



Simulaciones por Dinámica Molecular para el Estudio de Propiedades Biofísicas de Estafiloxantina en Membranas Modelo de *Staphylococcus aureus*

John Erick Cabrera Ramirez

Universidad de los Andes
Facultad de Ciencias, Departamento de Física
Bogotá, Colombia
2020

Simulaciones por Dinámica Molecular para el Estudio de Propiedades Biofísicas de Estafiloxantina en Membranas Modelo de *Staphylococcus aureus*

John Erick Cabrera Ramirez

Tesis o trabajo de grado presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ciencias-Física

Director(a):
Ph. D. Chad Leidy

Línea de Investigación:
Biofísica de membranas

Universidad de los Andes
Facultad de Ciencias, Departamento de Física
Bogotá, Colombia
2020

(Dedicatoria o un lema)

Su uso es opcional y cada autor podrá determinar la distribución del texto en la página, se sugiere esta presentación. En ella el autor dedica su trabajo en forma especial a personas y/o entidades.

Por ejemplo:

A mis padres

o

La preocupación por el hombre y su destino siempre debe ser el interés primordial de todo esfuerzo técnico. Nunca olvides esto entre tus diagramas y ecuaciones.

Albert Einstein

Agradecimientos

Esta sección es opcional, en ella el autor agradece a las personas o instituciones que colaboraron en la realización de la tesis o trabajo de investigación. Si se incluye esta sección, deben aparecer los nombres completos, los cargos y su aporte al documento.

Resumen

El resumen es una presentación abreviada y precisa (la NTC 1486 de 2008 recomienda revisar la norma ISO 214 de 1976). Se debe usar una extensión máxima de 12 renglones. Se recomienda que este resumen sea analítico, es decir, que sea completo, con información cuantitativa y cualitativa, generalmente incluyendo los siguientes aspectos: objetivos, diseño, lugar y circunstancias, pacientes (u objetivo del estudio), intervención, mediciones y principales resultados, y conclusiones. Al final del resumen se deben usar palabras claves tomadas del texto (mínimo 3 y máximo 7 palabras), las cuales permiten la recuperación de la información.

Palabras clave: (máximo 10 palabras, preferiblemente seleccionadas de las listas internacionales que permitan el indizado cruzado).

A continuación se presentan algunos ejemplos de tesauros que se pueden consultar para asignar las palabras clave, según el área temática:

Artes: AAT: Art y Architecture Thesaurus.

Ciencias agropecuarias: 1) Agrovoc: Multilingual Agricultural Thesaurus - F.A.O. y 2) GEMET: General Multilingual Environmental Thesaurus.

Ciencias sociales y humanas: 1) Tesauro de la UNESCO y 2) Population Multilingual Thesaurus.

Ciencia y tecnología: 1) Astronomy Thesaurus Index. 2) Life Sciences Thesaurus, 3) Subject Vocabulary, Chemical Abstracts Service y 4) InterWATER: Tesauro de IRC - Centro Internacional de Agua Potable y Saneamiento.

Tecnologías y ciencias médicas: 1) MeSH: Medical Subject Headings (National Library of Medicine's USA) y 2) DECS: Descriptores en ciencias de la Salud (Biblioteca Regional de Medicina BIREME-OPS).

Multidisciplinarias: 1) LEMB - Listas de Encabezamientos de Materia y 2) LCSH- Library of Congress Subject Headings.

También se pueden encontrar listas de temas y palabras claves, consultando las distintas bases de datos disponibles a través del Portal del Sistema Nacional de Bibliotecas¹, en la sección Recursos bibliográficos. opción "Bases de datos".

Abstract

Es el mismo resumen pero traducido al inglés. Se debe usar una extensión máxima de 12 renglones. Al final del Abstract se deben traducir las anteriores palabras claves tomadas del

¹ver: www.sinab.unal.edu.co

texto (mínimo 3 y máximo 7 palabras), llamadas keywords. Es posible incluir el resumen en otro idioma diferente al español o al inglés, si se considera como importante dentro del tema tratado en la investigación, por ejemplo: un trabajo dedicado a problemas lingüísticos del mandarín seguramente estaría mejor con un resumen en mandarín.

Keywords: palabras clave en inglés(máximo 10 palabras, preferiblemente seleccionadas de las listas internacionales que permitan el indizado cruzado)

Contenido

Agradecimientos	VII
Resumen	IX
Lista de símbolos	XIII
1. Introducción	1
2. Capítulo 1: Propiedades de la Membrana de <i>Staphylococcus aureus</i> y Resistencia de la Bacteria	4
2.1. La membrana Bacteriana y sus compuestos presentes	4
2.2. Resistencia a tratamientos antibióticos de <i>Staphylococcus aureus</i>	6
3. Capítulo 2: Simulaciones de Membranas	8
3.1. Dinámica Molecular y Campos de Fuerza	8
3.2. Campos de Fuerza	9
3.3. Solución de las ecuaciones de Movimiento	10
3.4. Simulaciones en Membranas	11
3.5. Trabajo Preliminar	11
3.5.1. Estudio del Rol de Estafloxantina en la modulación de parámetros estructurales de bicapas lipídicas compuestas por DMPG y DPPG [?]	11
4. Capítulo 3: Metodología	13
4.1. Reproducción de las simulaciones realizadas por Meléndez et al. [?]	13
4.2. Realización de las simulaciones por dinámica molecular de estafloxantina embebida en membranas de DMPG y DPPG colocando los parámetros obtenidos por optimizaciones QM	13
4.3. Realización de simulaciones de membranas de DMPG y DPPG con una concentración de estafloxantina al 15 % y estudio de sus propiedades	13
4.4. Análisis de las Simulaciones	13
5. Capítulo ...	18
6. Conclusiones y recomendaciones	19
6.1. Conclusiones	19

6.2. Recomendaciones	19
A. Anexo: Nombrar el anexo A de acuerdo con su contenido	20
B. Anexo: Nombrar el anexo B de acuerdo con su contenido	21
C. Anexo: Nombrar el anexo C de acuerdo con su contenido	22

Lista de símbolos

Esta sección es opcional, dado que existen disciplinas que no manejan símbolos y/o abreviaturas.

Se incluyen símbolos generales (con letras latinas y griegas), subíndices, superíndices y abreviaturas (incluir sólo las clases de símbolos que se utilicen). Cada una de estas listas debe estar ubicada en orden alfabético de acuerdo con la primera letra del símbolo.

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
A	Área	m^2	$\int \int dx dy$
A_{BET}	Área interna del sólido	$\frac{\text{m}^2}{\text{g}}$	ver DIN ISO 9277
A_{g}	Área transversal de la fase gaseosa	m^2	Ec...
A_{s}	Área transversal de la carga a granel	m^2	Ec...
a	Coficiente	1	Ec...
a	Contenido de ceniza	1	$\frac{m_{\text{ceniza}}}{m_{\text{bm},0}}$
c	Contenido de carbono	1	$\frac{m_{\text{C}}}{m}$
c	Longitud de la cuerda	m	Figura...
c	Concentración de la cantidad de materia	$\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}$	$\frac{n}{V}$
D	Diámetro	m	
E_{A}	Energía de activación	$\frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$	Ec....
F	Fracción de materia volátil	1	ver DIN 51720
Fr	Número de Froude	1	$\frac{\omega^2 R}{g_0}$
\vec{g}	Aceleración de la gravedad	$\frac{\text{m}}{\text{s}^2}$	$\frac{d^2 \vec{r}}{dt^2}$
H	Entalpía	J	$U + PV$
H_{o}	Poder calorífico superior	$\frac{\text{MJ}}{\text{kg}}$	ver DIN 51857
h	Contenido de hidrógeno	1	$\frac{m_{\text{H}}}{m}$

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
K	Coefficiente de equilibrio	1	Ec...
L	Longitud	m	DF
L	Longitud del reactor	m	Figura...
m	Masa	kg	DF
\dot{m}	Flujo de masa	$\frac{\text{kg}}{\text{s}}$	$\frac{m}{t}$
n	Velocidad de rotación	$\frac{1}{\text{s}}$	$\frac{\omega}{2\pi}$
n	Cantidad de materia	mol	DF
P	Presión	Pa	$\frac{\vec{F} \cdot \vec{n}}{A}$
Q	Calor	kJ	1. LT
T	Temperatura	K	DF
t	Tiempo	s	DF
x_i	Fracción de la cantidad de materia	1	$\frac{n_i}{n}$
V	Volumen	m^3	$\int dr^3$
\vec{u}	Velocidad	$\frac{\text{m}}{\text{s}}$	$(\frac{dr}{dt}, r\frac{dv}{dt}, \frac{dz}{dt})$
w_i	Fracción en masa del componente i	1	$\frac{m_i}{m_0}$
$w_{w,i}$	Contenido de humedad de la sustancia i	1	$\frac{m_{\text{H}_2\text{O}}}{m_{i,0}}$
Z	Factor de gases reales	1	$\frac{pv}{RT}$

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
α_{BET}	Factor de superficie	$\frac{\text{m}^2}{\text{g}}$	$(w_{\text{F,waf}})(A_{\text{BET}})$
β_i	Grado de formación del componente i	1	$\frac{m_i}{m_{\text{bm},0}}$
γ	Wandhaftreibwinkel (Stahlblech)	1	Sección...
ϵ	Porosidad de la partícula	1	$1 - \frac{\rho_s}{\rho_w}$
η	mittlere Bettneigungswinkel (Stürzen)	1	Figura...
θ	Ángulo de inclinación de la cama	1	Figura...
θ_{O}	Ángulo superior de avalancha	1	Figura...

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
θ_U	Ángulo inferior de avalancha	1	Figura...
κ	Velocidad de calentamiento	$\frac{K}{s}$	$\frac{dT}{dt}$
ν	Coeficiente estequiométrico	1	ver DIN 13345
ρ_b	Densidad a granel	$\frac{kg}{m^3}$	$\frac{m_S}{V_S}$ (Sección...)
ρ_s	Densidad aparente	$\frac{kg}{m^3}$	$\frac{m_F}{V_P}$ (Sección...)
ρ_w	Densidad verdadera	$\frac{kg}{m^3}$	$\frac{m_F}{V_F}$ (Sección...)
τ	Tiempo adimensional	1	Ec....
Φ_V	Flujo volumétrico	$\frac{m^3}{s}$	$\frac{\Delta V}{\Delta t}$
ω	Velocidad angular	$\frac{1}{s}$	$\frac{d\varphi}{dt}$

Subíndices

Subíndice	Término
bm	materia orgánica
DR	Dubinin-Radushkevich
E	Experimental
g	Fase gaseosa
k	Condensado
Ma	Macroporos
P	Partícula
p	Poros
p	Pirolizado
R	Reacción
t	Total
wf	Libre de agua
waf	Libre de agua y de ceniza
0	Estado de referencia

Superíndices

Superíndice	Término
-------------	---------

n	Coeficiente x
---	---------------

Abreviaturas

Abreviatura	Término
-------------	---------

1. <i>LT</i>	Primera ley de la termodinámica
--------------	---------------------------------

<i>DF</i>	Dimensión fundamental
-----------	-----------------------

<i>RFF</i>	Racimos de fruta fresca
------------	-------------------------

1. Introducción

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena Gram Positiva que causa enfermedades infecciosas. De acuerdo a Kobayashi et al. [?], la bacteria es un colonizador común de la piel y del aparato respiratorio y actúa como un patógeno oportunista que puede causar infecciones nicosomiales (intrahospitalarias) en el sistema respiratorio, en los tejidos blandos y en el torrente sanguíneo [?]. Incluso puede causar infecciones en las juntas de las prótesis formando biopelículas [?].

Desde el descubrimiento de *Staphylococcus aureus* como causante de una infección a una herida en 1881 [?] se ha investigado su presencia en otras infecciones y se han utilizado antibióticos como la penicilina, la meticilina y la vancomicina para controlar estas infecciones [?]. No obstante, *Staphylococcus aureus* ha desarrollado resistencia a algunos de estos antibióticos, de ahí que surja la necesidad de buscar nuevos antibióticos o incluso moléculas con un mecanismo de acción diferente. Una posible familia de moléculas que podrían actuar como alternativas serían los péptidos antimicrobianos.

De acuerdo a Perez-Lopez et al. [?] y Nagendra et al. [?] se ha encontrado que la bacteria modula la composición de su membrana plasmática frente a cambios en el medio. Esta modulación afecta las propiedades biofísicas de su membrana, es decir propiedades fisicoquímicas como la permeabilidad, la estructura y las propiedades mecánicas. El cambio de estas propiedades es un factor que mejora la tolerancia de la bacteria a la acción de péptidos antimicrobiales. Debido a esto, las propiedades biofísicas de la membrana se convierten en objeto de estudio y además son determinantes en la búsqueda de nuevas moléculas dirigidas a la membrana (moléculas blanco) que combatan la bacteria.

Al ser *Staphylococcus aureus*¹ una bacteria Gram positiva, consta de una membrana plasmática que es de interés en términos de la generación de nuevos antibióticos antimicrobiales debido a su rol como mediador del potencial electroquímico. Algunos estudios se han enfocado en cómo la composición de la bicapa lipídica interna afecta sus propiedades biofísicas con base en cambios en la concentración de ciertos lípidos como la cardiolipina [?] y de carotenoides como la estafloxantina [?], [?], [?]. Recientemente, en nuestros grupos, se han estudiado

¹*Staphylococcus aureus* al ser una bacteria Gram positiva está envuelta por una membrana llamada bicapa lipídica y recubierta de una pared externa de péptidoglicano. Las membranas se explican en la subsección 2.1

computacionalmente y experimentalmente propiedades mecánicas como la rigidez de la membrana, la orientación de la estafloxantina, el área por lípido, la difusión y el parámetro de orden del deuterio de diferentes membranas modelo.

En los experimentos realizados por Perez-Lopez et al. [?] y Nagendra et al. [?] se ha mostrado que cambios en el contenido de carotenoides en las membranas, en diferentes etapas de crecimiento *Staphylococcus aureus*, y en membranas modelo compuestas por algunos lípidos mayoritarios de la bacteria, resultan en cambios en la rigidez. Se ha demostrado que este cambio en rigidez afecta la resistencia de la membrana a diferentes péptidos antimicrobiales. Sin embargo, es necesario mirar a nivel molecular la influencia local que tienen los carotenoides en la membrana para entender como la presencia de estas moléculas puede influir en las propiedades mecánicas. Debido a su resolución, los experimentos realizados no permiten vislumbrar diferentes propiedades moleculares que puedan explicar este fenómeno. Alternativamente, las simulaciones de dinámica molecular (MD por sus siglas en inglés) si permiten hacer este acercamiento. La MD se ha convertido en una herramienta excelente para estudiar membranas biológicas [?]. Este método monitorea la evolución espacio-temporal de sistemas biológicos a una escala atómica y así permite determinar información estructural (termo)dinámica y energética de membranas, que complementa y expande las técnicas experimentales. Entre las propiedades que se pueden estudiar en detalle a través de simulaciones están la ubicación relativa de los carotenoides con respecto a los otros lípidos, la orientación y las interacciones que presenta exclusivamente el carotenoide estafloxantina con los lípidos vecinos. Estos detalles moleculares influyen en los cambios de la rigidez de la membrana de *Staphylococcus aureus*.

Para estudiar la ubicación, las interacciones con otros lípidos, el área por lípido, de la estafloxantina, en nuestro grupo se ha realizado un estudio computacional preeliminar mediante las simulaciones por dinámica molecular implementadas en CHARMM [?]. Estas simulaciones requieren introducir ciertos parámetros relacionados con los campos de fuerza y con la geometría de la estafloxantina, los cuales deben ser cuidadosamente seleccionados para que las simulaciones por dinámica molecular reflejen el comportamiento físico de la molécula.

En una aproximación inicial, Meléndez et al. [?] utilizaron el protocolo implementado en CHARMM-GUI [?] para determinar los parámetros de estafloxantina. Algunos de los parámetros obtenidos a través de este procedimiento para la estafloxantina no se han optimizado completamente. El objetivo de la presente propuesta es optimizar los parámetros generados por CHARMM-GUI para la estafloxantina, para que luego puedan ser utilizados en simulaciones MD a la luz del trabajo previo realizado [?]. Adicionalmente, proponemos modelar la estafloxantina utilizando un segundo campo de fuerzas (llamado AMBER). éste modelamiento nos permitirá estudiar la dinámica de bicapas lipídicas en presencia de estafloxantina y confirmar que las observaciones que hagamos sean independientes del potencial de fuerzas

utilizado.

2. Capítulo 1: Propiedades de la Membrana de *Staphylococcus aureus* y Resistencia de la Bacteria

2.1. La membrana Bacteriana y sus compuestos presentes

Según el tipo de membrana que posean las bacterias, éstas pueden clasificarse en dos grandes clases: las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas. Las bacterias Gram positivas poseen una sola bicapa lipídica envuelta en una capa compuesta por unos polímeros de azúcares y aminoácidos llamados peptidoglicano (ver figura 2-1), mientras que las membranas de bacterias Gram negativa poseen dos bicapas lipídicas. Ya que *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva se discutirá principalmente la composición de la membrana de las bacterias Gram Positivas.

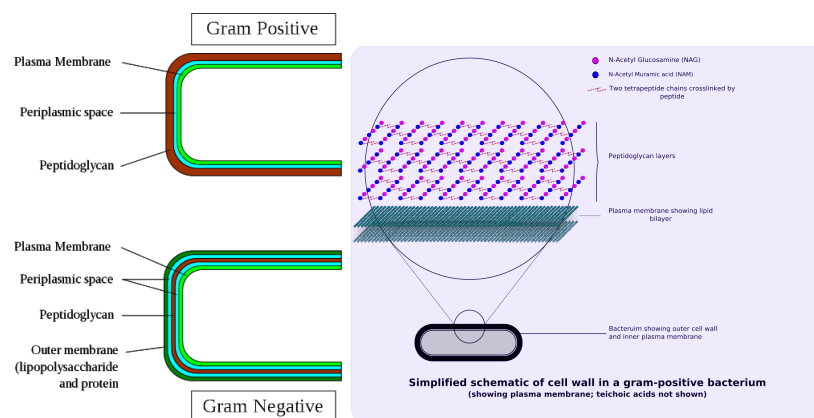


Figura 2-1.: Imagen de la membrana de una bacteria Gram positiva. Tomado de [?].

La bicapa lipídica es una membrana presente en todas las células la cual está compuesta mayoritariamente por lípidos. Los lípidos se acomodan de tal manera que el espesor de la membrana sea de dos lípidos de grosor. En su mayoría, con excepciones como los esteroides, los lípidos están compuestos por una o varias cadenas de ácidos grasos no polares (cadenas hidrocarbonadas con carboxilo) unidas a diferentes sustituyentes polares los cuales pueden

presentar carga o no a pH fisiológico. De acuerdo a los sustituyentes y al tipo de ácidos grasos, cada lípido presenta propiedades fisicoquímicas específicas como la carga total, la polaridad, y el largo que lo distinguen a nivel biofísico con los otros lípidos. Los lípidos forman bicapas debido a la presencia del agua ya que al ser moléculas anfipáticas (combinando motivos polares y apolares) se orientan con respecto a esta. La parte hidrofílica del lípido interactúa con el agua mientras que la parte hidrofóbica no interactúa con esta, lo que induce reorientación y agregación de los lípidos. Estas interacciones hacen que sea más estable encontrar los lípidos inmersos en el agua formando agregados sin mezclarse con el agua. La interacción lateral entre estas moléculas se da a través de fuerzas no covalentes lo que le confiere propiedades de cristal líquido caracterizado por la capacidad de presentar transiciones de fase sólido-líquido y difusión lateral.

La bicapa lipídica de *Staphylococcus aureus* esta compuesta principalmente por fosfatidilgliceroles (PG), cardiolipina (CL), lisofosfoglicandos (LPG) y glicopeptidolípidos (GPL) [?]. En la figura 2-2 se muestra la fórmula estructural del Dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), el cual es un lípido con el fosfatidilglicerol unido a dos miristoil (provenientes del ácido mirístico).

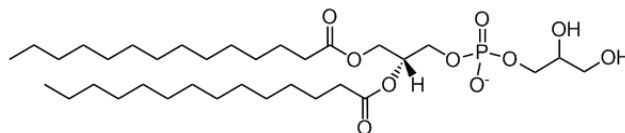


Figura 2-2.: Fórmula estructural del Dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG). Tomada de [?].

Las membranas lipídicas además de tener lípidos contienen otros tipos de biomoléculas como los carotenoides, las proteínas y los glicolípidos que tienen relevancia fisiológica en la célula. Los carotenoides en particular pigmentan las células. En el caso de *Staphylococcus aureus* se ha descubierto que los carotenoides juegan un papel importante en la integridad de la membrana celular y protegen a la bacteria frente a estrés oxidativo [?]. La protección de los carotenoides en la membrana se ve reflejada por un aumento de su rigidez, de forma similar al papel que juega el colesterol en la membrana eucariótica.

Uno de los carotenoides más relevantes en *Staphylococcus aureus* es la estafloxantina la cual le da el nombre a la bacteria ya que le da un color áureo. La estafloxantina es un triterpeno carotenoide que posee dos cadenas hidrocarbonadas. Una de ellas es un ácido graso parecido a otros ácidos grasos de la membrana, caracterizado por ser saturado y con presencia de ramificaciones metílicas. El otro es un ácido graso diaponeurosporenoico, que presenta insaturaciones conjugadas tipo trans y ramificaciones. Las dos cadenas están unidas a una molécula de glucosa mediante enlaces tipo éster, ver figura 2-3. Debido a los enlaces dobles conjugados

de la cadena diaponeurosporenoica, esta es rígida, ya que estos enlaces dificultan rotaciones intramoleculares. Esta rigidez se convierte en un factor que aumenta el empaquetado de la bicapa lipídica, ya que disminuye la distancia entre lípidos vecinos [?].

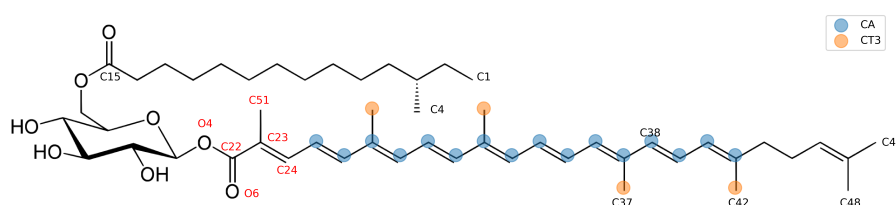


Figura 2-3.: Fórmula estructural de la estafiloxantina. Tomada de [?].

Además, estas insaturaciones conjugadas le dan propiedades antioxidantes que protegen a la bacteria frente al estrés oxidativo del medio, al poder incorporar especies reactivas oxidativas [?].

2.2. Resistencia a tratamientos antibióticos de *Staphylococcus aureus*

Desde el descubrimiento de la penicilina, infecciones de *Staphylococcus aureus* han sido tratadas con este antibiótico. Sin embargo, a mediados del siglo XX *Staphylococcus aureus* comenzó a presentar resistencia a esta familia de antibióticos β -lactámicos, incluida la metilicina. Posteriormente se han aplicado otros antibióticos como la vancomicina, pero también se ha ido generando resistencia a estos otros antibióticos. De la resistencia a antibióticos surge la necesidad de buscar nuevos medicamentos que combatan *S. aureus*.

Un péptido antimicrobiano es un oligómero de aminoácidos, de alrededor de 20 aminoácidos de largo, que hace parte de la respuesta inmune de un amplio espectro de especies, y que

son fáciles de sintetizar en el laboratorio. Los péptidos antimicrobianos se clasifican según la estructura secundaria que tienen: α hélices, β plegados. Los péptidos antimicrobianos interactúan con la membrana de la bacteria produciendo orificios que causan pérdida de contenido, pérdida del potencial electroquímico y muerte celular.

Los péptidos antimicrobiales forman estructuras anfipáticas que inducen su adhesión a la membrana. Al aumentar su concentración superficial, se induce una inserción de estos péptidos, atravesando la membrana y generando poros. Son de interés los péptidos antimicrobiales catiónicos ya que la membrana de *Staphylococcus aureus* es aniónica y estos péptidos tienen una preferencia para adherirse a estas membranas. La formación de poros es un proceso mecánico que requiere la deformación de la membrana para suceder. Al incrementar la rigidez de la membrana, se dificulta la inserción del péptido generando resistencia [?], [?]. Por este motivo se vuelve relevante estudiar como la composición de la membrana, en particular la presencia de stafiloxantina, modula la rigidez de la membrana.

3. Capítulo 2: Simulaciones de Membranas

3.1. Dinámica Molecular y Campos de Fuerza

Un paradigma central en la biología es la existencia de un vínculo entre la secuencia, la estructura, la dinámica y la función de una biomolécula, entiéndase esta última como cualquier molécula con un rol biológico [?]. No únicamente la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleóticos, sino también la estructura y a la dinámica son determinantes en la función de cualquier biomolécula. En el caso de las membranas biológicas, la complejidad aumenta, ya que a las proteínas de membrana, que se encargan de diversas funciones fisiológicas para las células y sus organelos, se suma una rica composición de lípidos. Los lípidos no son entes pasivos que proveen un medio bidimensional para las proteínas de membrana. Por el contrario, ellos afectan tanto las propiedades bioquímicas como las propiedades físicas, como la movilidad y la rigidez de las membranas y así en últimas influir en su función.

Un método poderoso para estudiar la dinámica de biomoléculas, y en particular las membranas biológicas, es el de las simulaciones por dinámica molecular (MD por sus siglas en inglés).

En la dinámica molecular se resuelven numéricamente las ecuaciones de movimiento de Newton para cada una de las partículas que constituyen el sistema, por ejemplo a nivel de átomos (alta resolución espacial) o grupos de átomos (menor resolución espacial), de donde se obtiene la trayectoria en función del tiempo de cada partícula. Una vez obtenida la trayectoria se pueden analizar las propiedades del sistema en estudio, a partir las velocidades, posiciones y energías de interacción de todo el sistema, registradas durante la simulación.

Las ecuaciones de movimiento de Newton para un conjunto de N partículas ($3N$ coordenadas) están restringidas a una función de energía potencial, denominada $V(\vec{r})$, dependiente solo de la distancia entre partículas y afectando las fuerzas y torques de interacción. Estas ecuaciones tienen la forma [?]:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = -\vec{\nabla}_i V(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N) \quad i = 1, 2, \dots, N, \quad (3-1)$$

donde m_i es la masa de la i -ésima partícula, \vec{r}_i es su posición y el gradiente $\vec{\nabla}_i$ se calcula sobre las coordenadas de posición de la i -ésima partícula.

Para resolver las ecuaciones de movimiento es necesario conocer la fuerza aplicada al sistema en cada instante de tiempo, esta se halla a partir de la energía potencial sobre las partículas. En la sección de Campos de fuerza se detalla la naturaleza de estos potenciales.

3.2. Campos de Fuerza

Un campo de fuerza (o *force field* en inglés) es un conjunto de términos empíricos que modelan la interacción entre moléculas. El propósito de estos es poder representar la energía potencial de un conjunto de partículas interactuantes a través de funciones aritméticas simples, que puedan ser evaluadas numéricamente de manera eficiente a través del computador [?]. Algunos de los campos de fuerza más utilizados para biomoléculas son AMBER, CHARMM, GROMOS y OPLS-AA. Todos estos campos de fuerza tienen en común la separación de la energía potencial en dos términos: interacciones enlazantes e interacciones no enlazantes. En forma de ecuación un campo de fuerza típicamente contiene los siguientes términos:

$$V = V_{\text{enlazante}} + V_{\text{no enlazante}} \quad (3-2)$$

Cada uno de estos está a su vez compuesto por los siguientes términos:

- Interacciones enlazantes: V_{cov} , que tienen en cuenta los enlaces covalentes entre átomos; V_{ang} , vibraciones angulares entre triadas de átomos y V_{tor} , movimientos de torsión entre grupos de cuatro átomos conectados por dos enlaces covalentes:

$$V_{cov}(r) = \sum_{\text{enlaces}} k_r (r - r_0)^2 \quad (3-3)$$

$$V_{ang}(r) = \sum_{\text{val}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (3-4)$$

$$V_{tor}(r) = \sum_{\text{dihedros}} \sum_n \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad (3-5)$$

- Interacciones no enlazantes: que se componen de interacciones de corto alcance de Van der Waals, modeladas a través de un potencial de Lennard Jones, V_{LJ} e interacciones electrostáticas descritas por medio del potencial de Coulomb, V_{Coul} .

$$V_{LJ}(r) = \sum_{j=1}^{N+1} \sum_{i=j+1}^N f_{ij} \left\{ \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \right\} \quad (3-6)$$

$$V_{Coul}(r) = \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{i=j+1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_R r_{ij}} \quad (3-7)$$

Las constantes $k_r, k_\theta, f_{ij}, \epsilon_{ij}, r_{0ij}, q_i, q_j$ son las constantes empíricas que definen el campo de fuerzas. Estas constantes se determinan de distintas maneras, por ejemplo a través de cálculos de mecánica cuántica o por optimizaciones para reproducir propiedades termodinámicas de los sistemas en cuestión como energías de solvatación y funciones de partición.

Una de las diferencias entre los programas está en el tratamiento de los ángulos dihedros impropios, es decir de los involucrados en la quiralidad de las moléculas. Por ejemplo, CHARMM Y GROMOS agregan a las interacciones enlazantes un potencial armónico entre los átomos terminales del dihedro (en A-B-C-D serían A y C) denominado de Urey-Bradley con la forma:

$$V_{UB} = \sum_{\text{Urey-Bradley}} K_{UB} (b^{A-C} - b^{A-C,0})^2 \quad (3-8)$$

En AMBER y OPLS-AA esta interacción es incluida en el término del potencial de torsiones.

En cuanto a los parámetros de los términos enlazantes tanto AMBER como CHARMM calculan las constantes de los términos no enlazantes/entre pares de átomos i, j como:

$$\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j} \quad (3-9)$$

$$r_{0ij} = \frac{1}{2} (r_i + r_j) \quad (3-10)$$

3.3. Solución de las ecuaciones de Movimiento

Debido al tamaño de los sistemas biológicos a considerar, en el caso de estafiloxantina embebida en una bicapa con 128 lípidos de DMPG (O DPPG) del orden de 15000 átomos [?], las ecuaciones de movimiento (3-1) deben resolverse numéricamente. Para resolverlas se usan algoritmos como el de Verlet, el de “*leapfrog*”, el de velocidad de Verlet o el de Beeman [?]. En el algoritmo de Verlet se hace una aproximación en series de Taylor a segundo orden de las posiciones hacia adelante $\vec{r}_i(t_{n+1})$ y hacia atrás $\vec{r}_i(t_{n-1})$, ver [?],[?]; que al restarlas da la siguiente solución iterada:

$$t_n = n\Delta t \quad (3-11)$$

$$\vec{r}_{(i,t_{n+1})} = 2\vec{r}_{(i,t_n)} - \vec{r}_{(i,t_{n-1})} + \vec{a}_{(i,t_n)}(\Delta t)^2 \quad (3-12)$$

$$\vec{v}_{(i,t_n)} = \frac{\vec{r}_{(i,t_{n+1})} - \vec{r}_{(i,t_{n-1})}}{2\Delta t} \quad (3-13)$$

Donde la ecuación (3-13) para la velocidad es una expresión de diferencias finitas y se obtuvo mediante el promedio entre $v_{(i,t_n+\Delta t/2)}$ y $v_{(i,t_n-\Delta t/2)}$. Obsérvese que las ecuaciones (3-12) y (3-13) solo dependen de las coordenadas anteriores y no de las velocidades. Luego, solo es necesario usar la ecuación (3-12) para encontrar la trayectoria de la partícula.

En el algoritmo de “leapfrog” se resuelven las ecuaciones de movimiento (3-1) hallando las posiciones de las partículas para los tiempos $t_1, t_2 = t_1 + \Delta t, \dots, t_n = t_1 + n\Delta t$, mientras que las velocidades de las partículas se hallan para los tiempos $t_1 - \Delta t/2, t_2 = t_1 + \Delta t/2, \dots, t_n = t_1 + (n - 1/2)\Delta t$, ver [?]. Este algoritmo tiene la forma:

$$\vec{v}(i, t_{n+1/2}) = \vec{v}(i, t_{n-1/2}) + \vec{a}(i, t_n)\Delta t, \quad (3-14)$$

$$\vec{r}(i, t_{n+1}) = \vec{r}(i, t_{n-1}) + \vec{v}(i, t_{n+1/2})\Delta t. \quad (3-15)$$

Como se han aproximado las ecuaciones para la velocidad y para la aceleración a una línea recta, entonces el valor medio de la velocidad entre los tiempos $t_{n-1/2}$ y $t_{n+1/2}$ es:

$$\vec{r}(i, t_{n+1}) = \vec{r}(i, t_{n-1}) + \vec{v}(i, t_{n+1/2})\Delta t. \quad (3-16)$$

Utilizando las ecuaciones (3-14), (3-15) y (3-16) se obtiene otra forma de escribir el algoritmo de leapfrog:

$$x_{i+1} = x_i + v_i \Delta t + \frac{1}{2} a_i \Delta t^2, \quad (3-17)$$

$$v_{i+1} = v_i + \frac{1}{2}(a_i + a_{i+1}) \Delta t. \quad (3-18)$$

Por otro lado, las condiciones iniciales para resolver los algoritmos pueden ser obtenidas por métodos experimentales como la cristalografía de rayos-X, resonancia magnética nuclear o microscopía electrónica criogénica (más común en proteínas y ácidos nucleicos) o computacionalmente para sistemas de muchas moléculas, realizando un autoensamblaje y minimizando la energía del ensamblaje. Las velocidades iniciales se generan de manera aleatoria a partir de la distribución Maxwell-Boltzmann para la energía cinética a una temperatura T dada.

3.4. Simulaciones en Membranas

3.5. Trabajo Preliminar

3.5.1. Estudio del Rol de Estafiloxantina en la modulación de parámetros estructurales de bicapas lipídicas compuestas por DMPG y DPPG [?]

Para estudiar el rol de la estafiloxantina en bicapas lipídicas compuestas por dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG) y dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG) Meléndez et al. [?] realizaron simulaciones por dinámica molecular para 4 sistemas con las siguientes composiciones: DMPG, DMPG+estafiloxantina, DPPG y DPPG+estafiloxantina. De los resultados obtenidos de estas simulaciones se obtuvieron parámetros que dan cuenta del efecto de la estafiloxantina en los lípidos circundantes a nivel global y local, así como su orientación dentro de

la membrana. Estos parámetros incluyen el parámetro de orden del Deuterio S_{CD} , el espesor de la membrana, el coeficiente lateral de difusión y el área por lípido.

Estas simulaciones revelaron que la estafiloxantina adopta dos orientaciones diferentes respecto a la membrana. La estafiloxantina se encontró mayoritariamente alrededor de los 100° para el sistema DMPG+estafiloxantina. Para el sistema DPPG+estafiloxantina muestreó dos ángulos preferenciales, uno más probable alrededor de 100° y otro un poco menos probable, alrededor de 135° . Los ángulos menores a 120° representan una orientación horizontal de la estafiloxantina y los mayores a 120° una orientación vertical respecto al plano normal de la membrana.

La orientación horizontal es un resultado inesperado, pues esta es una conformación inusual para lípidos. Esto nos llevó a pensar que algunos de los parámetros del campo de fuerzas de la estafiloxantina no estaban bien definidos. En efecto se encontró que los parámetros de torsión, obtenidos a través del servidor CHARMM-GUI para la cadena de enlaces dobles conjugados en la estafiloxantina, no son los más adecuados, debido a la inusual estructura del ácido daponourosponenóico. Como alternativa se utilizaron los parámetros de torsión de grupos benceno, que también presentan insaturaciones conjugadas, para corregir los parámetros de la cadena diaponeurosponenóica. El uso de los parámetros de torsión del benceno permitió que la cadena diaponeurosponenóica adoptara una estructura plana, esperada debido a la presencia de los enlaces dobles conjugados. Sin embargo, una validación rigurosa de estos parámetros no ha sido realizada. Adicionalmente, los ángulos de torsión entre los carbonos próximos al grupo éster (ver figura **2-3**) reportaron una baja puntuación durante la parametrización por CHARMM-GUI, debido a la presencia del grupo carboxilo que induce una redistribución de la densidad electrónica. Es necesario corregir los parámetros tomando esto en cuenta. Adicionalmente, para descartar posibles artefactos introducidos por uno u otro campo de fuerzas en la orientación preferente de estafiloxantina, se hace indispensable parametrizar esta molécula con otro conjunto de parámetros, por ejemplo AMBER.

4. Capítulo 3: Metodología

- 4.1. Reproducción de las simulaciones realizadas por Meléndez et al. [?]**
- 4.2. Realización de las simulaciones por dinámica molecular de estafiloxantina embebida en membranas de DMPG y DPPG colocando los parámetros obtenidos por optimizaciones QM**
- 4.3. Realización de simulaciones de membranas de DMPG y DPPG con una concentración de estafiloxantina al 15 % y estudio de sus propiedades**
- 4.4. Análisis de las Simulaciones**

1. Reproducir las simulaciones por dinámica molecular de estafiloxantina en DMPG y DPPG realizadas por Meléndez et al. [?], utilizando los parámetros no optimizados de la cadena diaponeurosporenoica.

Ensamblaje

Se ensamblarán las bicapas lipídicas DMPG y DPPG mediante la herramienta de ensamblaje de CHARMM-GUI [?], insertando 64 lípidos por monocapa. Adicionalmente, a cada sistema se le agregarán 45 moléculas de agua por lípido, un ion de Na^+ por lípido para contrarrestar la carga negativa y 0.15M de NaCl para reproducir las condiciones fisiológicas de sal.

Dentro de esta membrana se insertará posteriormente una molécula de estafiloxantina. Partiendo del archivo SMILES tomado de [?] y utilizando también CHARMM-GUI se obtendrán la estructura tridimensional y el campo de fuerzas de todo el sistema. Una vez finalizado este procedimiento se cambiarán los términos de los ángulos dihedros de la cadena diaponeurosporenoica por aquellos asociados a anillos aromáticos, los cuales

son mas representativos de un sistema deslocalizado de enlaces dobles conjugados parecido al que presenta la cadena diaponeurosporenoica.

Minimización de la Energía

Para remover solapamiento entre átomos durante el proceso de ensamblaje, que pueda causar inestabilidades durante las simulaciones de dinámica molecular, se realizará una minimización de la energía, por 5000 pasos, usando el método de gradiente decreciente. Esta simulación se realizará con el paquete de simulación principal GRO-MACS [?].

Relajación

Las coordenadas obtenidas a partir de la minimización de la energía se relajarán en 6 simulaciones de dinámica molecular sucesivas, de 25ps cada una, integrando las ecuaciones de movimiento a pasos discretos de tiempo de 1fs. Este valor es 10 veces menor al período asociado a la frecuencias de vibración más alta encontrada para este sistema, correspondiente a fluctuaciones en las posiciones en los átomos de hidrógeno. Durante cada una de las equilibraciones se impondrán restricciones en las posiciones y en los ángulos dihedros de un átomo en la cabeza de cada lípido, con el fin de que estos no se desvíen significativamente de sus posiciones iniciales y que las cadenas lipídicas no adopten orientaciones artificiales. Estas restricciones se irán removiendo gradualmente durante las 6 simulaciones de relajación.

Simulación

Se impondrán condiciones de frontera periódicas en una caja ortorrómbica. El sistema se mantendrá a una presión de 1bar y a temperatura de 323K constantes (condiciones termodinámicas NPT) acoplándolo a una barostato de Parinello-Rahman [?] y aun termostato de Nose-Hoover. Las interacciones no enlazantes de corto alcance se modelarán mediante un potencial de Lennard-Jones (ecuación (3-16)). EL potencial de Coulomb (ecuación 7) se calculará por el medio del método de *Particle Mesh Ewald (PME)*, apropiado para sistemas periódicos [?]. Los enlaces relacionados con los átomos de hidrógeno se restringirán a través de ligaduras utilizando el algoritmo de LINCS [?] y para el caso del agua también el ángulo entre los dos hidrógenos también el ángulo entre los dos hidrógenos empleando el algoritmo SETTLE [?]. Estas restricciones permitirán aumentar el paso de tiempo de integración a 2fs. Para cada uno de los sistemas considerados se realizará una simulación de 1 μ s.

2. **Optimizar los parámetros relacionados con los ángulos dihedros de la cadena diaponeurosporenoica próximos al enlace éster. Posteriormente, realizar simulaciones por dinámica molecular de estafloxantina embebida en membranas de DMPG y DPPG.**

Los ángulos dihedros de la cadena diaponeurosporenoica próximos al enlace éster en la molécula de estafloxantina (señalados en rojo en la figura **2-3**) serán optimizados por medio de los métodos computacionales cuánticos propuestos por Grudzinski et al. [?] y Cerezo et al. [?]. Estos cálculos permitirán describir de manera apropiada el potencial dihedro de este enlace éster, que no es usual en lípidos debido a su cercanía a la cadena diaponeurosporenoica (la cual tiene electrones deslocalizados). Grudzinski et al. [?] utilizaron una herramienta de optimización basada en Gaussian e implementada en el programa de visualización VMD para calibrar los parámetros de los carotenoides Xanthophylls [?]. Adicionalmente, Cerezo et al., usando también Gaussian-09 [?], encontró la energía potencial como función de los ángulos dihedros de la cadena poliénica de un β -caroteno. Una vez obtenidos estos parámetros, se realizarán simulaciones de dinámica molecular de estafloxantina inmersa en bicapas de lípidos DMPG y DPPG, siguiendo el mismo procedimiento indicado en el numeral 1.

3. **Generar un campo de fuerzas para estafloxantina utilizando los parámetros de AMBER y realizar simulaciones por dinámica molecular con este campo de fuerzas. Esto con el fin de demostrar que el comportamiento de la molécula no depende del tipo de potencial utilizado.**

Se obtendrán parámetros para estafloxantina utilizando el campo de fuerza de AMBER. Para esto se utilizarán las herramientas del *Generalized Amber Force Field* (GAFF) [?], teniendo en cuenta que los parámetros obtenidos representan apropiadamente la geometría de la cadena diaponeurosporenoica y el enlace éster. Se realizarán simulaciones de dinámica molecular para estafloxantina insertada en bicapas de DMPG y DPPG, utilizando el procedimiento indicado en el numeral 1. Este nuevo conjunto de simulaciones será comparado con las simulaciones obtenidas con CHARMM (numeral 2) y de esta manera descartar posibles artefactos en la dinámica de estafloxantina causados por el campo de fuerzas.

4. **Examinar el efecto de la concentración de estafloxantina sobre las propiedades de la bicapa lipídica, realizando simulaciones de dinámica molecular con parámetros generados en los numerales 2 y 3, aumentando la concentración de estafloxantina al 15 %.**

En mediciones experimentales se ha observado que las propiedades biofísicas como la constante de doblamiento de la membrana son sensibles a concentraciones de estafloxantina en el orden del 15 % molar [?]. Por lo tanto, en este último objetivo vamos a explorar es el efecto que tiene incluir un número de moléculas de estafloxantina que

refleje esta concentración (aproximadamente 19 moléculas). Para realizar esto, se llevan a cabo simulaciones utilizando también membranas modelo con DPPG Y DMPG, con un 15 % molar de estos lípidos reemplazados por estafloxantina. Estas simulaciones también se realizarán para los dos campos de fuerza CHARMM y AMBER. EL protocolo de simulación será idéntico al del numeral 1.

Análisis de las Simulaciones

De las trayectorias generadas en las simulaciones se extraerán distintos observables que nos permitan analizar cuantitativamente el comportamiento de estafloxantina y su efecto en la bicapa de lípidos circundantes. Los siguientes observables serán por consiguiente calculados, tanto en función del tiempo como en promedio durante toda la simulación:

1. **Orientación de la cadena diaponeurosporenoica:** El ángulo formado por la cadena diaponeurosporenoica en la estafloxantina con respecto a la membrana será monitoreado durante las simulaciones para así poder determinar su orientación (u orientaciones) de preferencia.
2. **área por lípido:** Como una medida del grado de compactamiento de la bicapa se hallará el área por lípido global mediante la fórmula:

$$APL = \frac{xy}{N/2} \quad (4-1)$$

donde xy es el tamaño lateral de la caja de simulación y N es el número de lípidos. Adicionalmente, se hará una medición local de area descrita en las siguientes secciones.

3. **Espesor de la membrana:** El espesor de la membrana se hallará monitoreando la densidad electrónica de los lípidos como función de la coordenada normal al plano de la membrana. De esta densidad electrónica se hallan los dos máximos que correspondan a los grupos fosfato y se calcula la distancia entre ellos.
4. **Parámetro de orden del deuterio:** El parámetro de orden del deuterio se calculará como una medida de la orientación promedio de los lípidos DMPG y DPPG. Este parámetro se define de la siguiente manera: [?]

$$S_{CD} = \frac{2}{3}S_{xx} + \frac{1}{3}S_{yy}, \quad (4-2)$$

donde S_{xx} y S_{yy} se definen de la siguiente manera:

$$S_{xx} = \frac{1}{2}\langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle, \quad (4-3)$$

$$S_{yy} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \alpha - 1 \rangle. \quad (4-4)$$

θ es el ángulo medido respecto al vector normal a la membrana y el vector normal al plano definido por los carbonos C_{i-1} , C_i y C_{i+1} ; α es el ángulo medido respecto al vector normal a la membrana y un vector que pertenece al plano definido por los carbonos C_{i-1} , C_i y C_{i+1} pero perpendicular al vector que conecta C_{i-1} y C_{i+1} .

5. **Coefficiente de difusión:** Adicional a todas estas medidas estructurales, se analizará la difusión de los distintos componentes de la membrana monitoreando el desplazamiento lateral cuadrático promedio $\langle \Delta x^2 \rangle$. El coeficiente de difusión, D , se hallará mediante una regresión lineal de este desplazamiento en función del tiempo, gracias a la relación de Einstein:

$$\langle \Delta x^2 \rangle = 4Dt \quad (4-5)$$

Todas estas cantidades se calcularán de manera global para toda la bicapa de lípidos. También se calcularán el area por lípido de manera local a diferentes posiciones alrededor de la molécula de estafiloxantina usando un algoritmo basado en teselaciones de Voronoy, implementado dentro de la herramienta glomepro [?].

El estudiante Cabrera realizará todas las simulaciones, análisis de resultados y escritura de los documentos correspondientes supervisado por el profesor Chad Leidy (física) y el Dr. Camilo Aponte Santamaría (MPTG-CBP). él tendrá un espacio de trabajo en la oficina del MPTG-CBP y utilizará el computador y el acceso al clúster proporcionados por el Departamento de Física.

5. Capítulo ...

Se deben incluir tantos capítulos como se requieran; sin embargo, se recomienda que la tesis o trabajo de investigación tenga un mínimo 3 capítulos y máximo de 6 capítulos (incluyendo las conclusiones).

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones

Las conclusiones constituyen un capítulo independiente y presentan, en forma lógica, los resultados de la tesis o trabajo de investigación. Las conclusiones deben ser la respuesta a los objetivos o propósitos planteados. Se deben titular con la palabra conclusiones en el mismo formato de los títulos de los capítulos anteriores (Títulos primer nivel), precedida por el numeral correspondiente (según la presente plantilla).

6.2. Recomendaciones

Se presentan como una serie de aspectos que se podrían realizar en un futuro para emprender investigaciones similares o fortalecer la investigación realizada. Deben contemplar las perspectivas de la investigación, las cuales son sugerencias, proyecciones o alternativas que se presentan para modificar, cambiar o incidir sobre una situación específica o una problemática encontrada. Pueden presentarse como un texto con características argumentativas, resultado de una reflexión acerca de la tesis o trabajo de investigación.

A. Anexo: Nombrar el anexo A de acuerdo con su contenido

Los Anexos son documentos o elementos que complementan el cuerpo de la tesis o trabajo de investigación y que se relacionan, directa o indirectamente, con la investigación, tales como acetatos, cd, normas, etc.

B. Anexo: Nombrar el anexo B de acuerdo con su contenido

A final del documento es opcional incluir índices o glosarios. Éstos son listas detalladas y especializadas de los términos, nombres, autores, temas, etc., que aparecen en el mismo. Sirven para facilitar su localización en el texto. Los índices pueden ser alfabéticos, cronológicos, numéricos, analíticos, entre otros. Luego de cada palabra, término, etc., se pone coma y el número de la página donde aparece esta información.

C. Anexo: Nombrar el anexo C de acuerdo con su contenido

MANEJO DE LA BIBLIOGRAFÍA: la bibliografía es la relación de las fuentes documentales consultadas por el investigador para sustentar sus trabajos. Su inclusión es obligatoria en todo trabajo de investigación. Cada referencia bibliográfica se inicia contra el margen izquierdo.

La NTC 5613 establece los requisitos para la presentación de referencias bibliográficas citas y notas de pie de página. Sin embargo, se tiene la libertad de usar cualquier norma bibliográfica de acuerdo con lo acostumbrado por cada disciplina del conocimiento. En esta medida es necesario que la norma seleccionada se aplique con rigurosidad.

Es necesario tener en cuenta que la norma ISO 690:1987 (en España, UNE 50-104-94) es el marco internacional que da las pautas mínimas para las citas bibliográficas de documentos impresos y publicados. A continuación se lista algunas instituciones que brindan parámetros para el manejo de las referencias bibliográficas:

Institución	Disciplina de aplicación
Modern Language Association (MLA)	Literatura, artes y humanidades
American Psychological Association (APA)	Ambito de la salud (psicología, medicina) y en general en todas las ciencias sociales
Universidad de Chicago/Turabian	Periodismo, historia y humanidades.
AMA (Asociación Médica de los Estados Unidos)	Ambito de la salud (psicología, medicina)
Vancouver	Todas las disciplinas
Council of Science Editors (CSE)	En la actualidad abarca diversas ciencias
National Library of Medicine (NLM) (Biblioteca Nacional de Medicina)	En el ámbito médico y, por extensión, en ciencias.
Harvard System of Referencing Guide	Todas las disciplinas
JabRef y KBibTeX	Todas las disciplinas

Para incluir las referencias dentro del texto y realizar lista de la bibliografía en la respectiva sección, puede utilizar las herramientas que Latex suministra o, revisar el instructivo desarrollado por el Sistema de Bibliotecas de la Universidad Nacional de Colombia¹, disponible en la sección "Servicios", opción "Trámites enlace .^Entrega de tesis".

¹Ver: www.sinab.unal.edu.co