	1	CAP	C8	22	-0.180	12.0110	; qtot -0.241
23	HGA2	1	CAP	H12	23	0.090	1.0080	; qtot -0.151
24	HGA2	1	CAP	H13	24	0.090	1.0080	; qtot -0.061
25	CG321	1	CAP	C9	25	-0.180	12.0110	; qtot -0.241
26	HGA2	1	CAP	H14	26	0.090	1.0080	; qtot -0.151
27	HGA2	1	CAP	H15	27	0.090	1.0080	; qtot -0.061
28	CG321	1	CAP	C10	28	-0.180	12.0110	; qtot -0.241
29	HGA2	1	CAP	H16	29	0.090	1.0080	; qtot -0.151
30	HGA2	1	CAP	H17	30	0.090	1.0080	; qtot -0.061
31	CG321	1	CAP	C11	31	-0.180	12.0110	; qtot -0.241
32	HGA2	1	CAP	H18	32	0.090	1.0080	; qtot -0.151
33	HGA2	1	CAP	H19	33	0.090	1.0080	; qtot -0.061
34	CG321	1	CAP	C12	34	-0.180	12.0110	; qtot -0.241
35	HGA2	1	CAP	H20	35	0.090	1.0080	; qtot -0.151
36	HGA2	1	CAP	H21	36	0.090	1.0080	; qtot -0.061
37	CG321	1	CAP	C13	37	-0.180	12.0110	; qtot -0.241
38	HGA2	1	CAP	H22	38	0.090	1.0080	; qtot -0.151
39	HGA2	1	CAP	H23	39	0.090	1.0080	; qtot -0.061
40	CG321	1	CAP	C14	40	-0.180	12.0110	; qtot -0.241
41	HGA2	1	CAP	H24	41	0.090	1.0080	; qtot -0.151
42	HGA2	1	CAP	H25	42	0.090	1.0080	; qtot -0.061
43	CG321	1	CAP	C15	43	-0.180	12.0110	; qtot -0.241
44	HGA2	1	CAP	H26	44	0.090	1.0080	; qtot -0.151
45	HGA2	1	CAP	H27	45	0.090	1.0080	; qtot -0.061
46	CG321	1	CAP	C16	46	-0.180	12.0110	; qtot -0.241
47	HGA2	1	CAP	H28	47	0.090	1.0080	; qtot -0.151
48	HGA2	1	CAP	H29	48	0.090	1.0080	; qtot -0.061
49	CG321	1	CAP	C17	49	-0.180	12.0110	; qtot -0.241
50	HGA2	1	CAP	H30	50	0.090	1.0080	; qtot -0.151
51	HGA2	1	CAP	H31	51	0.090	1.0080	; qtot -0.061
52	CG331	1	CAP	C18	52	-0.270	12.0110	; qtot -0.331
53	HGA3	1	CAP	H32	53	0.090	1.0080	; qtot -0.241
54	HGA3	1	CAP	H33	54	0.090	1.0080	; qtot -0.151
55	HGA3	1	CAP	H34	55	0.090	1.0080	; qtot -0.061
56	CG201	1	CAP	C19	56	0.519	12.0110	; qtot 0.458
57	OG2D1	1	CAP	O3	57	-0.504	15.9994	; qtot -0.046
58	CG311	1	CAP	C20	58	0.180	12.0110	; qtot 0.134
59	OG311	1	CAP	O4	59	-0.627	15.9994	; qtot -0.493
60	HGA1	1	CAP	H35	60	0.090	1.0080	; qtot -0.403
61	CG321	1	CAP	C21	61	-0.162	12.0110	; qtot -0.565
62	HGA2	1	CAP	H36	62	0.090	1.0080	; qtot -0.475
63	HGA2	1	CAP	H37	63	0.090	1.0080	; qtot -0.385
64	CG321	1	CAP	C22	64	-0.212	12.0110	; qtot -0.597
65	HGA2	1	CAP	H38	65	0.090	1.0080	; qtot -0.507
66	HGA2	1	CAP	H39	66	0.090	1.0080	; qtot -0.417
67	CG321	1	CAP	C23	67	-0.162	12.0110	; qtot -0.579
68	HGA2	1	CAP	H40	68	0.090	1.0080	; qtot -0.489
69	HGA2	1	CAP	H41	69	0.090	1.0080	; qtot -0.399
70	CG321	1	CAP	C24	70	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
71	HGA2	1	CAP	H42	71	0.090	1.0080	; qtot -0.489

72	HGA2	1	CAP	H43	72	0.090	1.0080	; qtot -0.399
73	CG321	1	CAP	C25	73	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
74	HGA2	1	CAP	H44	74	0.090	1.0080	; qtot -0.489
75	HGA2	1	CAP	H45	75	0.090	1.0080	; qtot -0.399
76	CG321	1	CAP	C26	76	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
77	HGA2	1	CAP	H46	77	0.090	1.0080	; qtot -0.489
78	HGA2	1	CAP	H47	78	0.090	1.0080	; qtot -0.399
79	CG321	1	CAP	C27	79	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
80	HGA2	1	CAP	H48	80	0.090	1.0080	; qtot -0.489
81	HGA2	1	CAP	H49	81	0.090	1.0080	; qtot -0.399
82	CG321	1	CAP	C28	82	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
83	HGA2	1	CAP	H50	83	0.090	1.0080	; qtot -0.489
84	HGA2	1	CAP	H51	84	0.090	1.0080	; qtot -0.399
85	CG321	1	CAP	C29	85	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
86	HGA2	1	CAP	H52	86	0.090	1.0080	; qtot -0.489
87	HGA2	1	CAP	H53	87	0.090	1.0080	; qtot -0.399
88	CG321	1	CAP	C30	88	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
89	HGA2	1	CAP	H54	89	0.090	1.0080	; qtot -0.489
90	HGA2	1	CAP	H55	90	0.090	1.0080	; qtot -0.399
91	CG321	1	CAP	C31	91	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
92	HGA2	1	CAP	H56	92	0.090	1.0080	; qtot -0.489
93	HGA2	1	CAP	H57	93	0.090	1.0080	; qtot -0.399
94	CG321	1	CAP	C32	94	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
95	HGA2	1	CAP	H58	95	0.090	1.0080	; qtot -0.489
96	HGA2	1	CAP	H59	96	0.090	1.0080	; qtot -0.399
97	CG321	1	CAP	C33	97	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
98	HGA2	1	CAP	H60	98	0.090	1.0080	; qtot -0.489
99	HGA2	1	CAP	H61	99	0.090	1.0080	; qtot -0.399
100	CG321	1	CAP	C34	100	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
101	HGA2	1	CAP	H62	101	0.090	1.0080	; qtot -0.489
102	HGA2	1	CAP	H63	102	0.090	1.0080	; qtot -0.399
103	CG321	1	CAP	C35	103	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
104	HGA2	1	CAP	H64	104	0.090	1.0080	; qtot -0.489
105	HGA2	1	CAP	H65	105	0.090	1.0080	; qtot -0.399
106	CG321	1	CAP	C36	106	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
107	HGA2	1	CAP	H66	107	0.090	1.0080	; qtot -0.489
108	HGA2	1	CAP	H67	108	0.090	1.0080	; qtot -0.399
109	CG321	1	CAP	C37	109	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
110	HGA2	1	CAP	H68	110	0.090	1.0080	; qtot -0.489
111	HGA2	1	CAP	H69	111	0.090	1.0080	; qtot -0.399
112	CG321	1	CAP	C38	112	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
113	HGA2	1	CAP	H70	113	0.090	1.0080	; qtot -0.489
114	HGA2	1	CAP	H71	114	0.090	1.0080	; qtot -0.399
115	CG321	1	CAP	C39	115	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
116	HGA2	1	CAP	H72	116	0.090	1.0080	; qtot -0.489
117	HGA2	1	CAP	H73	117	0.090	1.0080	; qtot -0.399
118	CG321	1	CAP	C40	118	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
119	HGA2	1	CAP	H74	119	0.090	1.0080	; qtot -0.489
120	HGA2	1	CAP	H75	120	0.090	1.0080	; qtot -0.399
121	CG321	1	CAP	C41	121	-0.180	12.0110	; qtot -0.579
122	HGA2	1	CAP	H76	122	0.090	1.0080	; qtot -0.489
123	HGA2	1	CAP	H77	123	0.090	1.0080	; qtot -0.399
124	CG331	1	CAP	C42	124	-0.270	12.0110	; qtot -0.669
125	HGA3	1	CAP	H78	125	0.090	1.0080	; qtot -0.579
126	HGA3	1	CAP	H79	126	0.090	1.0080	; qtot -0.489
127	HGA3	1	CAP	H80	127	0.090	1.0080	; qtot -0.399
128	HGA2	1	CAP	H81	128	0.090	1.0080	; qtot -0.309
129	HGA2	1	CAP	H82	129	0.090	1.0080	; qtot -0.219
130	HGA1	1	CAP	H83	130	0.090	1.0080	; qtot -0.129
131	OG311	1	CAP	O5	131	-0.659	15.9994	; qtot -0.788
132	HGP1	1	CAP	H84	132	0.419	1.0080	; qtot -0.369
133	HGP1	1	CAP	H85	133	0.369	1.0080	; qtot -0.000
[bonds]								
; ai aj funct b0 Kb								
1	2	1						
1	3	1						
3	4	1						
3	5	1						
3	8	1						

6	7	1
6	8	1
6	56	1
8	9	1
8	10	1
10	11	1
10	12	1
10	14	1
12	13	1
14	15	1
14	130	1
14	131	1
15	16	1
15	128	1
15	129	1
16	17	1
16	18	1
16	19	1
19	20	1
19	21	1
19	22	1
22	23	1
22	24	1
22	25	1
25	26	1
25	27	1
25	28	1
28	29	1
28	30	1
28	31	1
31	32	1
31	33	1
31	34	1
34	35	1
34	36	1
34	37	1
37	38	1
37	39	1
37	40	1
40	41	1
40	42	1
40	43	1
43	44	1
43	45	1
43	46	1
46	47	1
46	48	1
46	49	1
49	50	1
49	51	1
49	52	1
52	53	1
52	54	1
52	55	1
56	57	1
56	58	1
58	59	1
58	60	1
58	61	1
59	133	1
61	62	1
61	63	1
61	64	1
64	65	1
64	66	1
64	67	1
67	68	1
67	69	1
67	70	1

```

70 71 1
70 72 1
70 73 1
73 74 1
73 75 1
73 76 1
76 77 1
76 78 1
76 79 1
79 80 1
79 81 1
79 82 1
82 83 1
82 84 1
82 85 1
85 86 1
85 87 1
85 88 1
88 89 1
88 90 1
88 91 1
91 92 1
91 93 1
91 94 1
94 95 1
94 96 1
94 97 1
97 98 1
97 99 1
97 100 1
100 101 1
100 102 1
100 103 1
103 104 1
103 105 1
103 106 1
106 107 1
106 108 1
106 109 1
109 110 1
109 111 1
109 112 1
112 113 1
112 114 1
112 115 1
115 116 1
115 117 1
115 118 1
118 119 1
118 120 1
118 121 1
121 122 1
121 123 1
121 124 1
124 125 1
124 126 1
124 127 1
131 132 1
[ pairs ]
; ai aj funct c6 c12
1 6 1
1 9 1
1 10 1
2 4 1
2 5 1
2 8 1
3 7 1
3 11 1
3 12 1

```

3	14	1
3	56	1
4	6	1
4	9	1
4	10	1
5	6	1
5	9	1
5	10	1
6	11	1
6	12	1
6	14	1
6	59	1
6	60	1
6	61	1
7	9	1
7	10	1
7	57	1
7	58	1
8	13	1
8	15	1
8	57	1
8	58	1
8	130	1
8	131	1
9	11	1
9	12	1
9	14	1
9	56	1
10	16	1
10	56	1
10	128	1
10	129	1
10	132	1
11	13	1
11	15	1
11	130	1
11	131	1
12	15	1
12	130	1
12	131	1
13	14	1
14	17	1
14	18	1
14	19	1
15	20	1
15	21	1
15	22	1
15	132	1
16	23	1
16	24	1
16	25	1
16	130	1
16	131	1
17	20	1
17	21	1
17	22	1
17	128	1
17	129	1
18	20	1
18	21	1
18	22	1
18	128	1
18	129	1
19	26	1
19	27	1
19	28	1
19	128	1
19	129	1
20	23	1

20	24	1
20	25	1
21	23	1
21	24	1
21	25	1
22	29	1
22	30	1
22	31	1
23	26	1
23	27	1
23	28	1
24	26	1
24	27	1
24	28	1
25	32	1
25	33	1
25	34	1
26	29	1
26	30	1
26	31	1
27	29	1
27	30	1
27	31	1
28	35	1
28	36	1
28	37	1
29	32	1
29	33	1
29	34	1
30	32	1
30	33	1
30	34	1
31	38	1
31	39	1
31	40	1
32	35	1
32	36	1
32	37	1
33	35	1
33	36	1
33	37	1
34	41	1
34	42	1
34	43	1
35	38	1
35	39	1
35	40	1
36	38	1
36	39	1
36	40	1
37	44	1
37	45	1
37	46	1
38	41	1
38	42	1
38	43	1
39	41	1
39	42	1
39	43	1
40	47	1
40	48	1
40	49	1
41	44	1
41	45	1
41	46	1
42	44	1
42	45	1
42	46	1
43	50	1

43	51	1
43	52	1
44	47	1
44	48	1
44	49	1
45	47	1
45	48	1
45	49	1
46	53	1
46	54	1
46	55	1
47	50	1
47	51	1
47	52	1
48	50	1
48	51	1
48	52	1
50	53	1
50	54	1
50	55	1
51	53	1
51	54	1
51	55	1
56	62	1
56	63	1
56	64	1
56	133	1
57	59	1
57	60	1
57	61	1
58	65	1
58	66	1
58	67	1
59	62	1
59	63	1
59	64	1
60	62	1
60	63	1
60	64	1
60	133	1
61	68	1
61	69	1
61	70	1
61	133	1
62	65	1
62	66	1
62	67	1
63	65	1
63	66	1
63	67	1
64	71	1
64	72	1
64	73	1
65	68	1
65	69	1
65	70	1
66	68	1
66	69	1
66	70	1
67	74	1
67	75	1
67	76	1
68	71	1
68	72	1
68	73	1
69	71	1
69	72	1
69	73	1
70	77	1

70	78	1
70	79	1
71	74	1
71	75	1
71	76	1
72	74	1
72	75	1
72	76	1
73	80	1
73	81	1
73	82	1
74	77	1
74	78	1
74	79	1
75	77	1
75	78	1
75	79	1
76	83	1
76	84	1
76	85	1
77	80	1
77	81	1
77	82	1
78	80	1
78	81	1
78	82	1
79	86	1
79	87	1
79	88	1
80	83	1
80	84	1
80	85	1
81	83	1
81	84	1
81	85	1
82	89	1
82	90	1
82	91	1
83	86	1
83	87	1
83	88	1
84	86	1
84	87	1
84	88	1
85	92	1
85	93	1
85	94	1
86	89	1
86	90	1
86	91	1
87	89	1
87	90	1
87	91	1
88	95	1
88	96	1
88	97	1
89	92	1
89	93	1
89	94	1
90	92	1
90	93	1
90	94	1
91	98	1
91	99	1
91	100	1
92	95	1
92	96	1
92	97	1
93	95	1

93	96	1
93	97	1
94	101	1
94	102	1
94	103	1
95	98	1
95	99	1
95	100	1
96	98	1
96	99	1
96	100	1
97	104	1
97	105	1
97	106	1
98	101	1
98	102	1
98	103	1
99	101	1
99	102	1
99	103	1
100	107	1
100	108	1
100	109	1
101	104	1
101	105	1
101	106	1
102	104	1
102	105	1
102	106	1
103	110	1
103	111	1
103	112	1
104	107	1
104	108	1
104	109	1
105	107	1
105	108	1
105	109	1
106	113	1
106	114	1
106	115	1
107	110	1
107	111	1
107	112	1
108	110	1
108	111	1
108	112	1
109	116	1
109	117	1
109	118	1
110	113	1
110	114	1
110	115	1
111	113	1
111	114	1
111	115	1
112	119	1
112	120	1
112	121	1
113	116	1
113	117	1
113	118	1
114	116	1
114	117	1
114	118	1
115	122	1
115	123	1
115	124	1
116	119	1

116	120	1					
116	121	1					
117	119	1					
117	120	1					
117	121	1					
118	125	1					
118	126	1					
118	127	1					
119	122	1					
119	123	1					
119	124	1					
120	122	1					
120	123	1					
120	124	1					
122	125	1					
122	126	1					
122	127	1					
123	125	1					
123	126	1					
123	127	1					
128	130	1					
128	131	1					
129	130	1					
129	131	1					
130	132	1					
[angles]							
; ai	aj	ak	funct	th0	cth	S0	Kub
2	1	3	5				
1	3	4	5				
1	3	5	5				
1	3	8	5				
4	3	5	5				
4	3	8	5				
5	3	8	5				
7	6	8	5				
7	6	56	5				
8	6	56	5				
3	8	6	5				
3	8	9	5				
3	8	10	5				
6	8	9	5				
6	8	10	5				
9	8	10	5				
8	10	11	5				
8	10	12	5				
8	10	14	5				
11	10	12	5				
11	10	14	5				
12	10	14	5				
10	12	13	5				
10	14	15	5				
10	14	130	5				
10	14	131	5				
15	14	130	5				
15	14	131	5				
130	14	131	5				
14	15	16	5				
14	15	128	5				
14	15	129	5				
16	15	128	5				
16	15	129	5				
128	15	129	5				
15	16	17	5				
15	16	18	5				
15	16	19	5				
17	16	18	5				
17	16	19	5				
18	16	19	5				
16	19	20	5				

16	19	21	5
16	19	22	5
20	19	21	5
20	19	22	5
21	19	22	5
19	22	23	5
19	22	24	5
19	22	25	5
23	22	24	5
23	22	25	5
24	22	25	5
22	25	26	5
22	25	27	5
22	25	28	5
26	25	27	5
26	25	28	5
27	25	28	5
25	28	29	5
25	28	30	5
25	28	31	5
29	28	30	5
29	28	31	5
30	28	31	5
28	31	32	5
28	31	33	5
28	31	34	5
32	31	33	5
32	31	34	5
33	31	34	5
31	34	35	5
31	34	36	5
31	34	37	5
35	34	36	5
35	34	37	5
36	34	37	5
34	37	38	5
34	37	39	5
34	37	40	5
38	37	39	5
38	37	40	5
39	37	40	5
37	40	41	5
37	40	42	5
37	40	43	5
41	40	42	5
41	40	43	5
42	40	43	5
40	43	44	5
40	43	45	5
40	43	46	5
44	43	45	5
44	43	46	5
45	43	46	5
43	46	47	5
43	46	48	5
43	46	49	5
47	46	48	5
47	46	49	5
48	46	49	5
46	49	50	5
46	49	51	5
46	49	52	5
50	49	51	5
50	49	52	5
51	49	52	5
49	52	53	5
49	52	54	5
49	52	55	5
53	52	54	5

53	52	55	5
54	52	55	5
6	56	57	5
6	56	58	5
57	56	58	5
56	58	59	5
56	58	60	5
56	58	61	5
59	58	60	5
59	58	61	5
60	58	61	5
58	59	133	5
58	61	62	5
58	61	63	5
58	61	64	5
62	61	63	5
62	61	64	5
63	61	64	5
61	64	65	5
61	64	66	5
61	64	67	5
65	64	66	5
65	64	67	5
66	64	67	5
64	67	68	5
64	67	69	5
64	67	70	5
68	67	69	5
68	67	70	5
69	67	70	5
67	70	71	5
67	70	72	5
67	70	73	5
71	70	72	5
71	70	73	5
72	70	73	5
70	73	74	5
70	73	75	5
70	73	76	5
74	73	75	5
74	73	76	5
75	73	76	5
73	76	77	5
73	76	78	5
73	76	79	5
77	76	78	5
77	76	79	5
78	76	79	5
76	79	80	5
76	79	81	5
76	79	82	5
80	79	81	5
80	79	82	5
81	79	82	5
79	82	83	5
79	82	84	5
79	82	85	5
83	82	84	5
83	82	85	5
84	82	85	5
82	85	86	5
82	85	87	5
82	85	88	5
86	85	87	5
86	85	88	5
87	85	88	5
85	88	89	5
85	88	90	5
85	88	91	5

89	88	90	5
89	88	91	5
90	88	91	5
88	91	92	5
88	91	93	5
88	91	94	5
92	91	93	5
92	91	94	5
93	91	94	5
91	94	95	5
91	94	96	5
91	94	97	5
95	94	96	5
95	94	97	5
96	94	97	5
94	97	98	5
94	97	99	5
94	97	100	5
98	97	99	5
98	97	100	5
99	97	100	5
97	100	101	5
97	100	102	5
97	100	103	5
101	100	102	5
101	100	103	5
102	100	103	5
100	103	104	5
100	103	105	5
100	103	106	5
104	103	105	5
104	103	106	5
105	103	106	5
103	106	107	5
103	106	108	5
103	106	109	5
107	106	108	5
107	106	109	5
108	106	109	5
106	109	110	5
106	109	111	5
106	109	112	5
110	109	111	5
110	109	112	5
111	109	112	5
109	112	113	5
109	112	114	5
109	112	115	5
113	112	114	5
113	112	115	5
114	112	115	5
112	115	116	5
112	115	117	5
112	115	118	5
116	115	117	5
116	115	118	5
117	115	118	5
115	118	119	5
115	118	120	5
115	118	121	5
119	118	120	5
119	118	121	5
120	118	121	5
118	121	122	5
118	121	123	5
118	121	124	5
122	121	123	5
122	121	124	5
123	121	124	5

121	124	125	5				
121	124	126	5				
121	124	127	5				
125	124	126	5				
125	124	127	5				
126	124	127	5				
14	131	132	5				
[dihedrals]							
; ai	aj	ak	al	funct	phi0	cp	mult
2	1	3	4	9			
2	1	3	5	9			
2	1	3	8	9			
1	3	8	6	9			
1	3	8	9	9			
1	3	8	10	9			
4	3	8	6	9			
4	3	8	9	9			
4	3	8	10	9			
5	3	8	6	9			
5	3	8	9	9			
5	3	8	10	9			
7	6	8	9	9			
7	6	8	10	9			
7	6	56	57	9			
7	6	56	58	9			
8	6	56	57	9			
8	6	56	58	9			
3	8	6	7	9			
3	8	6	56	9			
9	8	6	56	9			
10	8	6	56	9			
3	8	10	11	9			
3	8	10	12	9			
3	8	10	14	9			
6	8	10	11	9			
6	8	10	12	9			
6	8	10	14	9			
9	8	10	11	9			
9	8	10	12	9			
9	8	10	14	9			
8	10	12	13	9			
11	10	12	13	9			
8	10	14	15	9			
8	10	14	130	9			
8	10	14	131	9			
11	10	14	15	9			
11	10	14	130	9			
11	10	14	131	9			
12	10	14	15	9			
12	10	14	130	9			
12	10	14	131	9			
13	12	10	14	9			
10	14	15	16	9			
10	14	15	128	9			
10	14	15	129	9			
10	14	131	132	9			
15	14	131	132	9			
130	14	131	132	9			
16	15	14	130	9			
16	15	14	131	9			
128	15	14	130	9			
128	15	14	131	9			
129	15	14	130	9			
129	15	14	131	9			
14	15	16	17	9			
14	15	16	18	9			
14	15	16	19	9			
17	16	15	128	9			
17	16	15	129	9			

18	16	15	128	9
18	16	15	129	9
19	16	15	128	9
19	16	15	129	9
15	16	19	20	9
15	16	19	21	9
15	16	19	22	9
17	16	19	20	9
17	16	19	21	9
17	16	19	22	9
18	16	19	20	9
18	16	19	21	9
18	16	19	22	9
16	19	22	23	9
16	19	22	24	9
16	19	22	25	9
20	19	22	23	9
20	19	22	24	9
20	19	22	25	9
21	19	22	23	9
21	19	22	24	9
21	19	22	25	9
19	22	25	26	9
19	22	25	27	9
19	22	25	28	9
23	22	25	26	9
23	22	25	27	9
23	22	25	28	9
24	22	25	26	9
24	22	25	27	9
24	22	25	28	9
22	25	28	29	9
22	25	28	30	9
22	25	28	31	9
26	25	28	29	9
26	25	28	30	9
26	25	28	31	9
27	25	28	29	9
27	25	28	30	9
27	25	28	31	9
25	28	31	32	9
25	28	31	33	9
25	28	31	34	9
29	28	31	32	9
29	28	31	33	9
29	28	31	34	9
30	28	31	32	9
30	28	31	33	9
30	28	31	34	9
28	31	34	35	9
28	31	34	36	9
28	31	34	37	9
32	31	34	35	9
32	31	34	36	9
32	31	34	37	9
33	31	34	35	9
33	31	34	36	9
33	31	34	37	9
31	34	37	38	9
31	34	37	39	9
31	34	37	40	9
35	34	37	38	9
35	34	37	39	9
35	34	37	40	9
36	34	37	38	9
36	34	37	39	9
36	34	37	40	9
34	37	40	41	9
34	37	40	42	9

34	37	40	43	9
38	37	40	41	9
38	37	40	42	9
38	37	40	43	9
39	37	40	41	9
39	37	40	42	9
39	37	40	43	9
37	40	43	44	9
37	40	43	45	9
37	40	43	46	9
41	40	43	44	9
41	40	43	45	9
41	40	43	46	9
42	40	43	44	9
42	40	43	45	9
42	40	43	46	9
40	43	46	47	9
40	43	46	48	9
40	43	46	49	9
44	43	46	47	9
44	43	46	48	9
44	43	46	49	9
45	43	46	47	9
45	43	46	48	9
45	43	46	49	9
43	46	49	50	9
43	46	49	51	9
43	46	49	52	9
47	46	49	50	9
47	46	49	51	9
47	46	49	52	9
48	46	49	50	9
48	46	49	51	9
48	46	49	52	9
46	49	52	53	9
46	49	52	54	9
46	49	52	55	9
50	49	52	53	9
50	49	52	54	9
50	49	52	55	9
51	49	52	53	9
51	49	52	54	9
51	49	52	55	9
6	56	58	59	9
6	56	58	60	9
6	56	58	61	9
57	56	58	59	9
57	56	58	60	9
57	56	58	61	9
56	58	59	133	9
60	58	59	133	9
61	58	59	133	9
56	58	61	62	9
56	58	61	63	9
56	58	61	64	9
59	58	61	62	9
59	58	61	63	9
59	58	61	64	9
60	58	61	62	9
60	58	61	63	9
60	58	61	64	9
58	61	64	65	9
58	61	64	66	9
58	61	64	67	9
62	61	64	65	9
62	61	64	66	9
62	61	64	67	9
63	61	64	65	9
63	61	64	66	9

63	61	64	67	9
61	64	67	68	9
61	64	67	69	9
61	64	67	70	9
65	64	67	68	9
65	64	67	69	9
65	64	67	70	9
66	64	67	68	9
66	64	67	69	9
66	64	67	70	9
64	67	70	71	9
64	67	70	72	9
64	67	70	73	9
68	67	70	71	9
68	67	70	72	9
68	67	70	73	9
69	67	70	71	9
69	67	70	72	9
69	67	70	73	9
67	70	73	74	9
67	70	73	75	9
67	70	73	76	9
71	70	73	74	9
71	70	73	75	9
71	70	73	76	9
72	70	73	74	9
72	70	73	75	9
72	70	73	76	9
70	73	76	77	9
70	73	76	78	9
70	73	76	79	9
74	73	76	77	9
74	73	76	78	9
74	73	76	79	9
75	73	76	77	9
75	73	76	78	9
75	73	76	79	9
73	76	79	80	9
73	76	79	81	9
73	76	79	82	9
77	76	79	80	9
77	76	79	81	9
77	76	79	82	9
78	76	79	80	9
78	76	79	81	9
78	76	79	82	9
76	79	82	83	9
76	79	82	84	9
76	79	82	85	9
80	79	82	83	9
80	79	82	84	9
80	79	82	85	9
81	79	82	83	9
81	79	82	84	9
81	79	82	85	9
79	82	85	86	9
79	82	85	87	9
79	82	85	88	9
83	82	85	86	9
83	82	85	87	9
83	82	85	88	9
84	82	85	86	9
84	82	85	87	9
84	82	85	88	9
82	85	88	89	9
82	85	88	90	9
82	85	88	91	9
86	85	88	89	9
86	85	88	90	9

86	85	88	91	9
87	85	88	89	9
87	85	88	90	9
87	85	88	91	9
85	88	91	92	9
85	88	91	93	9
85	88	91	94	9
89	88	91	92	9
89	88	91	93	9
89	88	91	94	9
90	88	91	92	9
90	88	91	93	9
90	88	91	94	9
88	91	94	95	9
88	91	94	96	9
88	91	94	97	9
92	91	94	95	9
92	91	94	96	9
92	91	94	97	9
93	91	94	95	9
93	91	94	96	9
93	91	94	97	9
91	94	97	98	9
91	94	97	99	9
91	94	97	100	9
95	94	97	98	9
95	94	97	99	9
95	94	97	100	9
96	94	97	98	9
96	94	97	99	9
96	94	97	100	9
94	97	100	101	9
94	97	100	102	9
94	97	100	103	9
98	97	100	101	9
98	97	100	102	9
98	97	100	103	9
99	97	100	101	9
99	97	100	102	9
99	97	100	103	9
97	100	103	104	9
97	100	103	105	9
97	100	103	106	9
101	100	103	104	9
101	100	103	105	9
101	100	103	106	9
102	100	103	104	9
102	100	103	105	9
102	100	103	106	9
100	103	106	107	9
100	103	106	108	9
100	103	106	109	9
104	103	106	107	9
104	103	106	108	9
104	103	106	109	9
105	103	106	107	9
105	103	106	108	9
105	103	106	109	9
103	106	109	110	9
103	106	109	111	9
103	106	109	112	9
107	106	109	110	9
107	106	109	111	9
107	106	109	112	9
108	106	109	110	9
108	106	109	111	9
108	106	109	112	9
106	109	112	113	9
106	109	112	114	9

```

106 109 112 115 9
110 109 112 113 9
110 109 112 114 9
110 109 112 115 9
111 109 112 113 9
111 109 112 114 9
111 109 112 115 9
109 112 115 116 9
109 112 115 117 9
109 112 115 118 9
113 112 115 116 9
113 112 115 117 9
113 112 115 118 9
114 112 115 116 9
114 112 115 117 9
114 112 115 118 9
112 115 118 119 9
112 115 118 120 9
112 115 118 121 9
116 115 118 119 9
116 115 118 120 9
116 115 118 121 9
117 115 118 119 9
117 115 118 120 9
117 115 118 121 9
115 118 121 122 9
115 118 121 123 9
115 118 121 124 9
119 118 121 122 9
119 118 121 123 9
119 118 121 124 9
120 118 121 122 9
120 118 121 123 9
120 118 121 124 9
118 121 124 125 9
118 121 124 126 9
118 121 124 127 9
122 121 124 125 9
122 121 124 126 9
122 121 124 127 9
123 121 124 125 9
123 121 124 126 9
123 121 124 127 9
[ dihedrals ]
; ai aj ak al funct q0 cq
 56 58 6 57 2

```

Apéndice C. Script para el ensamble de la bicapa lipídica CER[NP]/CER[AP] 1:2

```

#
# Lipid double layer with water over and below
#
tolerance 2.0
filetype pdb
output NP66AP34.pdb
structure water.pdb
  number 6490
  inside box 0. 0. -16. 106. 106. 0.
end structure
structure water.pdb
  number 6490
  inside box 0. 0. 52. 106. 106. 68.
end structure
structure NP.pdb
  number 34
  inside box 0. 0. 0. 106. 106. 26.
  atoms 1 3
  below plane 0. 0. 1. 2.

```

```

end atoms
atoms 121 124
  over plane 0. 0. 1. 24.
end atoms
end structure
structure NP.pdb
  number 34
  inside box 0. 0. 26. 106. 106. 52.
  atoms 121 124
    below plane 0. 0. 1. 28.
  end atoms
  atoms 1 3
    over plane 0. 0. 1. 50
  end atoms
end structure
structure AP.pdb
  number 66
  inside box 0. 0. 0. 106. 106. 26.
  atoms 1 3
    below plane 0. 0. 1. 2.
  end atoms
  atoms 121 124
    over plane 0. 0. 1. 24.
  end atoms
end structure
structure AP.pdb
  number 66
  inside box 0. 0. 26. 106. 106. 52.
  atoms 121 124
    below plane 0. 0. 1. 28.
  end atoms
  atoms 1 3
    over plane 0. 0. 1. 50
  end atoms
end structure
structure LA.pdb
  number 100
  inside box 0. 0. 0. 106. 106. 26.
  atoms 1 2
    below plane 0. 0. 1. 2.
  end atoms
  atoms 71 72
    over plane 0. 0. 1. 24.
  end atoms
end structure
structure LA.pdb
  number 100
  inside box 0. 0. 26. 106. 106. 52.
  atoms 71 72
    below plane 0. 0. 1. 28.
  end atoms
  atoms 1 2
    over plane 0. 0. 1. 50
  end atoms
end structure
structure CHL.pdb
  number 70
  inside box 0. 0. 0. 106. 106. 26.
  atoms 1 3
    below plane 0. 0. 1. 10.
  end atoms
  atoms 67 71
    over plane 0. 0. 1. 24.
  end atoms
end structure
structure CHL.pdb
  number 70
  inside box 0. 0. 26. 106. 106. 52.
  atoms 67 71

```

```

    below plane 0. 0. 1. 28.
end atoms
atoms 1 3
    over plane 0. 0. 1. 42.
end atoms
end structure

```

Apéndice D. Script para el ensamble de la bicapa lipídica CER[NP]/CER[AP] 2:1

```

#
# Lipid double layer with water over and below
#
tolerance 2.0
filetype pdb
output NP66AP34.pdb
structure water.pdb
    number 6490
    inside box 0. 0. -16. 106. 106. 0.
end structure
structure water.pdb
    number 6490
    inside box 0. 0. 52. 106. 106. 68.
end structure
structure NP.pdb
    number 66
    inside box 0. 0. 0. 106. 106. 26.
    atoms 1 3
        below plane 0. 0. 1. 2.
    end atoms
    atoms 121 124
        over plane 0. 0. 1. 24.
    end atoms
end structure
structure NP.pdb
    number 66
    inside box 0. 0. 26. 106. 106. 52.
    atoms 121 124
        below plane 0. 0. 1. 28.
    end atoms
    atoms 1 3
        over plane 0. 0. 1. 50
    end atoms
end structure
structure AP.pdb
    number 34
    inside box 0. 0. 0. 106. 106. 26.
    atoms 1 3
        below plane 0. 0. 1. 2.
    end atoms
    atoms 121 124
        over plane 0. 0. 1. 24.
    end atoms
end structure
structure AP.pdb
    number 34
    inside box 0. 0. 26. 106. 106. 52.
    atoms 121 124
        below plane 0. 0. 1. 28.
    end atoms
    atoms 1 3
        over plane 0. 0. 1. 50
    end atoms
end structure
structure LA.pdb

```

```

number 100
inside box 0. 0. 0. 106. 106. 26.
atoms 1 2
  below plane 0. 0. 1. 2.
end atoms
atoms 71 72
  over plane 0. 0. 1. 24.
end atoms
end structure
structure LA.pdb
number 100
inside box 0. 0. 26. 106. 106. 52.
atoms 71 72
  below plane 0. 0. 1. 28.
end atoms
atoms 1 2
  over plane 0. 0. 1. 50
end atoms
end structure
structure CHL.pdb
number 70
inside box 0. 0. 0. 106. 106. 26.
atoms 1 3
  below plane 0. 0. 1. 10.
end atoms
atoms 67 71
  over plane 0. 0. 1. 24.
end atoms
end structure
structure CHL.pdb
number 70
inside box 0. 0. 26. 106. 106. 52.
atoms 67 71
  below plane 0. 0. 1. 28.
end atoms
atoms 1 3
  over plane 0. 0. 1. 42.
end atoms
end structure

```

Apéndice E. Restricciones moleculares para CER

```

#ifdef STEP6_0
#define fc_lpos 1000.0
#define fc_ldih 1000.0
#endif
#ifdef STEP6_1
#define fc_lpos 1000.0
#define fc_ldih 1000.0
#endif
#ifdef STEP6_2
#define fc_lpos 1000.0
#define fc_ldih 400.0
#endif
#ifdef STEP6_3
#define fc_lpos 400.0
#define fc_ldih 200.0
#endif
#ifdef STEP6_4
#define fc_lpos 200.0
#define fc_ldih 200.0
#endif
#ifdef STEP6_5
#define fc_lpos 40.0
#define fc_ldih 100.0
#endif
#ifdef STEP6_6

```

```
#define fc_lpos 0.0
#define fc_ldih 0.0
#endif
#ifdef STEP7
#define fc_lpos 0.0
#define fc_ldih 0.0
#endif
[ position_restraints ]
  1      1      0.0      0.0 fc_lpos
[ dihedral_restraints ]
  8     12     10     14      1     120.0      2.5 fc_ldih
  10     3      8      6      1     120.0      2.5 fc_ldih
  10     14     16     18      1     180.0      0.0 fc_ldih
```

Apéndice F. Restricciones moleculares para el ácido lignocérico

```
#ifdef STEP6_0
#define fc_lpos 1000.0
#define fc_ldih 1000.0
#endif
#ifdef STEP6_1
#define fc_lpos 1000.0
#define fc_ldih 1000.0
#endif
#ifdef STEP6_2
#define fc_lpos 1000.0
#define fc_ldih 400.0
#endif
#ifdef STEP6_3
#define fc_lpos 400.0
#define fc_ldih 200.0
#endif
#ifdef STEP6_4
#define fc_lpos 200.0
#define fc_ldih 200.0
#endif
#ifdef STEP6_5
#define fc_lpos 40.0
#define fc_ldih 100.0
#endif
#ifdef STEP6_6
#define fc_lpos 0.0
#define fc_ldih 0.0
#endif
#ifdef STEP7
#define fc_lpos 0.0
#define fc_ldih 0.0
#endif
[ position_restraints ]
  2      1      0.0      0.0 fc_lpos
```

Apéndice G. Restricciones moleculares para el colesterol

```
#ifdef STEP6_0
#define fc_lpos 1000.0
#define fc_ldih 1000.0
#endif
#ifdef STEP6_1
#define fc_lpos 1000.0
#define fc_ldih 1000.0
#endif
#ifdef STEP6_2
```

```
#define fc_lpos 1000.0
#define fc_ldih 400.0
#endif
#ifdef STEP6_3
#define fc_lpos 400.0
#define fc_ldih 200.0
#endif
#ifdef STEP6_4
#define fc_lpos 200.0
#define fc_ldih 200.0
#endif
#ifdef STEP6_5
#define fc_lpos 40.0
#define fc_ldih 100.0
#endif
#ifdef STEP6_6
#define fc_lpos 0.0
#define fc_ldih 0.0
#endif
#ifdef STEP7
#define fc_lpos 0.0
#define fc_ldih 0.0
#endif
[ position_restraints ]
  3      1      0.0      0.0 fc_lpos
```