



# Universidad de Sonora

División de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Investigación en Física

## Simulación de dominios de biomembranas

Tesis presentada al

**Posgrado en Ciencias (Física)**

Como requisito parcial para la obtención del grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA)**

Presentada por

**Nahuel Armando Moreno Pérez**

Directora de tesis

**Dra. Gloria Arlette Méndez Maldonado**

Co-director

**Efraín Urrutia Bañuelos**

Hermosillo, Sonora

Noviembre 2018

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess



# Agradecimientos

Comienzo agradeciendo a la Dra. Gloria Arlette Méndez Maldonado por la paciencia y el tiempo que dedico para poder realizar esta tesis. También quiero agradecer a mi madre María Emilia Pérez Álvarez, a mi padre Armando Moreno Soto y a mis hermanas, Jy'asü, Mariana, Guillermina y Celeste que me han motivado y apoyado en diferentes momentos de mi vida. Por otro lado al profesor Carlos Lizarraga y Antonio Jáuregui que me motivaron compartiendome su conocimiento sin miramientos, algo de lo cual siempre estaré muy agradecido. También quisiera agradecerle a Efraín Urrutia Bañuelos quien me ha apoyado en incontables ocasiones y que sin duda fue de gran ayuda para la realización de esta tesis.

Quisiera también agradecer a CONACYT por su apoyo económico sin el cual la elaboración de esa tesis no hubiera sido posible. Al Área de Cómputo de Alto Rendimiento (ACARUS) ya que sin ellos no hubieramos podido obtener resultados de manera más eficiente y al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México por los recursos computacionales, el apoyo y la asistencia técnica a través del convenio número 201801059N.

Por último quisiera agradecer al posgrado en ciencias (Física) del Departamento de Investigación en Física de la Universidad de Sonora por los diversos apoyos a lo largo de este par de años en el posgrado, los cuales me apoyaron para viajar a distintos congresos y seguir aprendiendo.



# Índice general

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Antecedentes</b>                                      | <b>1</b>  |
| <b>2. Metodología</b>                                       | <b>7</b>  |
| 2.1. Dinámica Molecular . . . . .                           | 7         |
| 2.2. Campos de Fuerza, Escala Temporal y Espacial . . . . . | 10        |
| 2.3. Aspectos Técnicos de la Simulación . . . . .           | 14        |
| 2.4. Herramientas para análisis . . . . .                   | 18        |
| <b>3. Resultados y Discusión</b>                            | <b>22</b> |
| 3.1. Representación de Todos los Átomos . . . . .           | 22        |
| 3.1.1. Función de Distribución Radial . . . . .             | 23        |
| 3.1.2. Desplazamiento Cuadrático Medio . . . . .            | 28        |
| 3.1.3. Puentes de Hidrógeno . . . . .                       | 30        |
| 3.1.4. Perfil de Densidad . . . . .                         | 34        |
| 3.1.5. Parámetros de Orden . . . . .                        | 36        |
| 3.1.6. Área por Lípido . . . . .                            | 37        |
| 3.1.7. Espesor de Membrana . . . . .                        | 39        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2. Representación de Grano Grueso . . . . .    | 40        |
| 3.2.1. Función de Distribución Radial . . . . .  | 41        |
| 3.2.2. Desplazamiento Cuadrático Medio . . . . . | 43        |
| 3.2.3. Perfil de Densidad . . . . .              | 45        |
| 3.2.4. Área por Lípido . . . . .                 | 48        |
| 3.2.5. Espesor de Membrana . . . . .             | 50        |
| <br>   |           |
| <b>4. Conclusiones</b>                           | <b>52</b> |
| <br>   |           |
| <b>Bibliografía</b>                              | <b>53</b> |

# Índice de cuadros

|   |    |
|---|----|
| 3.1. Número de Puentes de Hidrógeno de SM con CHO . . . . .   | 31 |
| 3.2. Número de Puentes de Hidrógeno de POPC con CHO . . . . . | 31 |
| 3.3. Número de Puentes de Hidrógeno de SM con CHO . . . . .   | 33 |
| 3.4. Número de Puentes de Hidrógeno de POPC con CHO . . . . . | 33 |
| 3.5. Área Promedio . . . . .                                  | 37 |
| 3.6. Área Promedio . . . . .                                  | 38 |
| 3.7. Espesor Promedio de Membrana . . . . .                   | 39 |
| 3.8. Área Promedio . . . . .                                  | 48 |
| 3.9. Espesor Promedio de Membrana . . . . .                   | 50 |





# Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| 2.1. Membrana plasmática vista desde arriba. Verde es POPC, Rojo SM y Azul CHO.  | 10 |
| 2.2. Representación pictórica de SM a la izquierda en escala de todos los átomos y a la derecha en grano grueso . . . . .  | 14 |
| 2.3. Representación bidimensional de condiciones periódicas en la frontera . . . . .   | 15 |
| 2.4. Representación pictórica del concepto de sumas de Ewald. . . . .  | 17 |
| 2.5. Membrana Plasmática a 214ns. La flecha azul representa el eje z, la roja el eje x y la verde el eje y. SM representado en rojo, POPC en negro y CHO en amarillo.              | 19 |
| 3.1. Los tres lípidos de nuestra membrana en los que se resaltan los átomos que se seleccionaron para ser el centro del análisis de las funciones de distribución radial.          | 22 |
| 3.2. Función de distribución radial considerando el átomo NF como el de referencia para medir la distribución de las distancias a cuatro distintos tiempos de simulación.          | 23 |
| 3.3. Función de distribución radial considerando el átomo OF como el de referencia para medir la distribución de las distancias a cuatro distintos tiempos de simulación.          | 25 |
| 3.4. Función de distribución radial considerando los átomos NF y OF como la referencia para medir la distribución de las distancias a dos distintos tiempos de simulación. . . . . | 26 |

|  |    |
|--|----|
| 3.5. Función de distribución radial considerando los átomos NF y OF como la referencia para medir la distribución de las distancias a dos distintos tiempos de simulación. . . . . | 27 |
| 3.6. Desplazamiento Cuadrático Medio de SM, POPC y CHO a distintos tiempos de simulación . . . . .   | 28 |
| 3.7. Desplazamiento Cuadrático Medio de SM, POPC y CHO a distintos tiempos de simulación . . . . .   | 29 |
| 3.8. Número de Puentes de Hidrógeno a distintos intervalos de tiempo de simulación. La curva negra es número de puentes de SM con CHO y la roja de POPC con CHO . . . . .          | 30 |
| 3.9. Número de Puentes de Hidrógeno a distintos intervalos de tiempo de simulación. La curva negra es número de puentes de SM con CHO y la roja de POPC con CHO. . . . .           | 31 |
| 3.10. Número de Puentes de Hidrógeno a distintos intervalos de tiempo de simulación. La curva negra es número de puentes de SM con CHO y la roja de POPC con CHO. . . . .          | 32 |
| 3.11. Número de Puentes de Hidrógeno a distintos intervalos de tiempo de simulación. La curva negra es número de puentes de SM con CHO y la roja de POPC con CHO. . . . .          | 33 |
| 3.12. Perfil de Densidad a lo largo del eje z comparando dos tiempos de simulación. . . . .  | 34 |
| 3.13. Perfil de Densidad a lo largo del eje z comparando dos tiempos de simulación . . . . .   | 35 |
| 3.14. Parámetros de orden de los átomos de los carbonos en las colas de SM. . . . .  | 36 |
| 3.15. Diagramas de Voronoi representando el área por lípido a distintos tiempos de simulación. . . . .   | 37 |
| 3.16. Diagrama de Voronoi y Visualización 3D del espesor de la membrana . . . . .  | 39 |

|  |    |
|--|----|
| 3.17. Dos de los lípidos de nuestra membrana en los que se resaltan los átomos que se seleccionaron para ser el centro del análisis de las funciones de distribución radial. | 40 |
| 3.18. Función de Distribución Radial a dos tiempos de simulación diferentes . . . . .  | 41 |
| 3.19. Función de Distribución Radial a dos tiempos de simulación diferentes, considerando la pseudo molécula AM1 como punto de referencia para el análisis. . . . .          | 42 |
| 3.20. Desplazamiento Cuadrático Medio de SM, POPC y CHO a distintos tiempos de simulación. . . . .   | 43 |
| 3.21. Desplazamiento Cuadrático Medio de SM, POPC y CHO a distintos tiempos de simulación. . . . .   | 44 |
| 3.22. Perfil de Densidad a lo largo del eje z. . . . .   | 45 |
| 3.23. Perfil de Densidad a lo largo del eje z. . . . .   | 47 |
| 3.24. Diagramas de Voronoi representando el área por lípido a distintos tiempos de simulación. . . . .   | 48 |
| 3.25. Diagrama de Voronoi y Visualización 3D del espesor de la membrana. . . . .   | 50 |



# Capítulo 1

## Antecedentes

Hablar de biología a nivel molecular ha resultado un reto desde que se tuvo conciencia de las implicaciones de los diversos fenómenos que se llevan a cabo a estas escalas espaciales y temporales.

Para entender estos procesos a nivel microscópico se necesitan un conjunto de conocimientos de biología, química, física y programación, ésta última tiene que ver con el análisis que se puede realizar con dinámica molecular (DM). Usando la evolución en el tiempo de las configuraciones espaciales de un sistema biológico para hacer inferencias de las propiedades del sistema, ya sean a nivel molecular o propiedades de bulto. La DM ha demostrado ser una herramienta muy útil para estudiar distintos procesos que ocurren a distintas escalas espacio-temporales, como las baterías de litio que suelen usarse en celulares y que existe un interés en mejorarlas, también ha sido utilizada para estudiar sistemas biológicos y el diseño de fármacos por mencionar algunos.

Para nuestro trabajo enfocaremos nuestra atención en la membrana plasmática (MP) la cual está compuesta por una serie de lípidos alineados de manera tal que sus cabezas hidrofílicas y sus colas hidrofóbicas actúan como manto protector de la célula. Este acomodo específico es conocido comúnmente como bicapa. La bicapa consiste en la membrana apical y una basal las que difieren en el tipo de lípidos que las componen. Es por esta razón que el comportamiento de cada una de ellas será diferente a nivel molecular.

La MP es un sistema dinámico en el que los agentes interactuantes pueden moverse dentro de la bicapa y en el que las interacciones suelen ser de corto alcance, por lo que, la teoría de líquidos es de gran utilidad para modelar los procesos que se llevan a cabo dentro de este entorno.

La tendencia a una distribución azarosa debido a las colisiones, producto de la temperatura y además las diferencias de tamaño entre los distintos lípidos; lo que propicia una incompatibilidad con los componentes aledaños, ya que la parte hidrofílica podría entrar en contacto con la hidrofóbica de un componente a su alrededor lo cual propiciaría que se separaren, todos estos son factores que afectan la dinámica del sistema y deben ser tomados en cuenta al modelarlo.

Debido a la multitud de participantes y a las diversas interacciones, la MP no es uniforme a nivel molecular. Existen regiones con distintas composiciones, por lo que puede considerarse un sistema multifásico [27]. El sistema no se encuentra en equilibrio, los agentes involucrados están en movimiento, debido a lo cual, ciertos participantes podrían aglomerarse en un área por un proceso meramente cinético, sin embargo estas mismas colisiones obligarían a que este proceso de segregación se difundiera rápidamente [24].

El modelo de mosaico fluido, llamado así por la heterogeneidad en la distribución de los componentes en la membrana, logra explicar ciertas propiedades estructurales de la célula, observadas de manera experimental, como el hecho de que cada capa de la membrana plasmática está constituida por lípidos con distintas características.

En todo modelo deben hacerse simplificaciones por lo que suelen dividirse a los lípidos en dos grandes grupos; los que tienen alta temperatura de fusión o saturados y los de baja temperatura de fusión o insaturados. Esta generalización se toma en cuenta ya que el modelo logra replicar de manera satisfactorias distintas propiedades de los sistemas reales [3],[7], [8], [10], [20].

Se sabe que los componentes de la bicapa están en constante movimiento, por esto se tiene que diversos factores pueden favorecer o truncar la fluidez del sistema. Son tres los factores que, hasta el momento se cree, cambian la fluidez del sistema. Uno es la temperatura, cuando esta baja los lípidos se acercan por lo que la membrana tiene baja fluidez y si la temperatura es alta la membrana no mantendría su forma debido al movimiento desordenado de los lípidos

participantes.

Otro de los factores que modifican la fluidez de la bicapa lipídica de la membrana son las colas de los lípidos, en el caso de este estudio en particular se considerara un tipo específico de lípido; los fosfolípidos. Éstos pueden tener cadenas saturadas de hidrocarburos o insaturadas [10]. Las primeras, tienen enlaces simples entre sus carbonos por lo que estas cadenas son casi paralelas entre si, permitiendo un mejor empaquetamiento de los fosfolípidos y por tanto, una menor fluidez en esa zona, caso contrario es el de los insaturadas, en el que los carbonos tienen enlaces dobles donde las colas no son rectas y no permiten que las moléculas se acerquen, propiciando una mayor fluidez, también es por esta razón que se requieren temperaturas mucho más bajas para lograr congelarlas. Por último el colesterol se encuentran distribuido de manera aleatoria en la MP y se cree, tienen la capacidad de evitar que los fosfolípidos se acerquen demasiado a bajas temperaturas o se alejen a altas, por lo cual es considerado un regulador de la fluidez sin el cual, la membrana no podría existir.

Los tres factores mencionados se conjugan para moderar la dinámica del sistema y en ciertos casos permitir la segregación de fosfolípidos saturados y colesterol para formar dominios. Sin embargo para que estos mantengan su forma el tiempo suficiente para contribuir a la organización estructural de la bicapa se requiere que alguna interacción termodinámica estabilice el proceso cinético, evitando que los dominios se difundan antes de cumplir con su cometido. [24]

Podemos relacionar la fluidez con la fase, en el sentido en que un gas tiene mayor fluidez que un líquido. En el caso de la bicapa propiamente no se puede hablar de fases debido a que una fase es una magnitud macroscópica, sin embargo es común usar esta nomenclatura en la literatura, por lo cual usaremos fase y fluidez como palabras intercambiables.

Para el presente análisis se tiene una mezcla ternaria de fosfolípidos saturados, insaturados y colesterol. Dicha mezcla se ha reportado que produce dos fases líquidas [3], [10]. Una es denominada de líquido desordenado ( $L_d$ ) y la otra de líquido ordenado ( $L_o$ ). La primera está conformada principalmente por fosfolípidos insaturados y cumple con las características convencionales de un líquido ya que las colas no permite que se acerquen demasiado y existen interacciones de corto alcance. La segunda tiene una combinación interesante de propiedades,



con un alto grado de orden propio de un cristal y a la vez un alto índice de difusión traslacional, propia de los líquidos. Esta fase inusual parece deberse a que los fosfolípidos protegen al colesterol del entorno acuoso, debido al efecto condensador del último sobre los primeros, en lo que se conoce como el modelo del paraguas[21], ya que los lípidos se empaquetan por acción del colesterol y sus cabezas se ensanchan para protegerlo.

Se sabe que a concentraciones de colesterol menores a 30 % molar se tiene la fase  $L_\alpha$  y a concentraciones mayores a esta se observa la fase de  $L_o$  [16]. Se acostumbra modelar la MP como una mezcla ternaria conteniendo a los dos tipos de fosfolípidos mencionados y al colesterol, debido a que esta mezcla es capaz de replicar las características principales del sistema, incluyendo la inmiscibilidad entre la fase de líquido ordenado y desordenado [7], hecho que se ha logrado captar de manera experimental con microscopios de fluorescencia [10].

Aunque la MP tiene miles de componentes, ésta se separa en dos fases líquidas exclusivamente. En el sentido termodinámico es posible que se formen una multitud de fases, ya que si los grados de libertad del sistema son equiparables a los componentes en la misma, en teoría, la membrana podría producir cientos de fases líquidas distintas. La realidad es que, mantener estas dos fases en coexistencia requiere un delicado balance, esto se debe a que los líquidos se definen por interacciones intermoleculares débiles para mantener la fluidez, y la cualidad que los obliga a separarse conlleva un costo entrópico, se cree que es el colesterol quien mantiene este delicado balance [17] y que este balance tiene cierta relación con la dos caras que conforman al colesterol, una suave y otra rugosa, las cuales se orientan de manera tal, que actúan como un surfactante bidimensional y de esta manera logra reducir la tensión lineal [7]. Es este equilibrio entre las dos fases lo que en el modelo representa al fenómeno de las balsas lipídicas (BL) [9], [24]. Fenómeno que se cree juega un rol fundamental en la transducción de señales, como plataforma para el acceso de virus y para permitir la movilidad de ciertos componentes dentro de la MP y así llegar a donde pueden ser aprovechados.

Tratando de entender los principios básicos en los que se sustentan las propiedades estructurales y biofísicas intrínsecas a la MP, con particular énfasis en los mecanismos dinámicos a nivel molecular que determinan el establecimiento y desestabilización de las balsas lipídicas.

---

Utilizaremos las ideas mencionadas para describir la formación de estos dominios, como por ejemplo, el hecho de que a mayores concentraciones de colesterol la MP se ensanche generando una incompatibilidad entre los agentes aledaños, aunado a la afinidad del colesterol con ciertos fosfolípidos y la tendencia del sistema a difundirse, lo que llevará a la segregación de ciertos componentes, separandose estas dos fases para favorecer procesos de transporte en la membrana, transducción de señales, entrada de patógenos, entre otros [16].

El problema que existe a la fecha es que las balsas han resultado ser elusivas debido a que su tamaño es menor a la resolución de un microscopio de luz, sin embargo diversos metodos de rastreo se han implementado para hacer mediciones de manera indirecta, como son los métodos de rastreo para detectar el comportamiento difusivo de ciertas moléculas de interés.

Estos microdominios dependientes del colesterol han sido observados usando el método experimental seguimiento de una sola partícula (SPT) por sus siglas en ingles, combinado con mediciones locales de arrastre viscoso y usando componentes fluorescentes [9]. Es decir, hay una limitación experimental para determinar, de manera inequívoca, que las BL están ahí, por esta razón la simulación con DM podría dar una perspectiva diferente para seguir estudiando estos procesos.

Usando DM se pueden analizar los datos de diversas maneras para que con este conjunto de medidas se llegue a conclusiones a cerca de las propiedades de la MP y la formación de las dos fases antes mencionadas. Ya sea haciendo un análisis de todos los átomos que permita hacer inferencias con respecto a la formación de puentes de hidrógeno o con el análisis de grano grueso el cual nos podrá ofrecer una representación más veloz de ciertos factores estructurales del sistema.

En el capítulo 1 se encuentran una serie de antecedentes, definiciones que seran utilizadas en el texto, se describe también de manera somera el sistema a estudiar con ciertas especificaciones para entender las cualidades del sistema y el porque estudiarlo. En el capítulo 2 se presenta la metodología, incluyendo la descripción del sistema, los aspectos técnicos, herramientas para el análisis, el campo de fuerza y las escalas utilizadas para estudiar el problema. En el capítulo 3 se verán los resultados, donde se presentan las gráficas de los diversos análisis de estructura,

dinámica del sistema y por último en el capítulo 4 se presentan las conclusiones.

# Capítulo 2

## Metodología

### 2.1. Dinámica Molecular

Actualmente la velocidad de cálculo y procesamiento de las computadoras han permitido el desarrollo de diferentes técnicas y algoritmos de simulación, los cuales han sido ampliamente utilizados para estudiar sistemas biológicos y los diversos procesos que ocurren en ellos a nivel molecular.

Este proyecto se llevará a cabo utilizando simulaciones de dinámica molecular, por lo que es necesario notar que el campo de fuerza juega un rol primordial en la descripción de la interacción de los participantes del sistema. La precisión para reproducir propiedades experimentales depende, en su mayoría, de que los parámetros de dicho campo sean adecuados para describir el fenómeno a estudiar. Se utilizará el paquete GROMACS, diseñado principalmente para la simulación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, con el cual se ha logrado emular datos experimentales.

Para analizar el sistema que nos compete haremos uso de simulación con dinámica molecular (DM). En DM se resuelven de manera numérica las ecuaciones de movimiento de Newton para un conjunto  $N$  de átomos con coordenadas cartesianas  $\mathbf{r}_i$

En general se pretende resolver la siguiente ecuación diferencial:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} = -\nabla_i \mathbf{V}(\mathbf{r}_i) \quad (2.1)$$

donde  $i$  se refiere a la  $i$ -ésima partícula,  $V$  es un potencial que depende de las posiciones y el operador  $\nabla_i$  indica derivada con respecto a  $\mathbf{r}_i$ . Para resolver la ecuación diferencial se hace uso del método de diferencias finitas que ayuda a hacer una aproximación de la derivada, por lo que, al conocer las posiciones a un tiempo  $t$  se quiere saber como evoluciona el sistema a un tiempo  $t + \delta t$  donde el intervalo  $\delta t$  debe ser al menos un orden de magnitud menor que las escalas de tiempo en las que se lleva a cabo el proceso físico, de no ser así no habrá posibilidad de observar el fenómeno a estudiar.

Al resolver las ecuaciones de movimiento con un potencial continuo y aditivo en pares e intervalos de tiempo discretos, se tendrá la capacidad de conocer las posiciones a cualquier tiempo, tal que se pueda entender la dinámica del sistema. Existen varios algoritmos que usan el método de diferencias finitas pero una de las características primordiales es que las posiciones de las partículas varíen de manera continua con respecto al tiempo, tal que se pueda hacer una expansión en serie de Taylor alrededor del tiempo  $t$  para obtener un estimado de las posiciones al tiempo  $t + \delta t$ .

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \frac{d\mathbf{r}(t)}{dt} \delta t + \frac{d^2 \mathbf{r}(t)}{dt^2} \frac{\delta t^2}{2} + \mathfrak{O}(\delta t^3) \quad (2.2)$$

$$= \mathbf{r}(t) + \mathbf{v}(t) \delta t + \frac{\mathbf{f}(t)}{m} \frac{\delta t^2}{2} + \mathfrak{O}(\delta t^3) \quad (2.3)$$

Al dividir en intervalos  $\delta t$  apropiados podemos hacer el cálculo de fuerzas al tiempo  $t$  de cada una de las partículas con las demás y usando la segunda ley de Newton podemos obtener las aceleraciones que se usarán junto con las posiciones y velocidades al tiempo  $t$  para obtener las posiciones al tiempo  $t + \delta t$ , repitiendo el proceso lo que sea necesario para finalmente calcular las propiedades de interés del sistema.

Para conocer la exactitud de nuestra solución numérica a partir de las ecuaciones de Newton se sabe que la energía debe conservarse, por lo que si la suma de las energía cinética y potencial permanece constante, sería un buen indicador de la veracidad de nuestro cálculo.

Todo esto es pensando en el ensamble microcanónico donde no entran en consideración procesos químicos o termodinámicos, todo es meramente mecánico, sin embargo en la vida real sabemos que debemos lidiar con ciertas características intrínsecas al sistema como por ejemplo, la temperatura.

## **Nuestro Sistema**

Para poder analizar con DM sistemas biológicos debemos considerar un ensamble que nos ayude a replicar datos experimentales por lo que el ensamble NPT es idóneo, en este caso la presión, temperatura y número de moléculas deben mantenerse constantes, pero es claro para nosotros que en las ecuaciones de movimiento de Newton no existen parámetros que incluyan a la temperatura ni a la presión, por lo que las ecuaciones deben ser modificadas para incluirlos.

En nuestro estudio para mantener la presión se usa el barostato Parrinello-Rahman y el termostato Nose-Hoover que consisten en extender la lagrangiana del sistema, es decir, se usan grados de libertad adicionales a los de las partículas, modificándose las ecuaciones de movimiento del sistema. En el caso del termostato la idea del método es actuar como un reservorio el cual ayudará a controlar la temperatura y hablando del barostato el volumen debe ser considerado como una variable dinámica adicional tal que puede fluctuar para así, mantener la presión constante.

El sistema que se estudiará con dinámica molecular es una membrana representada por una mezcla ternaria de 1-palmitoil, 2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC):Esfingomielina (SM):Colesterol [35:30:35 fracción Mol %]. La mezcla está compuesta por 1143 componentes en cada una de las capas con 34241 moléculas de agua y 145 mM de cloruro de sodio a 310.15 K.

Donde POPC es el fosfolípido insaturado y SM el saturado, se usa esta combinación de elementos por que es la que se ha reportado [7] que en una mezcla ternaria junto al colesterol, reproduce la fase de líquido ordenado y líquido desordenado, que en coexistencia representa el análogo de

las balsas lipídicas en el modelo. Observando las propiedades estructurales de la membrana y otros análisis a nivel molecular, se espera determinar la veracidad de la existencia de cúmulos o conglomerados de SM-CHO para formar  $L_o$  y POPC consigo mismo para la fase  $L_\alpha$ .

Las simulaciones moleculares en sistemas de interés biológico pueden dar una idea respecto a reacciones químicas que pueden ser difíciles de observar experimentalmente, debido a su tamaño o a la escala temporal en que se desarrollan.

También se realizaron una serie de análisis considerando el modelo de grano grueso para los mismos tres componentes que en el caso anterior, la misma cantidad, la misma proporción, la misma temperatura y utilizando el mismo ensamble, esperando que la velocidad de cálculo para este tipo de sistemas ayudara a dilucidar el momento de formación de las balsas lipídicas.

Considerando el modelo de grano grueso y el mismo sistema pero ahora con 1600 fosfolípidos por el artículo [12] en el que se afirma existe una correlación entre la formación de dominios y el número de participantes al estudiar estos sistemas en grano grueso.

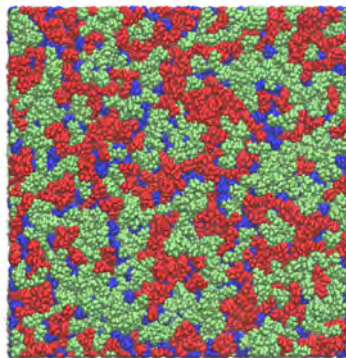


Figura 2.1: Membrana plasmática vista desde arriba. Verde es POPC, Rojo SM y Azul CHO.

## 2.2. Campos de Fuerza, Escala Temporal y Espacial

De manera general un campo de fuerza es una expresión matemática que describe la dependencia de la energía con las coordenadas de las partículas en el sistema, existen en general tres suposiciones para un campo de fuerza. Primero: los grados de libertad electrónicos no son considerados acorde a la aproximación de Oppenheimer, por lo que las coordenadas del núcleo

son las que se usan en la simulación. Segundo: el potencial es aditivo, lo que quiere decir que las contribuciones a la energía pueden representarse como una suma de distintos términos y por último: transferibilidad que implica que el potencial puede replicar los valores esperados sin importar el número de partículas. Por lo tanto es claro que existen limitantes dependiendo del sistema que se desee estudiar.

Cuando se quieren estudiar sistemas biológicos, es común utilizar el campo de fuerza CHARMM [23] para simular la interacción de proteínas y lípidos en la membrana plasmática, en este caso particular, el enfoque para estudiar a los componentes de la membrana se hace a nivel atómico, es decir se consideran las interacciones a pares entre los átomos del mismo fosfolípido y éstos con los átomos de los demás constituyentes del sistema.

Para desarrollar un campo de fuerza es necesario; un potencial  $V(\hat{R})$ , donde  $\hat{R}$  es un vector de posición generalizado y los parámetros adecuados para reproducir resultados experimentales; para modelar moléculas en dinámica molecular, se consideran éstas como puntos cargados vinculados por distintos enlaces, dependiendo de la interacción que se requiera representar.

En particular, el campo de fuerza CHARMM usado en la simulación, tiene la siguiente forma [23]:

$$V(\hat{R}) = \sum_{\text{enlace}} k_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{angulo}} k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedros}} \left[ \sum_j k_{\phi,j}(1 + \cos(n_j\phi - \delta_j)) \right] \\ + \sum_{\text{pares } i,j} \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{\min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{\min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\text{pares } i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon_D r_{ij}}$$

El parámetro  $k_b$  representa la constante de fuerza del enlace, en analogía con la constante del resorte de la ley de Hooke, en consecuencia  $b - b_0$  es la distancia que los átomos se han separado del equilibrio. El segundo término está relacionado con los ángulos de unión con  $k_\theta$  como la constante de esta fuerza angular y  $\theta - \theta_0$  el ángulo de equilibrio entre tres moléculas ligadas. Después tenemos los ángulos diedros o ángulos de torsión, con  $\phi$  el valor del ángulo diedro,



$\delta$  una fase y  $n$  que indica la simetría del rotor, la cual está relacionada con los momentos de inercia y podría referirse a un rotor esférico, simétrico u otro, dependiendo de cuales son los ejes principales de inercia acorde a la molécula que se quiera modelar. Los últimos dos términos se les conoce como interacciones no ligadas entre pares (i,j) de átomos, donde los pares deben estar separados por al menos tres enlaces. El primero de estos dos es un potencial de Lennard-Jones que modela las fuerzas de interacción de Van Der Waals, que es la interacción de corto alcance, en el que  $\epsilon_{ij}$  es la energía potencial mínima entre dos partículas separadas por  $r_{ij}$  y  $R_{min,ij}$  es la posición de este mínimo. Y el último término es un potencial coulombiano que representa las interacciones de largo alcance, donde  $\epsilon_D$  es la constante dieléctrica. [23]

En el caso del campo de fuerza de CHARMM, al estar considerando todos los átomos del arreglo, podemos analizar procesos como lo son los puentes de hidrógeno, ya que la escala en la que estamos trabajando se puede apreciar está interacción dipolo-dipolo que permite la unión de un hidrógeno con algún otro átomo, apreciablemente más electronegativo que el primero.

Sin embargo también existe la opción de hacer otra aproximación, al usar otra escala temporal y espacial, podemos calcular propiedades estructurales y dinámicas del sistema pero el cálculo de los puentes de hidrógeno en este modelo ya no es posible debido a que, al crear pseudo partículas con varios átomos se hace un promedio de todos estos agentes para asociarlo a dicha pseudo partícula y se pierden las interacciones específicas entre átomos, como es el caso de los puentes de hidrógeno.

El tiempo de cálculo para grano grueso será menor debido a la reducción de los grados de libertad del sistema y a la disminución de interacciones atómicas, por lo que se requieren menos recursos para llevar a cabo los cálculos computacionales. Cabe destacar que estas pseudo partículas tendrán todas la misma masa, de no ser así habría una variación en la dinámica del sistema lo cual haría menos eficiente la simulación, para esta representación se utiliza el campo de fuerza MARTINI.

MARTINI ha sido utilizado en diversas aplicaciones en dinámica molecular mostrando replicar con buena aproximación resultados experimentales. La forma matemática del campo de fuerza es la misma que en el caso de CHARMM.

Es importante entender que, cuando se habla de hacer mediciones sobre un sistema, dependiendo de las propiedades que se desean estimar, existe una escala temporal y espacial que nos dará una mejor aproximación al fenómeno. La escala revela los mecanismos subyacentes que motivan cierto proceso. Si se pretende hacer una medida de la temperatura de un sistema no basta poner en contacto el termómetro con el sistema por un segundo ya que para llegar al equilibrio termodinámico se necesita más tiempo o al intentar medir propiedades microscópicas usando una escala de tiempo en minutos, no mostraría resultados fehacientes, ya que dicho sistema evoluciona en escalas de tiempo mucho más pequeñas, por lo que, se perdería la esencia del fenómeno a estudiar.

En simulación es similar, dependiendo de las consideraciones en la escala que hagamos, se podrán medir distintas cualidades del sistema en evolución. En nuestro caso específico usaremos la descripción de todos los átomos y la de grano grueso, como se mencionó anteriormente. En la primera, como su nombre lo dice, la descripción del sistema es tomando en cuenta todos los átomos que la componen y en el caso de grano grueso se toma un conjunto de átomos que formarán una esfera la cual será considerada como un ente individual con alguna carga asociada dependiendo de sus componentes y tomando un promedio de la respuesta de los grados de libertad omitidos al crear esta pseudo partícula. Por lo que la descripción de grano grueso es una simplificación de la descripción de todos los átomos y ésta última es el análogo de grano grueso para la descripción cuántica, en la que, sí se toman en cuenta los electrones y los núcleos por separado, no como un todo, como es el caso de la descripción de todos los átomos.

Para que la descripción de grano grueso sea eficiente depende de las siguientes características i) la resolución del modelo (cuántos átomos constituyen una esfera en el modelo de grano grueso), ii) cómo se definen las posiciones de la esfera con respecto a las coordenadas en el modelo de todos los átomos, iii) las propiedades experimentales con respecto a las cuales se calibra el modelo [6]

En la siguiente imagen podemos observar de manera pictórica las diferencias entre la Esfingomielina (SM) en las dos representaciones en la que el sistema será descrito.



Figura 2.2: Representación pictórica de SM a la izquierda en escala de todos los átomos y a la derecha en grano grueso

### 2.3. Aspectos Técnicos de la Simulación

Existen varios aspectos que se deben considerar para realizar una simulación en dinámica molecular y que ésta sea fidedigna. Ya que se pretende predecir y estudiar las propiedades de bulto del sistema, evitar los efectos de superficie sería deseable para así evitar un costo mayor, computacionalmente hablando. Para esto el sistema tendría que ser muy grande para que los efectos de las fronteras sean despreciables al momento de interaccionar las partículas con ellas, y así, las interacciones serían exclusivamente entre las partículas que componen al medio.

Para evitar los efectos de superficie, se hace uso de las condiciones periódicas de la frontera. Para esto, la caja de simulación en la que estará el sistema se replica, de manera que las partículas en la caja pueden salir por un lado de la caja mientras que, al mismo tiempo, una partícula imagen entra por el otro lado, conservándose así el número de partículas en la celda de simulación; de esta manera no es necesario almacenar las coordenadas de todas las partículas imágenes, sólo las de la caja original. Así que la caja original representa un sistema de coordenadas conveniente para medir ubicaciones de las  $N$  partículas, esto lo podemos ver en la figura 2.3.

Es factible preguntarse si un sistema pequeño replicado infinitamente puede representar al sistema macroscópico que queremos representar en la simulación. Para que las condiciones

periódicas sean válidas dependerá del rango del potencial intermolecular y el fenómeno físico a investigar [2], al ser escogidos estos aspectos de manera correcta las partículas no "sentirán" la presencia de las paredes.

Considerando entonces un sistema que cumple con la condición de periodicidad ¿Cómo se calcularán propiedades del sistema? Ya que si tenemos una infinidad de celdas imagen tendríamos que calcular las interacciones debido al potencial de todas ellas, lo cual no es posible. Entonces, para sobrellevar este problema se puede hacer otra aproximación, la llamada convención de imagen mínima y lo que se hace es seleccionar una partícula como el centro de una caja, del mismo tamaño que la celda de simulación. Las que estén dentro de esta caja serán las partículas del todo que interactúan con esa partícula central en particular, sin embargo esto continúa siendo una larga lista de interacciones que debemos tomar en cuenta, así que podemos hacer otra aproximación tomando en consideración que los vecinos más cercanos a cada partícula son los que interactúan de manera más directa con dicha partícula.

Por lo general se considera un radio de corte circular, esto implica que a distancias mayores o iguales al radio de corte el potencial de interacción es cero, así evitamos calcular interacciones que al final serían despreciables.

En 2.3 se muestran de manera pictórica las aproximaciones mencionadas anteriormente, en la que se puede observar la celda de simulación, las partículas en gris como las originales, las partículas imagen y el círculo punteado, siendo el radio de corte acorde al potencial que se esté utilizando.

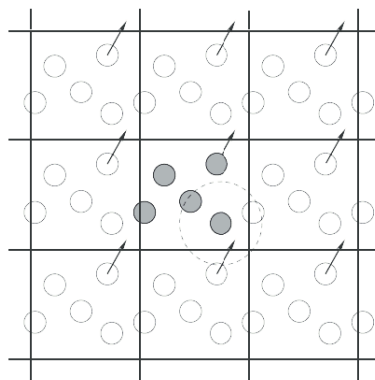


Figura 2.3: Representación bidimensional de condiciones periódicas en la frontera

## Interacciones de Largo Alcance

Es también importante resaltar las denominadas interacciones de largo alcance, en nuestro caso éstas se refieren a la parte del potencial correspondiente a la interacción intermolecular, concretamente el potencial de Lennard-Jones.

Se pretende considerar más allá del radio de corte para así determinar que no se pierda ninguna interacción importante. Cuando el potencial intermolecular  $U_{int} \neq 0$  para  $r > r_c$ , se tendrá un error que se irá acumulando a lo largo de la simulación. Si la forma del potencial intermolecular decae rápidamente podemos corregir el error y denotar esta corrección como  $U_{tail}$ , que se representa por la siguiente integral [2].

$$U_{tail} = \frac{N\rho}{2} \int_{r_c}^{\infty} 4\pi r^2 V(r) g(r) dr \quad (2.5)$$

En este caso, ya que estamos considerando  $r_c$ ,  $g(r) \rightarrow 1$ ,  $\rho$  es la densidad,  $N$  el número de partículas y  $V(r)$  el potencial de Lennard-Jones que se integrará

$$= 2\pi N\rho \int_{r_c}^{\infty} r^2 4\epsilon \left[ \left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r}\right)^6 \right] dr \quad (2.6)$$

$$= 8\pi\epsilon N\rho \int_{r_c}^{\infty} \left[ \frac{\sigma^{12}}{r^{10}} - \frac{\sigma^6}{r^4} \right] dr \quad (2.7)$$

$$= 8\pi\epsilon N\rho \left[ \frac{\sigma^6}{3r_c^3} - \frac{\sigma^{12}}{9r_c^9} \right] \quad (2.8)$$

Lo que puede reacomodarse de la siguiente manera:

$$U_{tail} = \frac{8\pi\epsilon N\rho\sigma^3}{3} \left[ \left(\frac{\sigma}{r_c}\right)^3 - \frac{1}{3} \left(\frac{\sigma}{r_c}\right)^9 \right] \quad (2.9)$$

A pesar de todas estas correcciones, el potencial de CHARMM aún tiene un problema al considerar la parte coulombiana, que es un potencial de largo alcance y por lo tanto las contribuciones de distancias mayores al radio de corte son más apreciables, para tomar esta contribución en

consideración se hace uso de las sumas de Ewald [19], que consiste en lo siguiente: considerando un sistema de cargas puntuales  $q^+$  y  $q^-$  se “rodea” a cada una de ellas con una densidad de carga contraria a cada una de las cargas, respectivamente  $\rho^-$  y  $\rho^+$ , por lo que la carga de cada una de éstas se ve apantallada por su densidad correspondiente, para posteriormente restarle el efecto de esta densidad, para así, regresar al problema original, como se muestra de manera esquemática en la siguiente figura.

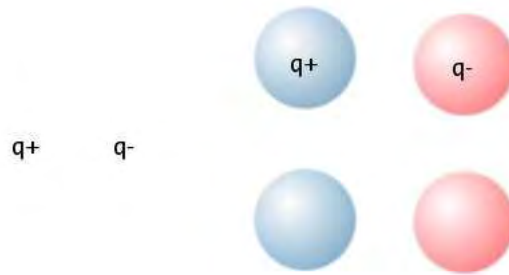


Figura 2.4: Representación pictórica del concepto de sumas de Ewald.

Acorde a [2] la energía electrostática de un sistema periódico bidimensional de  $N$  cargas puntuales con coordenadas  $\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N$  y con cargas  $q_1, q_2, \dots, q_N$  respectivamente, es de la siguiente manera:

$$E_{cou} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum'_{i,j} \frac{q_i q_j}{|\mathbf{r}_{ij}|}$$

Donde  $\epsilon_0$  es la permitividad en el vacío, la apóstrofe en la sumatoria indica que se excluye el término  $i = j$  y  $\mathbf{r}_{ij} = \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i$ .

Ahora, considerando las condiciones en la frontera las cuales pueden ser descritas por tres vectores  $\hat{c}_1, \hat{c}_2$  y  $\hat{c}_3$  donde el tamaño de la caja de simulación  $L = n_1\hat{c}_1 + n_2\hat{c}_2 + n_3\hat{c}_3$  y a su vez  $n_1, n_2, n_3 = 0 \pm 1 \pm 2, \dots, \pm L$ . Esto significa que si existe una partícula  $q_i$  ubicada en  $\mathbf{r}_i$ , también hay otra partícula con la misma carga en  $\mathbf{r}_i + n_1\hat{c}_1 + n_2\hat{c}_2 + n_3\hat{c}_3$ , para simplificar la notación se puede escribir  $n_1\hat{c}_1 + n_2\hat{c}_2 + n_3\hat{c}_3 = \mathbf{n}L$  donde  $L$  representa el tamaño de la celda de simulación, por lo que la interacción coulombiana considerando las condiciones periódicas

de la frontera es :

$$E_{cou} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{\mathbf{n}} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \left[ \frac{q_i q_j}{|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}L|} \right] \quad (2.10)$$

## 2.4. Herramientas para análisis

Se pretende analizar datos a distintos tiempos en la simulación para corroborar que se forman los dominios  $L_o/L_d$ , para esto, se medirán parámetros de orden, tamaño de cúmulos, coeficiente de difusión, área por lípido, función de distribución radial, perfiles de densidad, distribución de puentes de hidrógeno, entre otros.

Iniciaremos explicando la función de distribución radial o  $g(r)$ , la cual es muy socorrida, ya que nos da una descripción a nivel molecular de la estructura del líquido. Esta función es la transformada de Fourier del factor de estructura, el cual puede medirse de manera experimental por dispersión de neutrones. La  $g(r)$  mide la cantidad de orden local en un fluido. Tomando una partícula como el origen, se miden distancias con todas las demás partículas y se hace lo mismo con las demás participantes, de manera que se obtiene una densidad de probabilidad que por un promedio determina la cantidad de átomos a una distancia  $r$ .

Considerando la definición de  $g(r)$  para un líquido, cuando  $r \rightarrow \infty$ ,  $g(r) \rightarrow 1$ . Esto es de esperarse ya que a distancias muy grandes con respecto a la partícula origen, ésta no sentirá la presencia de las partículas más alejadas, por otro lado cuando  $r \rightarrow 0$ ,  $g(r) \rightarrow 0$  ya que las partículas no pueden traslaparse por su simetría esférica, sin embargo en el caso utilizado para nuestro análisis consideraremos una  $g(r)$  en 2D considerando sólo las direcciones en los ejes x e y, por lo que la última relación no se cumple. Es decir, se pueden traslapar ya que algunas partículas podrían estar ubicadas en el mismo plano del eje z, lo cual se vería reflejado en la gráfica de la  $g(r)$ .

Otro proceso que vale la pena monitorear es la difusión, la cual es motivada por diferencias en la concentración de una sustancia de una región a otra, esto ocurre hasta que la concentración

es uniforme, es decir, cuando el gradiente de la concentración va a cero. Difusión es sólo el efecto macroscópico del movimiento Browniano el cual es un proceso dependiente de la temperatura[9].

Para calcular el coeficiente de difusión se usa la relación de Einstein

$$D(t) = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{\langle r^2(t) \rangle}{4t} \quad (2.11)$$

Donde  $\langle r^2(t) \rangle$  es el desplazamiento cuadrático medio, una medida de la dispersión usada en estadística y  $t$  es el tiempo de producción de la simulación. El coeficiente de difusión suele ser usado para caracterizar la tasa a la cual una molécula se dispersa sobre una superficie, tanto el tamaño de las moléculas, el aumento de la temperatura o un fluido menos viscoso aumentarían el coeficiente de difusión. Cuando se habla de movimiento Browniano en una membrana homogénea el coeficiente de difusión es constante por lo que ni el tiempo de muestreo ni la escala espacial afectarán los resultados obtenidos, pero en el caso de una membrana heterogénea existen otros factores que afectan la difusión como se mencionó previamente [9].

También calcularemos los perfiles de densidad para conocer la distribución espacial de los componentes en la membrana, esto se logra al contar la cantidad de lípidos en una sección transversal de la MP, dividirlo por el volumen de dicha sección transversal y promediarlo sobre el tiempo de simulación [16].

En nuestro caso, para medir los perfiles de densidad se toman rebanadas de la membrana en el plano x-y con distintos valores de z. La MP se muestra en la figura 2.5.

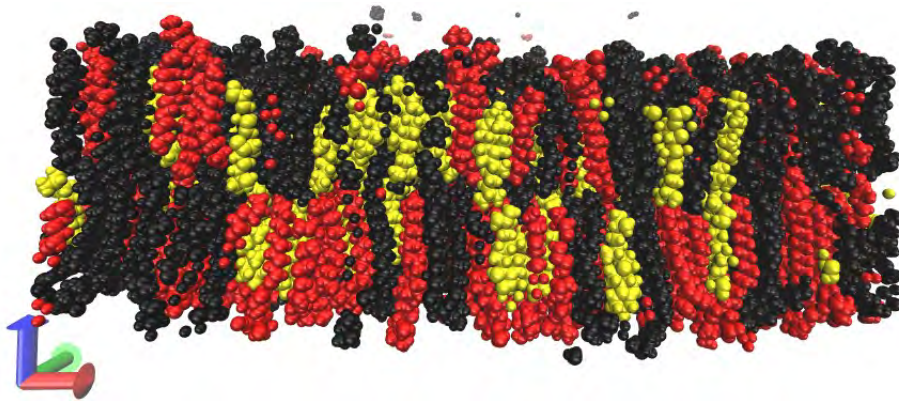


Figura 2.5: Membrana Plasmática a 214ns. La flecha azul representa el eje z, la roja el eje x y la verde el eje y. SM representado en rojo, POPC en negro y CHO en amarillo.



También se miden parámetros de orden C-H, el cual mide la movilidad del enlace C-H como se define en la siguiente ecuación

$$S_{CH} = \frac{1}{2}(3 \langle \cos^2\theta \rangle - 1) \quad (2.12)$$

Donde  $\theta$  es el ángulo entre el enlace C-H y la normal a la membrana. Entre más bajo el valor de  $S_{CH}$  mayor es la capacidad de rotación del enlace con respecto a la normal. El valor máximo es cero, lo que indica un sistema desordenado y el valor  $-0,5$  es el mínimo indicando un sistema completamente ordenado [16].

Calcular la distribución de puentes de hidrógeno puede ayudar a identificar, a nivel atómico, la relación que guarda el colesterol con los dos tipos de fosfolípidos, se cree que los fosfolípidos saturados formarían generalmente más puentes de hidrógeno con el colesterol que los fosfolípidos insaturados, se piensa que esto guarda una estrecha relación con la formación de dominios de líquido ordenado.

En los artículos [10] y [16] se habla de que esfingomielina (SM) y colesterol (CHO) forman paquetes al segregarse estos dos componentes del tercero, por lo que, se hará uso del algoritmo de Sevick, el cual es un criterio geométrico que determina tamaño de cúmulos al proporcionar una distancia, en nuestro caso de 5 angstroms, para determinar que dos partículas están conectadas.

Se puede asociar a cada configuración una matriz de conectividad  $\mathbf{C}$  con elemento  $C_{ij}$  los cuales indican la conectividad de la siguiente manera:

$$C_{ij} = \begin{cases} 1, & \text{si } i \text{ y } j \text{ están conectados} \\ 0, & \text{en otro caso} \end{cases} \quad (2.13)$$

Tal que si se tienen  $m$  elementos se obtendrá una matriz  $m$ , ya que cada columna representa una partícula y su conectividad con los  $m$  renglones, dependiendo, claro, de si estos son 1 como lo indica la ecuación anterior. El tamaño de cúmulo se determina por el número de valores distintos de cero en cada columna.

Se sabe que el área que ocupa un sistema que contiene colesterol será menor que la suma de las áreas de los componentes individuales de la bicapa. También sabemos que este efecto se puede medir cuantitativamente en términos del área promedio por molécula, lo cual reflejará aspectos de organización molecular dentro de la bicapa, a esta particularidad se le conoce como el efecto condensador del colesterol [21].

Es entonces importante, saber el área por lípido de nuestro sistema. De tener un sistema con un solo lípido, esta propiedad pudiera calcularse fácilmente al dividir el tamaño de la caja por el número de lípidos, sin embargo la mezcla de 3 entes diferentes complica esta tarea, ya que cada uno de ellos tiene distinto tamaño[14].

Una forma de calcular el área que ocupa cada lípido es usando los diagramas de Voronoi [14], la cual es una herramienta que ayuda a determinar, dado una cantidad  $N$  de puntos o semillas  $p_i$  distribuidos en un plano, cuáles son los puntos  $(x, y)$  que se encuentran más cerca de  $p_i$  que de cualquier otro de los  $N - 1$  puntos, de tal manera que existe un área alrededor de  $p_i$  que contiene a los puntos más cercanos a este que de cualquiera de los otras  $N - 1$  semillas y los cuales formarán un polígono de Voronoi que delimitará un área alrededor de cada semilla formando una malla de distintos polígonos la cual será el diagrama de Voronoi.

Usando las coordenadas de ciertos átomos en las cabeza de los fosfolípidos como semillas y proyectándolas en un plano, formaremos un diagrama de Voronoi para nuestro caso específico, donde cada polígono representa el área por lípido de alguno de los átomos seleccionados como semillas. Formalmente el área proyectada  $A(l)$  de un lípido  $l$  en la capa  $L$  representado por algún átomo  $p_l$  (semilla), es el área correspondiente al polígono de Voronoi y así se formará el diagrama de Voronoi generado por APL@VORO.

# Capítulo 3

## Resultados y Discusión

En este capítulo se presentan los diferentes análisis a distintos tiempos de simulación y en dos representaciones espacio-temporales; la de todos los átomos y la de grano grueso. Se comparan los resultados para hacer un compendio de la forma en como se estructura el sistema y su dinámica.

Todos los resultados son presentados esperando incorporar una visión conjunta de distintos aspectos presentes en la bicapa y con ellos esclarecer el comportamiento de un sistema ternario con las características mencionadas con anterioridad.

### 3.1. Representación de Todos los Átomos

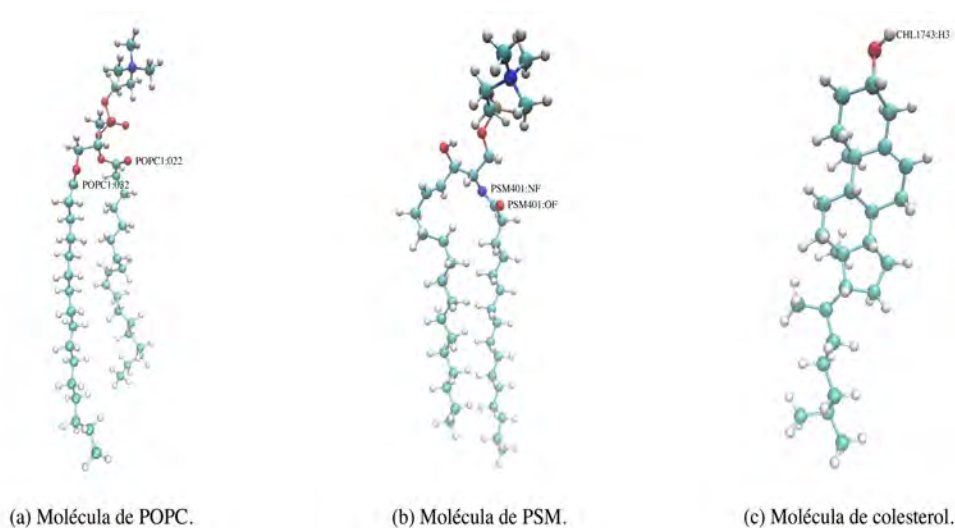


Figura 3.1: Los tres lípidos de nuestra membrana en los que se resaltan los átomos que se seleccionaron para ser el centro del análisis de las funciones de distribución radial.

## 3.1.1. Función de Distribución Radial

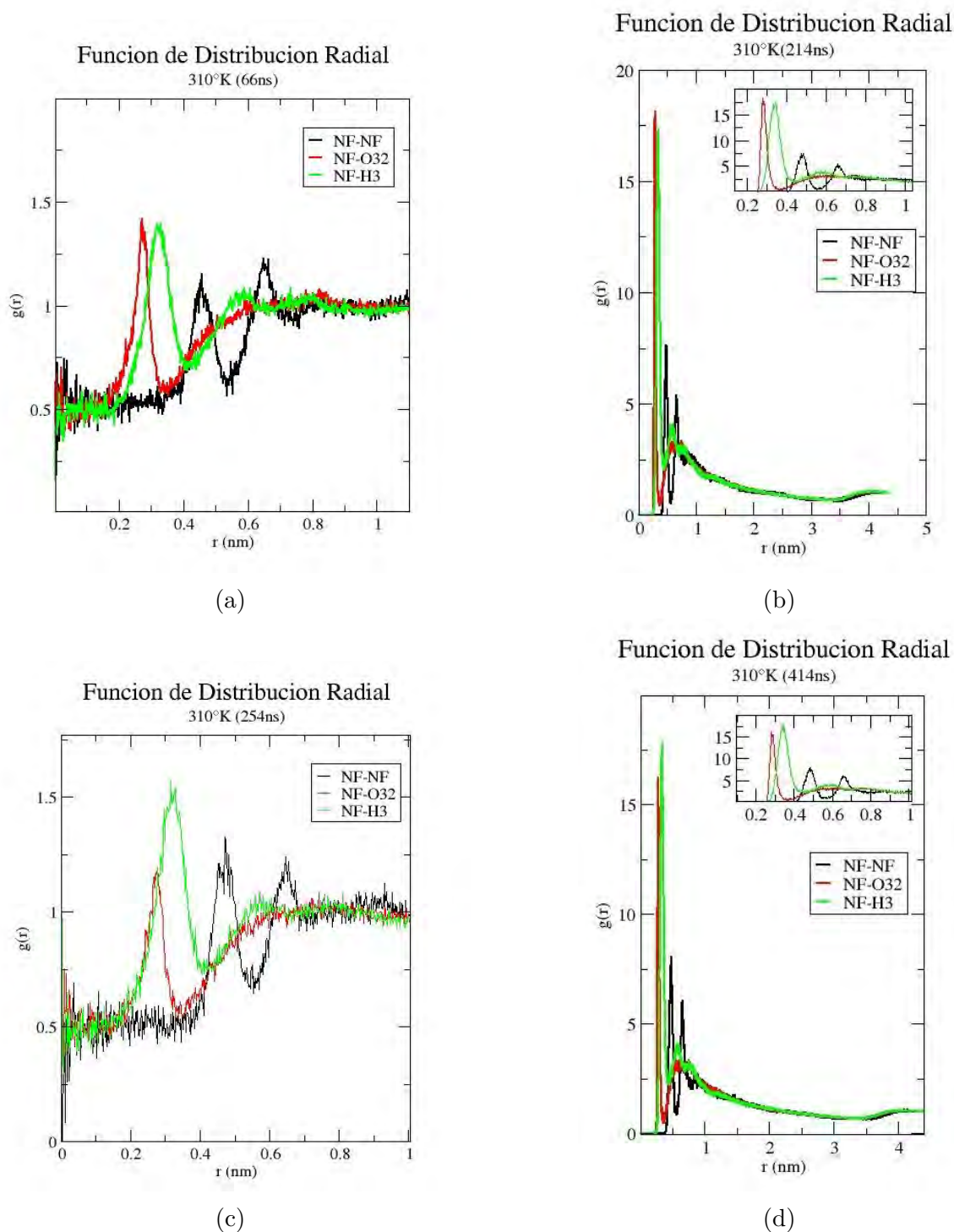


Figura 3.2: Función de distribución radial considerando el átomo NF como el de referencia para medir la distribución de las distancias a cuatro distintos tiempos de simulación.

La figura 3.2 muestra la función de distribución radial. Tomando en cuenta el átomo NF, que representa un nitrógeno perteneciente a SM, O32 un oxígeno del POPC y H3 un hidrógeno del CHO, resaltados en 3.1.

Se usaron estos átomos debido a que se cree que los puentes de hidrógeno guardan una relación importante en el empaquetamiento del colesterol con ciertos fosfolípidos y son estos átomos los que forman dichos puentes. También se tomó esta precaución por que de no hacerlo se consideraba el centro de masa de los fosfolípidos y por tener átomos pesados en la cabeza el punto de referencia quedaba muy alejado del hidrógeno del colesterol y no se observaba correlación alguna.

Al hacer el análisis tomando en cuenta los átomos mencionados en la figura 3.2a se observa un arreglo de fosfolípidos: POPC-SM-CHO-SM-CHO-SM. Teniendo mayor probabilidad de ocurrir POPC-SM y SM-CHO, sin embargo la probabilidad es baja comparada con la gráfica mostrada en 3.2b, que es el tiempo posterior. En 3.2b se observa la misma distribución de los lípidos acorde a sus distancias pero con un aumento considerable de la probabilidad de ocurrencia. Entre 0.9 y 1 nm de distancia se ve una caída, similar a la gráfica de  $g(r)$  del gas ideal la cual parece una exponencial que tiende asintóticamente a 1.

En la gráfica 3.2c al tiempo de 254ns podemos notar una caída en la densidad de probabilidad, sin perder la forma del arreglo preferencial inicial. Podemos ver como esta densidad vuelve a elevarse a los 414ns que es la figura 3.2d, por lo que podría asociarse esto a la formación de ciertos conglomerados de SM y CHO los cuales se desintegran rápidamente, debido a las interacciones producto de las colisiones entre los componentes, manifestación microscópica de la temperatura.

Por otro lado, si comparamos la gráfica 3.2b y 3.2d, podemos notar que a 414ns el pico de la relación entre NF y H3 es mayor que en el caso anterior, mientras que el pico rojo de NF y O32 decrece lo cual pareciera casi una relación uno a uno en la que cada NF que se separa de un O32 se junta con un H3.

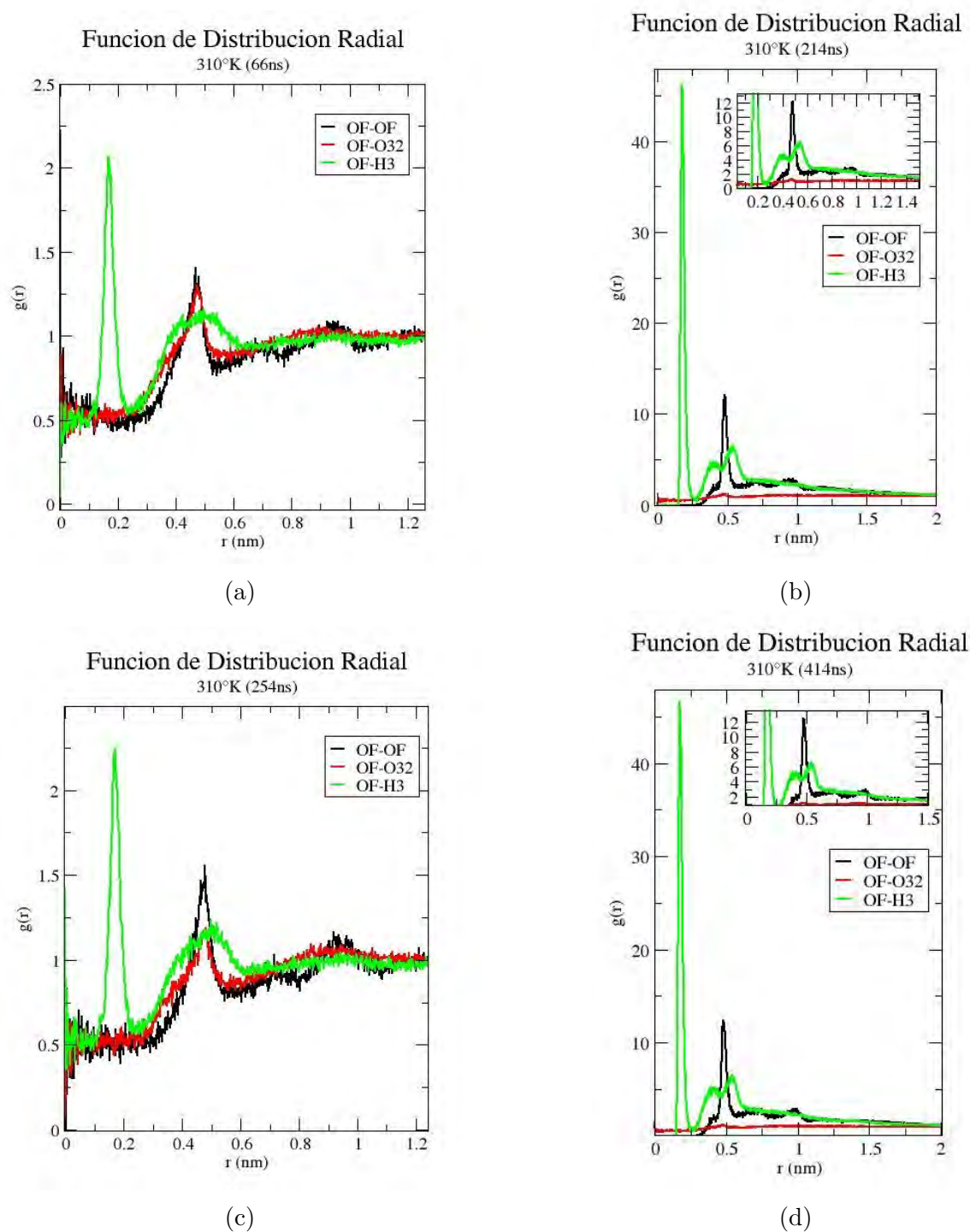


Figura 3.3: Función de distribución radial considerando el átomo OF como el de referencia para medir la distribución de las distancias a cuatro distintos tiempos de simulación.

En este caso se toma como referencia el átomo de oxígeno OF de la cola del SM y relacionándolo con los átomos mencionados anteriormente, se obtienen las gráficas de la función de distribución radial presentadas en 3.3, en la que estos átomos son las referencias espaciales de cada uno de nuestros fosfolípidos.

En este caso parece presentarse una variación del panorama presentado en las primeras cuatro gráficas. En la figura 3.3a se ve un pico que denota una afinidad a cortas distancias entre OF y H3 y un segundo pico en el que parecen tener correlación todos nuestros átomos, considerando la gráfica se podría decir que el acomodo espacial que se presenta considerando el análisis de los átomos como si fueran el fosfolípido entero es: SM-CHO-SM-CHO-SM-POPC, acomodo similar al de las gráficas anteriores pero con distintas densidades de probabilidad de ocurrir acorde al átomo que se tome como referencia.

Cuando observamos la gráfica en 3.3b, se nota un pico mucho más alto que en las primeras gráficas, esto muestra que claramente existe una mayor aceptación entre OF y H3 que entre NF y H3, también se muestra una nula relación entre O32 y OF, contrario al caso de NF y O32.

Podemos notar que 3.3c es similar a la gráfica en 3.3a pero con una disminución de la interacción entre OF y O32, lo cual sigue dando indicios de la afinidad de la SM con CHO y como el POPC se ve apartado de estos conglomerados. Después se ve que la figura 3.3d es muy parecida que la figura 3.3b, lo que puede interpretarse como la formación y desestabilización de conglomerados, lo que pasa en intervalos de nanosegundos.

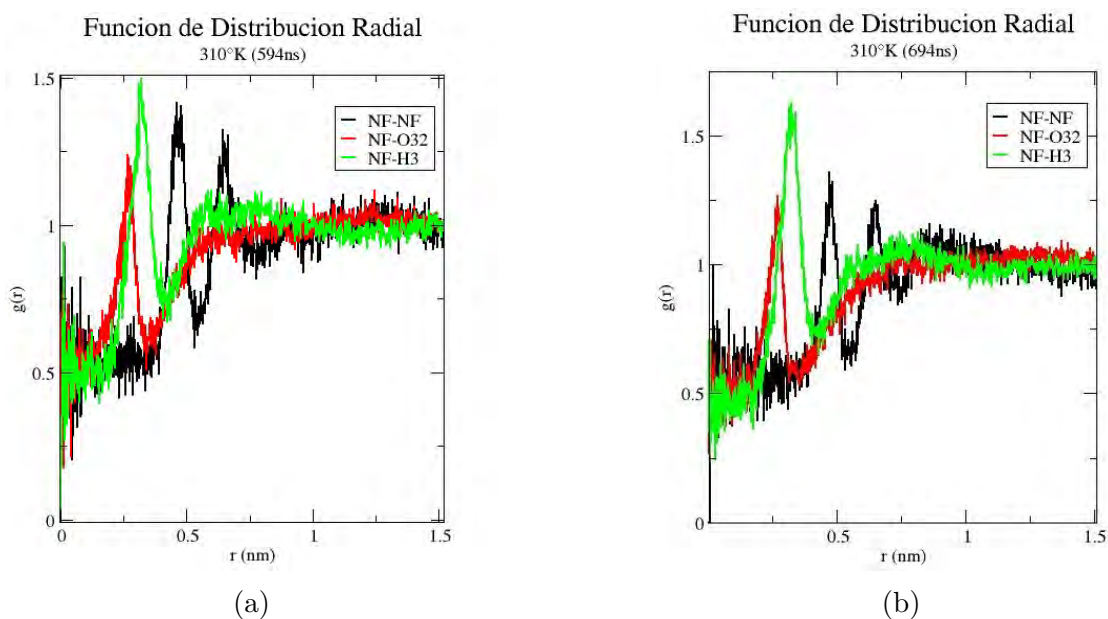


Figura 3.4: Función de distribución radial considerando los átomos NF y OF como la referencia para medir la distribución de las distancias a dos distintos tiempos de simulación.

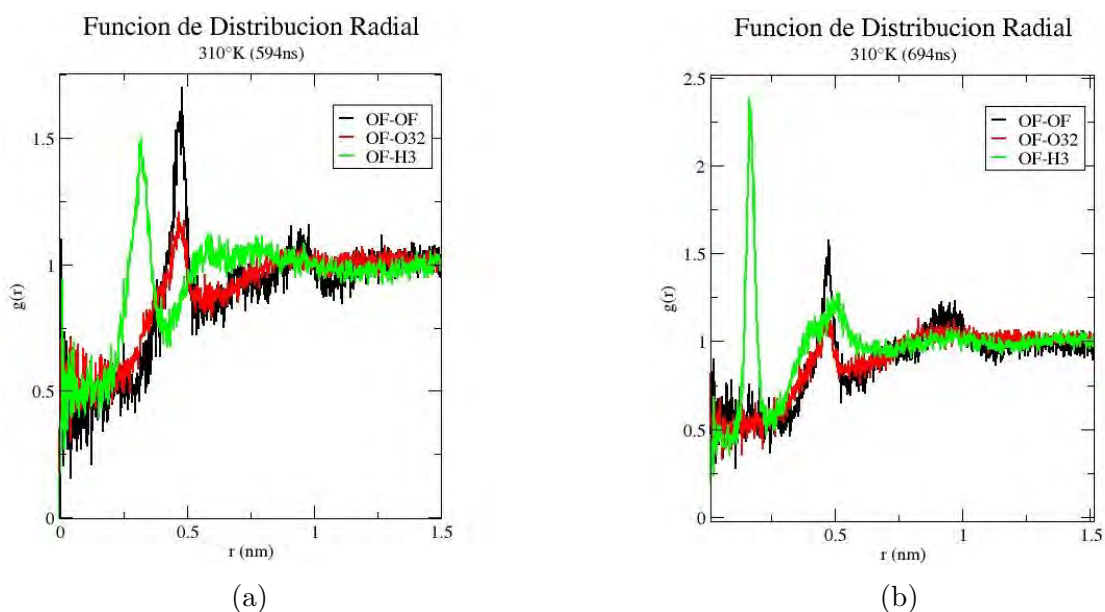


Figura 3.5: Función de distribución radial considerando los átomos NF y OF como la referencia para medir la distribución de las distancias a dos distintos tiempos de simulación.

Se consideraron distintos tiempos de simulación: 494ns, 514ns, 534ns, 574ns, 594ns, 674ns y 694ns, que no son presentados explícitamente ya que los cambios sustanciales en la función de distribución radial son las cuatro gráficas presentadas en 3.4 y 3.5 .

En las primeras dos gráficas lo que cambia es el valor de la curva verde, la cual crece de 3.4a a 3.4b, aunque es poco el cambio, queda claro que se mantiene una relación entre SM y CHO. De igual manera para las dos gráficas en 3.5a y 3.5b, pero en este caso el cambio es más sustancial, lo cual parece indicar que el átomo de oxígeno OF de la esfingomielina guarda mayor relación con el colesterol que el nitrógeno NF.



### 3.1.2. Desplazamiento Cuadrático Medio

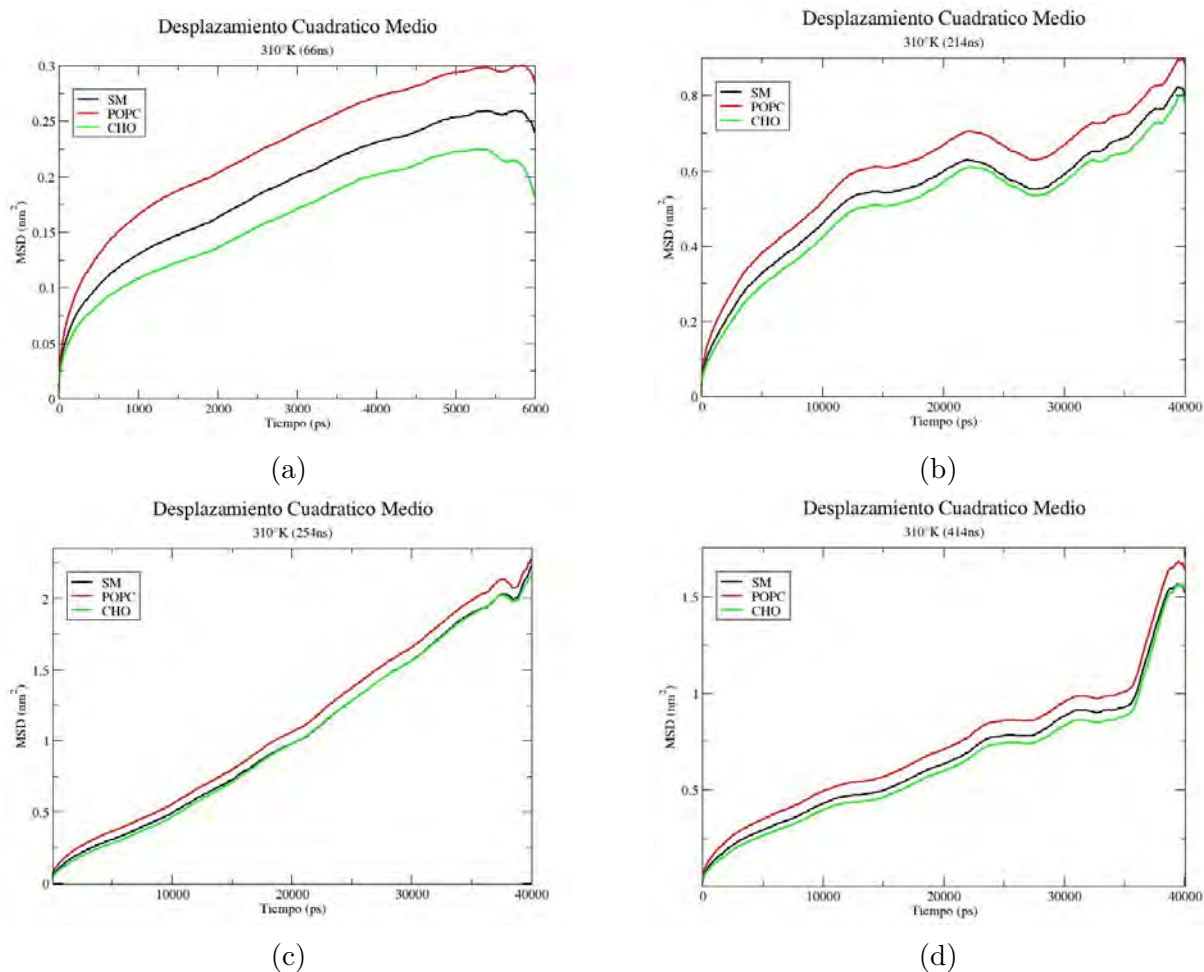


Figura 3.6: Desplazamiento Cuadrático Medio de SM, POPC y CHO a distintos tiempos de simulación

Al observar 3.6 el desplazamiento cuadrático medio en el intervalo de 60 a 66 ns se ve que las partículas se difunden muy poco, quedando acotadas a cortas distancias sin embargo sólo son 6 nanosegundos de análisis. Cuando observamos la gráfica 3.6b en el intervalo de 174 a 214ns podemos ver un cambio significativo en el comportamiento de los entes interactuantes. Podemos ver un valle que podría referirse a un estado de arresto en el que las partículas quedan confinadas.

Después en 3.6c se ve nuevamente un cambio radical en la dinámica del sistema ya que ahora se presenta una difusión Browniana donde no hay estados de arresto y las partículas tienen la posibilidad de difundirse libremente.

Y por último en 3.6d se presenta una menor movilidad que en la gráfica anterior y en los últimos nanosegundos se difunde precipitadamente, tal vez debido a un repentino rompimiento de la interacción que impedía el movimiento libre los 35 nanosegundos iniciales mostrados en la gráfica.

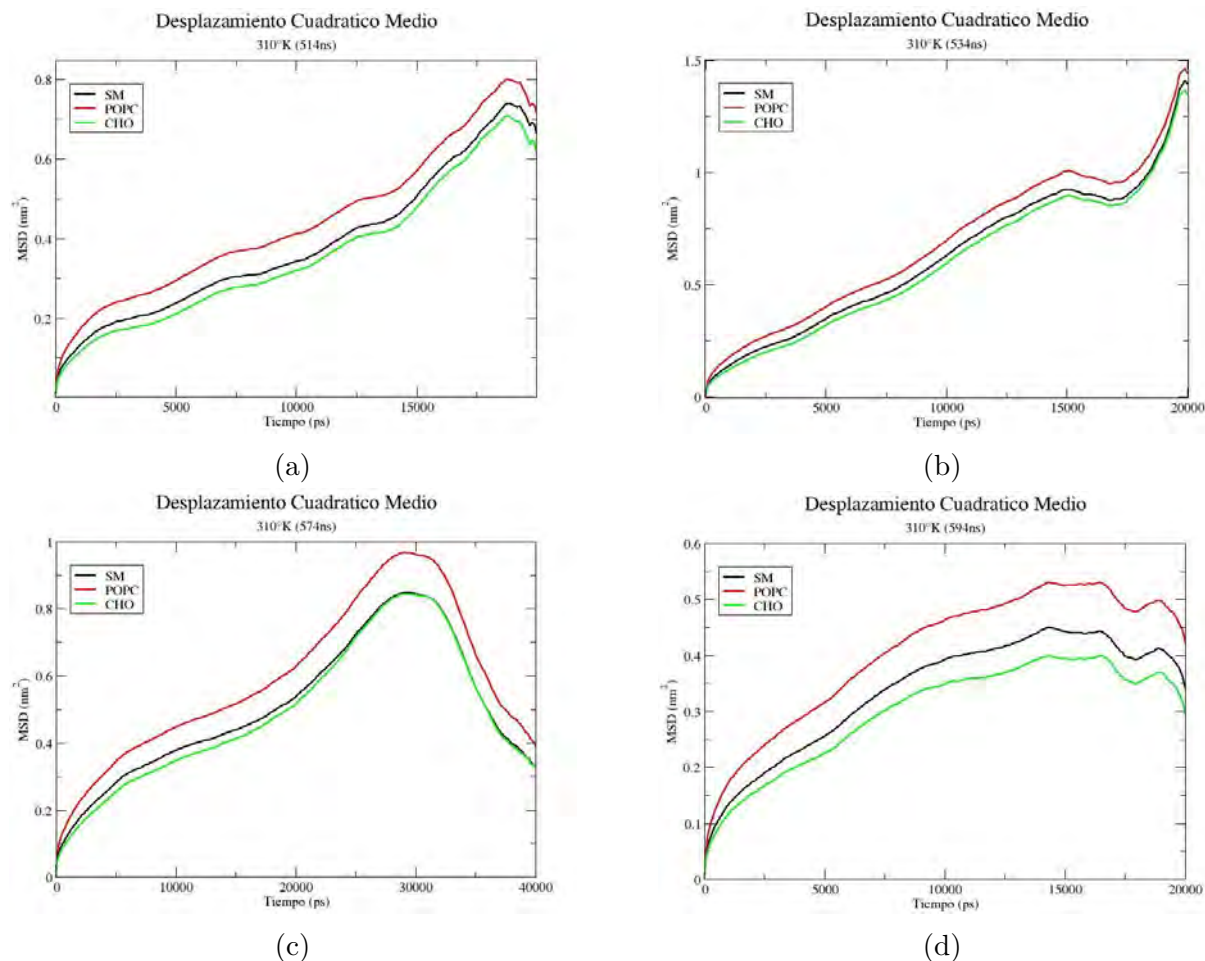


Figura 3.7: Desplazamiento Cuadrático Medio de SM, POPC y CHO a distintos tiempos de simulación

Observando la gráfica 3.6a del desplazamiento cuadrático medio muestra que a los primeros 15 ns las moléculas en promedio se mueven en un segmento no mayor a  $0.4 \text{ nm}^2$  y este desplazamiento para SM y CHO es similar mientras que POPC tiene valores mayores, indicando una mayor movilidad. De los 15 ns en adelante existe un crecimiento claramente difusivo, quizá porque se rompe un balance que tenían las moléculas confinadas, en especial SM y CHO.

En 3.6b parece presentarse un patrón difusivo Browniano y al final presentarse un estancamiento en la movilidad para rápidamente volver a crecer. Considerando ahora la gráfica en

3.6c los primeros 15 ns muestra que SM y CHO se ven confinados a moverse en un área de  $0.4 \text{ nm}^2$  seguido por un crecimiento repentino en la difusión y una pequeña meseta aproximadamente a 30ns para después disminuir bruscamente el desplazamiento de los participantes, particularmente de SM y CHO, lo cual podría apoyar la teoría de formación de cúmulos.

Veinte nanosegundos después en 3.6d es más claro que en cualquiera de las otras tres. En este caso la curva negra y verde están más separadas, lo que indica que el área que son capaces de ocupar en la membrana difiere, lo cual podría empatarse con los resultados de la función de distribución radial en la figura 3.5 donde se ve una menor afinidad de SM-CHO que a otros tiempos, como por ejemplo en la figura 3.3.

### 3.1.3. Puentes de Hidrógeno

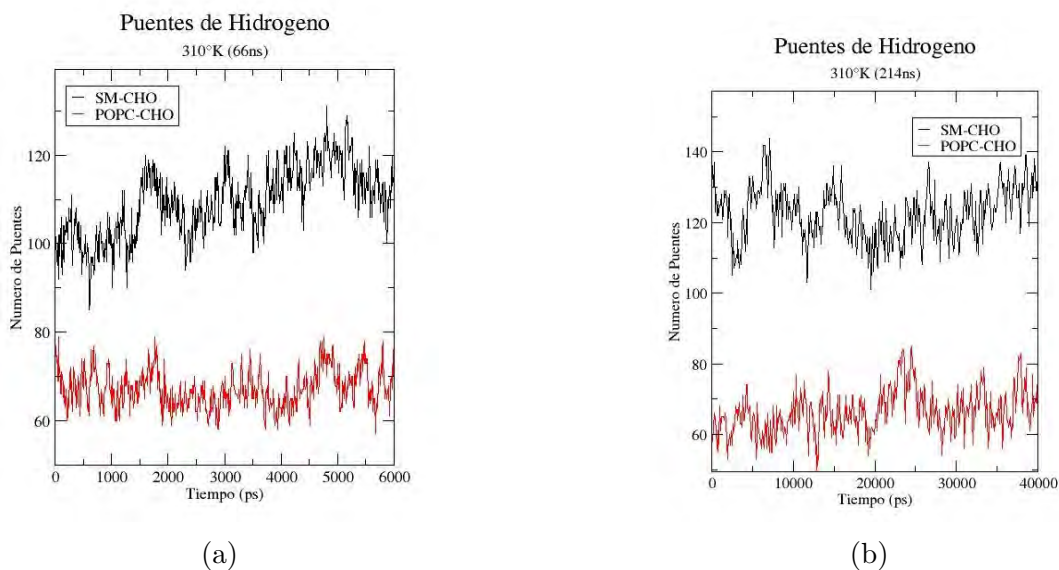


Figura 3.8: Número de Puentes de Hidrógeno a distintos intervalos de tiempo de simulación. La curva negra es número de puentes de SM con CHO y la roja de POPC con CHO

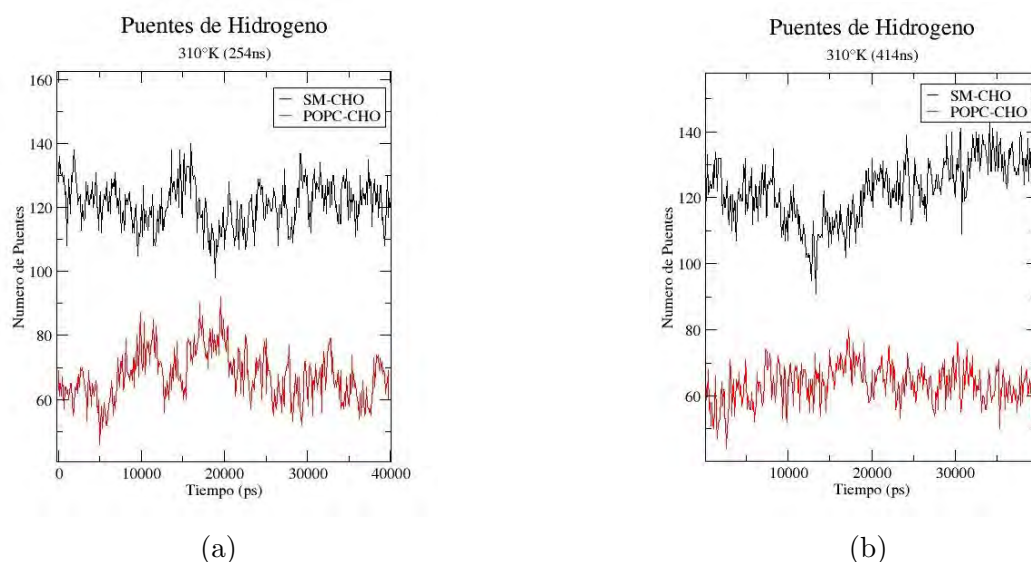


Figura 3.9: Número de Puentes de Hidrógeno a distintos intervalos de tiempo de simulación. La curva negra es número de puentes de SM con CHO y la roja de POPC con CHO.

Cuadro 3.1: Número de Puentes de Hidrógeno de SM con CHO

| Tiempo | Promedio | Desviación Estandar |
|--------|----------|---------------------|
| 66ns   | 109.329  | 7.921               |
| 214ns  | 122.377  | 7.506               |
| 254ns  | 121.057  | 7.058               |
| 414ns  | 122.344  | 9.265               |

Cuadro 3.2: Número de Puentes de Hidrógeno de POPC con CHO

| Tiempo | Promedio | Desviación Estandar |
|--------|----------|---------------------|
| 66ns   | 67.156   | 4.276               |
| 214ns  | 66.015   | 6.301               |
| 254ns  | 67.394   | 7.743               |
| 414ns  | 63.395   | 5.760               |

Acorde a [16], los puentes de hidrógeno podrían jugar un papel fundamental en la formación de dominios de SM-CHO, lo cual se relaciona con la fase de líquido ordenado. Es claro que existe un mayor número de puentes de hidrógeno por cuadro para SM-CHO que para POPC-CHO.

Al considerar la tabla 3.1 podemos ver que de 66ns a 214 ns hay un cambio en el valor promedio del número de puentes de hidrogeno, este aumento en el promedio puede relacionarse con la función de distribución radial en 3.3a existe relativamente baja densidad de probabilidad de

encontrar a SM cerca de CHO a diferencia del tiempo posterior, por lo que podría argumentarse que hay una correlación entre el aumento de puentes de hidrógeno y los dominios de SM con CHO.

Al observar la diferencia en los valores promedio a 254ns y 414ns parece no haber un cambio sustancial en el número promedio de puentes de SM con CHO, entre un tiempo y otro, sin embargo la función de distribución radial, para este intervalo de tiempo, muestra un aumento en la probabilidad de ocurrencia de la unión de SM-CHO, aunque no parece existir un aumento sustancial en el número de puentes de hidrógeno entre estos dos participantes. Poniendo atención en la desviación estandar a estos tiempos específicos se nota un aumento considerable en la dispersión respecto al valor promedio en un intervalo y en el otro, por lo que el valor promedio podría ser menos confiable en este caso.

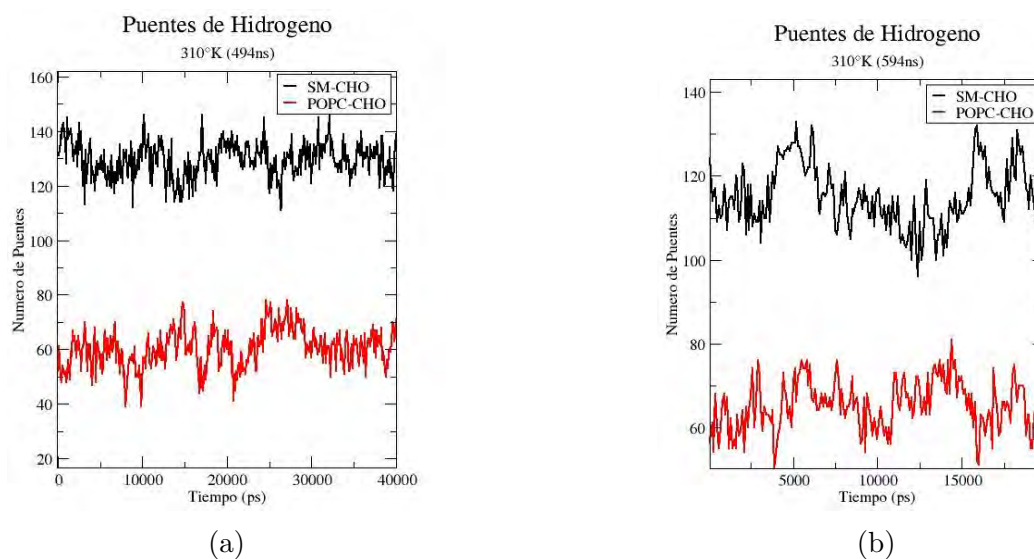


Figura 3.10: Número de Puentes de Hidrógeno a distintos intervalos de tiempo de simulación. La curva negra es número de puentes de SM con CHO y la roja de POPC con CHO.

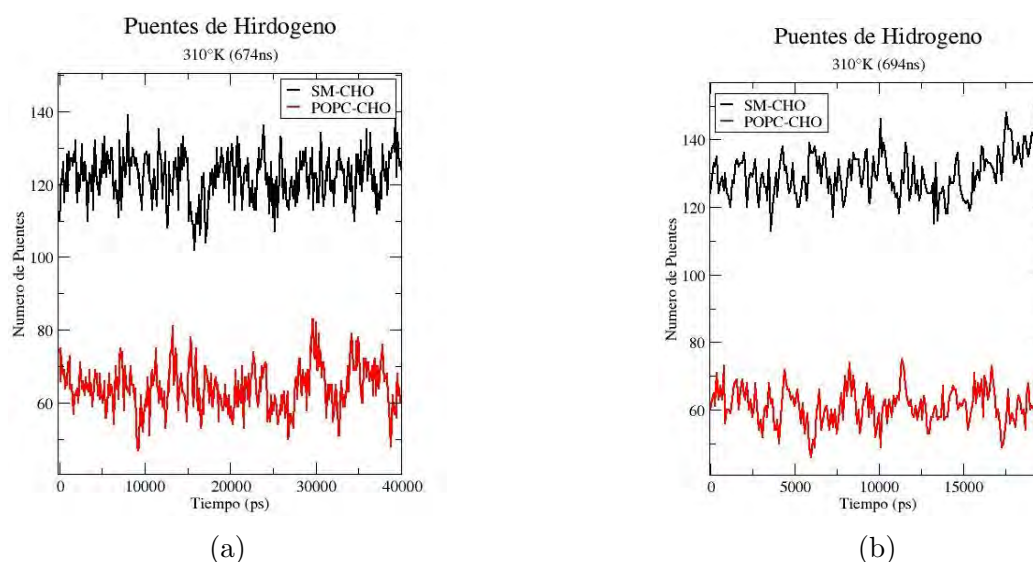


Figura 3.11: Número de Puentes de Hidrógeno a distintos intervalos de tiempo de simulación. La curva negra es número de puentes de SM con CHO y la roja de POPC con CHO.

Cuadro 3.3: Número de Puentes de Hidrógeno de SM con CHO

| Tiempo | Promedio | Desviación Estandar |
|--------|----------|---------------------|
| 494ns  | 129.471  | 6.4323              |
| 594ns  | 115.199  | 7.3546              |
| 674ns  | 121.905  | 6.2634              |
| 694ns  | 129.622  | 6.5012              |

Cuadro 3.4: Número de Puentes de Hidrógeno de POPC con CHO

| Tiempo | Promedio | Desviación Estandar |
|--------|----------|---------------------|
| 494ns  | 60.4015  | 6.9803              |
| 594ns  | 65.204   | 5.9062              |
| 674ns  | 64.02    | 6.1870              |
| 694ns  | 61.1144  | 5.4682              |

Se continúa interpretando los distintos resultados a diferentes tiempos de simulación. Se consideraron estos cuatro tiempos y se excluyeron los tiempos intermedios entre 494ns y 594ns, debido a que estos no muestran cambios en la manera en que se comporta el sistema.

Tomando en cuenta la figura 3.11 las gráficas de 494ns a 594ns muestran los distintos valores promedio para este intervalo, que no están incluidos en las tablas, muestran la tendencia final; el número de puentes de hidrógeno va disminuyendo para SM con CHO, es por esto que no

fueron incluidos. Después a 674ns el número promedio de puentes vuelve a crecer, tendencia que permanece 20 nanosegundos después donde los valores son similares a los de 494ns.

### 3.1.4. Perfil de Densidad

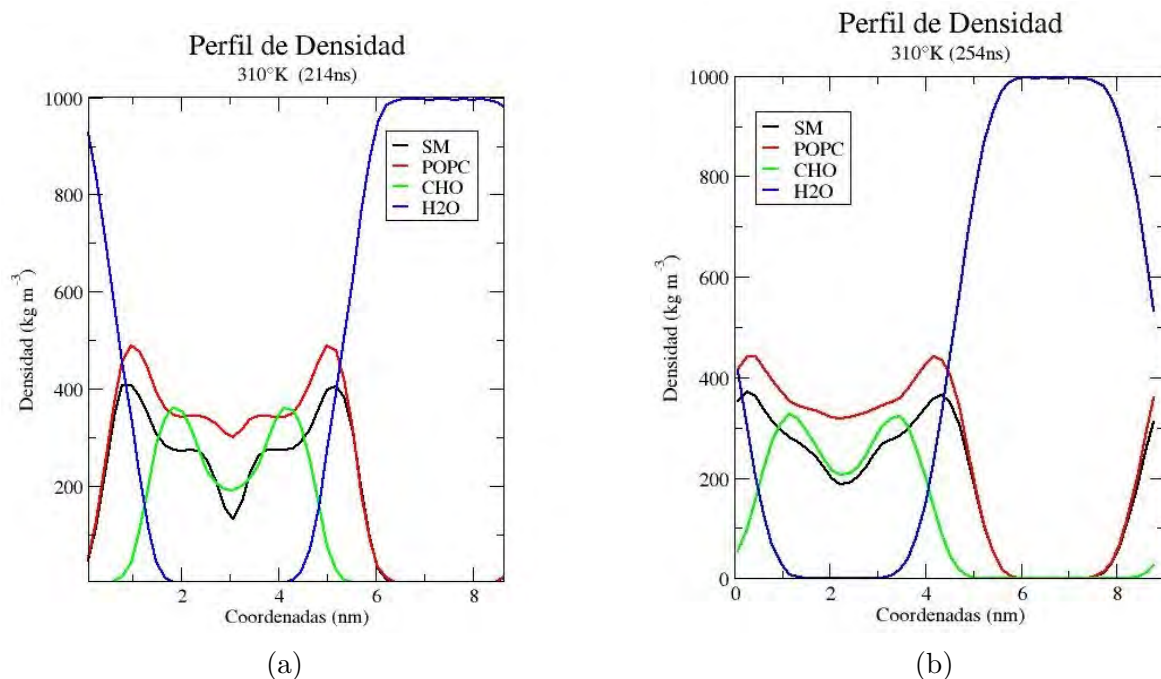


Figura 3.12: Perfil de Densidad a lo largo del eje z comparando dos tiempos de simulación.

Los picos equidistantes aproximadamente a 1 y 5 nanómetros para SM y POPC se considera que son los grupos polares de estos fosfolípidos en los dos lados de la bicapa y la aglomeración del colesterol en la interface entre las dos capas, es debido a una fuerte interacción entre CHO y SM, acorde a [16].

Observando la figura 3.12 se ve como la densidad de los lípidos se distribuye de manera más homogénea a lo largo del eje z en la figura 3.12b que en 3.12a. Dicho comportamiento en la distribución de los elementos, aunado con las gráficas del desplazamiento cuadrático medio y la función de distribución radial, puede ser indicador de la formación y desestabilización de las balsas.

Al observar 3.12a, se podría pensar en el modelo del paraguas, propuesto por [13] en el que los colesteroles procuran fosfolípidos como SM los cuales ensanchan sus cabezas para protegerlos del

entorno acuoso, estando el colesterol junto a las colas se produce el llamado efecto condensador, proceso por el cual las colas de SM se empaquetan junto con el colesterol formando dominios de líquido ordenado y a su vez las cabezas de los fosfolípidos protegen al colesterol del entorno acuoso.

En el caso específico de este estudio, los picos de la curva negra representan las cabezas de SM y los picos de la curva verde parecen estar en la zona intermedia de la membrana, la zona hidrofóbica. Las cabezas de SM protegen a CHO, mientras se produce el efecto condensador en las colas, empaquetandolas.

En 3.9b es claro que la distribución de los componentes es más homogénea, lo cual indicaría que el cúmulo se deshizo, posiblemente por el efecto de la temperatura o algún desequilibrio debido a un desajuste en los anchos de la bicapa, ya que en lugares con alta concentración de colesterol se encuentran anchos de membrana mayores, esto pudo ser un factor que propiciara la redistribución de los componentes.

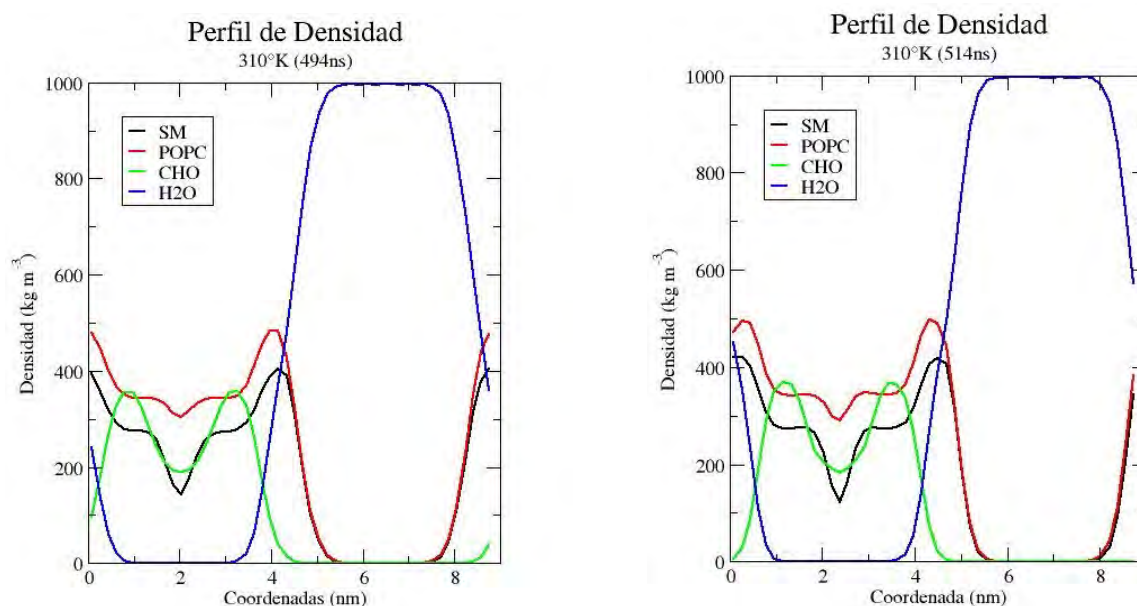


Figura 3.13: Perfil de Densidad a lo largo del eje z comparando dos tiempos de simulación

En 3.13 se nota un patrón similar a lo observado en los perfiles de densidad a 214 y 254 nanosegundos, sólo que es el caso inverso, a 494ns el colesterol parece estar distribuido más homogéneamente a lo largo del eje z de la membrana que en la gráfica 20ns después.



### 3.1.5. Parámetros de Orden

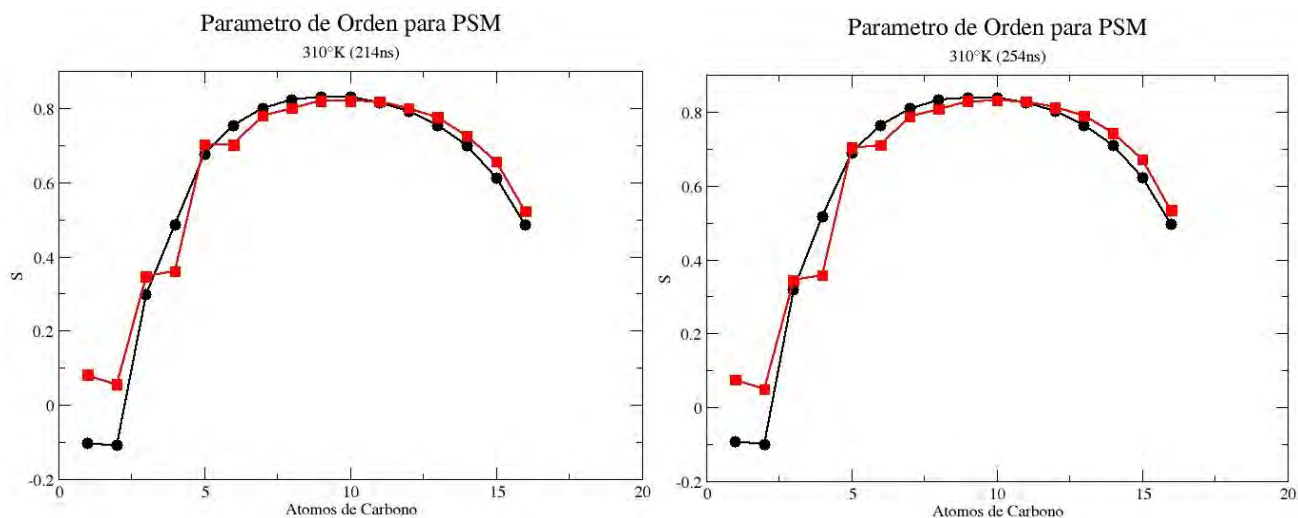


Figura 3.14: Parámetros de orden de los átomos de los carbonos en las colas de SM.

El parámetro de orden a distintos tiempos de simulación no se ve afectado. Aquí se presentan dos gráficas que muestran la forma general que este parámetro toma. Este análisis es respecto a los carbonos ubicados en la cola de SM, donde se supone se forman los puentes de hidrógeno con el colesterol.

Lo que se tiene es una especie de sistema de referencia para la molécula y otro para la membrana, cuando el eje coordinado  $z$  coincide con el de la membrana, el valor de éste será 1 y si el valor es  $-0.5$ , muestran estar ordenados perpendicularmente a la normal de la membrana, que en este caso es el eje  $z$  de la caja de simulación y al ser 0 es que están orientados de manera aleatoria. Los valores obtenidos concuerdan con la fase de cristal líquido, en la que los parámetros de orden están entre 0.3 y 0.8, lo que guarda semejanzas con la fase de líquido ordenado que queremos estudiar. A tiempos de simulación posteriores los componentes del tensor de orden permanecen inalterados.

### 3.1.6. Área por Lípido

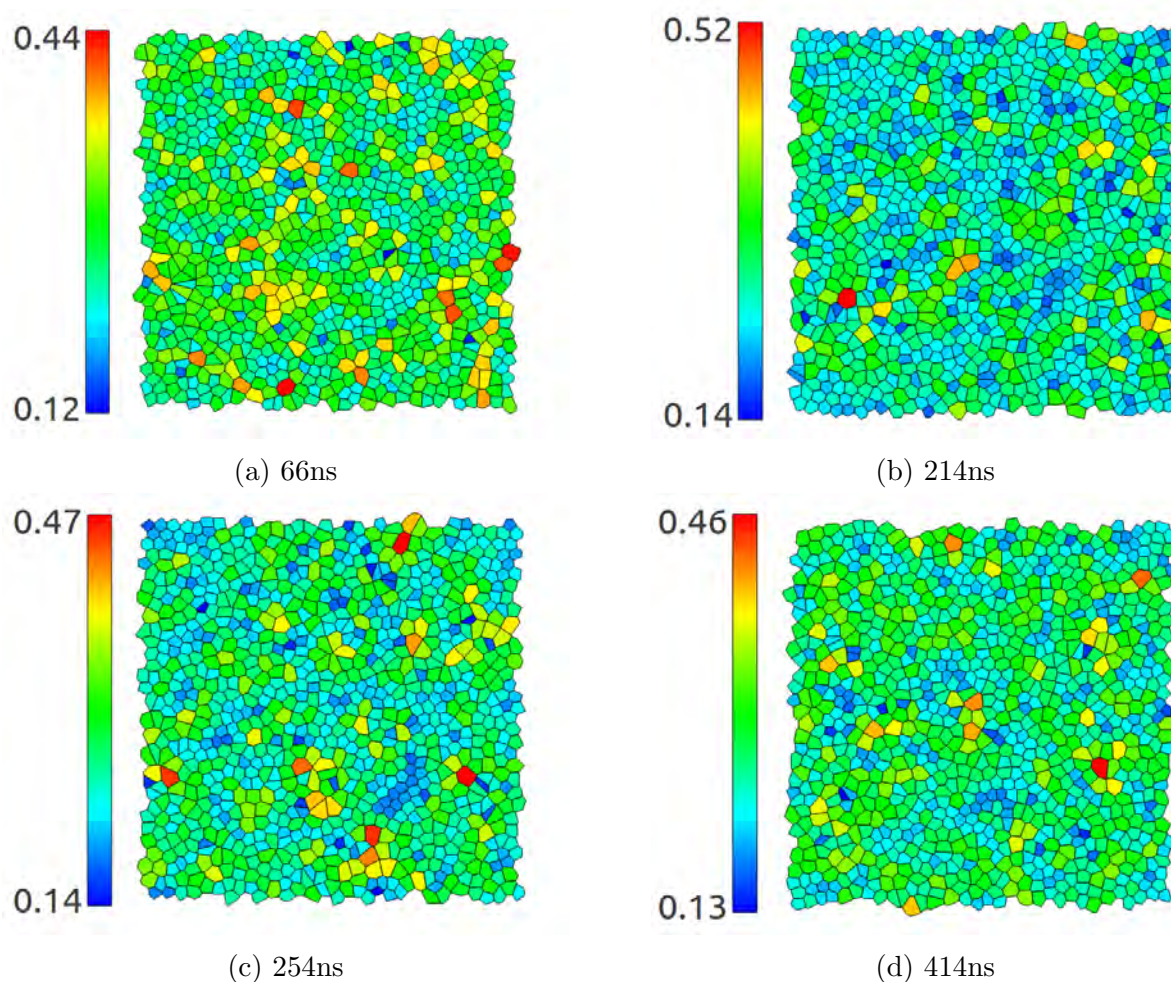


Figura 3.15: Diagramas de Voronoi representando el área por lípido a distintos tiempos de simulación.

Cuadro 3.5: Área Promedio

|      | 66ns            | 214ns           | 254ns           | 414ns           |
|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| CHO  | 0.294468 $nm^2$ | 0.293954 $nm^2$ | 0.291104 $nm^2$ | 0.290822 $nm^2$ |
| SM   | 0.500206 $nm^2$ | 0.495588 $nm^2$ | 0.489784 $nm^2$ | 0.489714 $nm^2$ |
| POPC | 0.510306 $nm^2$ | 0.508496 $nm^2$ | 0.503814 $nm^2$ | 0.504722 $nm^2$ |

Las cuatro gráficas que se presentan son diagramas de Voronoi utilizando APL@VORO para poder determinar el área por lípido.

Cada polígono representa un lípido, en este caso representado por átomos en la zona del anillo de esterol, que es lo recomendable para membranas que contienen colesterol, por ser la zona

donde el empaquetamiento ocurre a nivel molecular [21]. Al tomar como referencia estos átomos se espera que el área por lípido del colesterol sea mayor que si se tuviera una selección diferente de átomos [14].

Comparando los diagramas en la figura 3.15 se puede notar que en 3.16b existen más zonas azules que en 3.16a, lo cual implica que existen más zonas con lípidos ocupando menos  $nm^2$  en la primera que en la segunda, detalle que al observar el cuadro 3.3 podemos corroborar, ya que los valores de área por lípido disminuyen para todos los entes en la membrana, en especial para SM.

Los valores promedio son considerablemente menores para SM que para POPC, lo cual concuerda con el efecto condensador que se supone el colesterol tiene en las colas de SM y que en menor grado ocurre para el POPC ya que este último sólo tiene una cola saturada. Esto podemos cotejarlo con la gráfica del desplazamiento cuadrático medio a 214 ns en la figura 3.6, donde parece haber un estado de arresto de la SM con CHO.

Considerando esta aparente conglomeración de moléculas de colesterol con esfingomielina y la disminución en área por lípido se puede concluir que el efecto condensador se lleva a cabo tal que se forma paquetes de estos dos constituyentes.

De manera similar, comparando 3.16c con 3.16d la primera tiene más zonas azules pero existen también mayores concentraciones con colores cercanos al rojo que en 3.16d y al observar la tabla 3.5 podemos ver una disminución en los valores promedios del área por lípido, principalmente de SM pero también para POPC.

Cuadro 3.6: Área Promedio

|      | 494ns           | 514ns         | 594ns           | 694ns           |
|------|-----------------|---------------|-----------------|-----------------|
| CHO  | 0.28989 $nm^2$  | 0.0000 $nm^2$ | 0.288692 $nm^2$ | 0.288982 $nm^2$ |
| SM   | 0.486812 $nm^2$ | 0.0000 $nm^2$ | 0.488898 $nm^2$ | 0.495238 $nm^2$ |
| POPC | 0.503246 $nm^2$ | 0.0000 $nm^2$ | 0.508646 $nm^2$ | 0.50769 $nm^2$  |

## 3.1.7. Espesor de Membrana

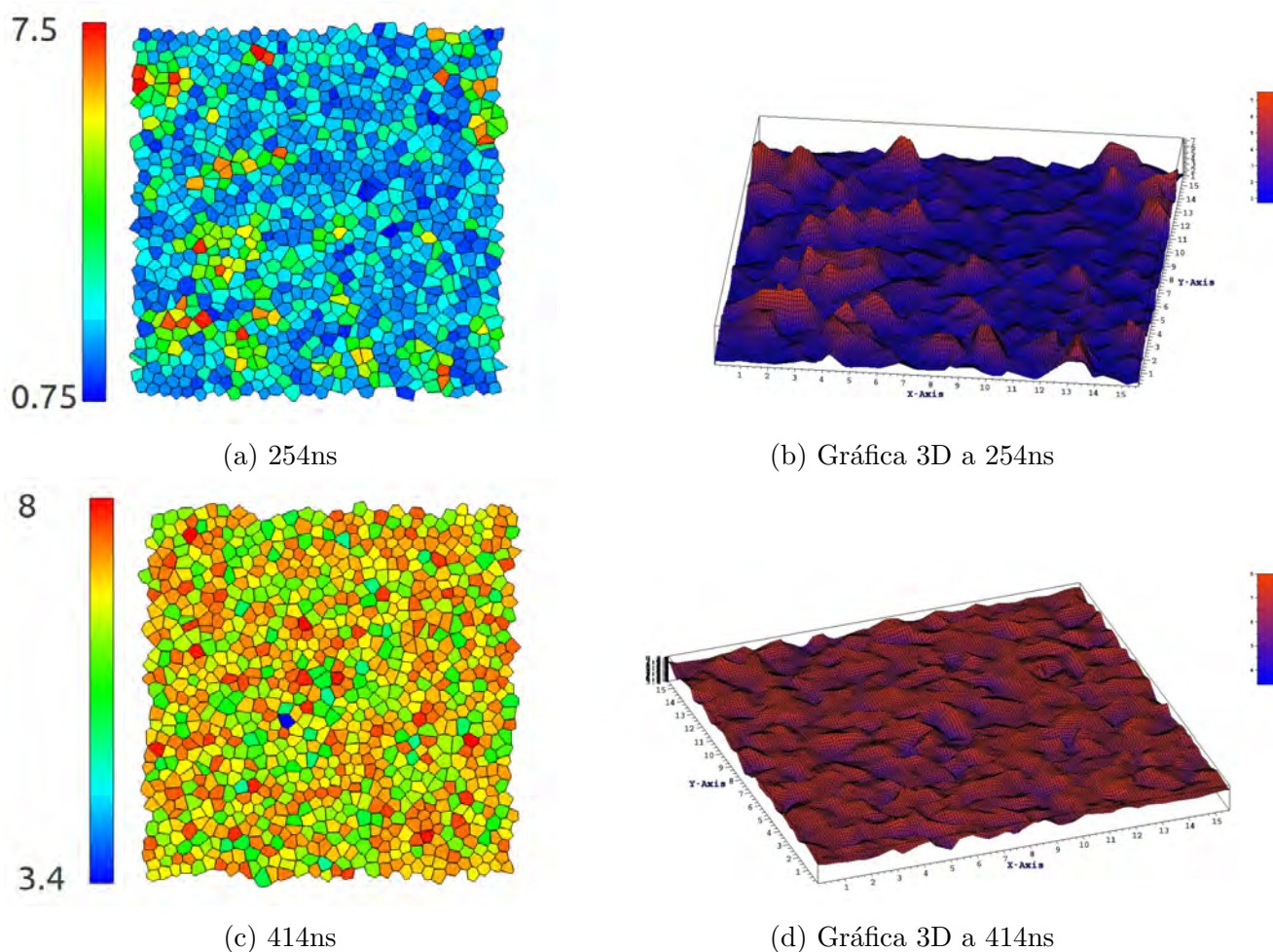


Figura 3.16: Diagrama de Voronoi y Visualización 3D del espesor de la membrana

Cuadro 3.7: Espesor Promedio de Membrana

|      | 254ns      | 414ns      |
|------|------------|------------|
| CHO  | 4.53908 nm | 4.69527 nm |
| SM   | 4.01186 nm | 4.04409 nm |
| POPC | 4.10382 nm | 4.07442 nm |

Las cuatro gráficas en 3.16 representan dos tiempos de simulación: 214ns y 414ns. Tenemos entonces en la esquina superior e inferior izquierda los diagramas de Voronoi a 254ns y 414ns respectivamente, al lado derecho de cada una, se muestra una representación 3D de la membrana al tiempo correspondiente, la cual muestra a un primer tiempo menor espesor de membrana que el caso posterior.

Tomar en cuenta el espesor de la membrana guarda relación con el colesterol el cual tiene la característica de ensanchar la membrana. De los diagramas de Voronoi se puede notar que a 214 ns se ven zonas azules que implican bajo espesor y a 414ns el espesor aumenta lo cual podría guardar relación con los cúmulos de SM y CHO.

### 3.2. Representación de Grano Grueso

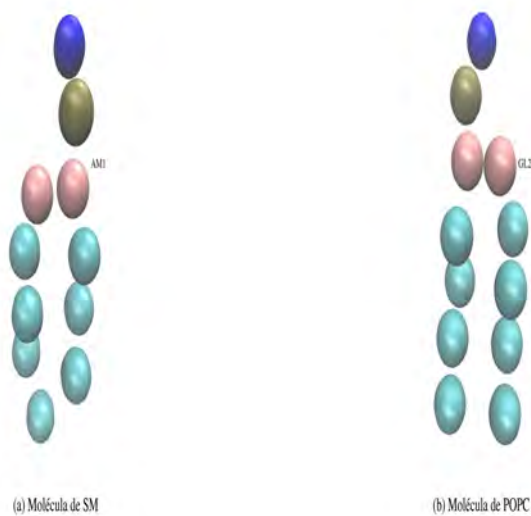


Figura 3.17: Dos de los lípidos de nuestra membrana en los que se resaltan los átomos que se seleccionaron para ser el centro del análisis de las funciones de distribución radial.

### 3.2.1. Función de Distribución Radial

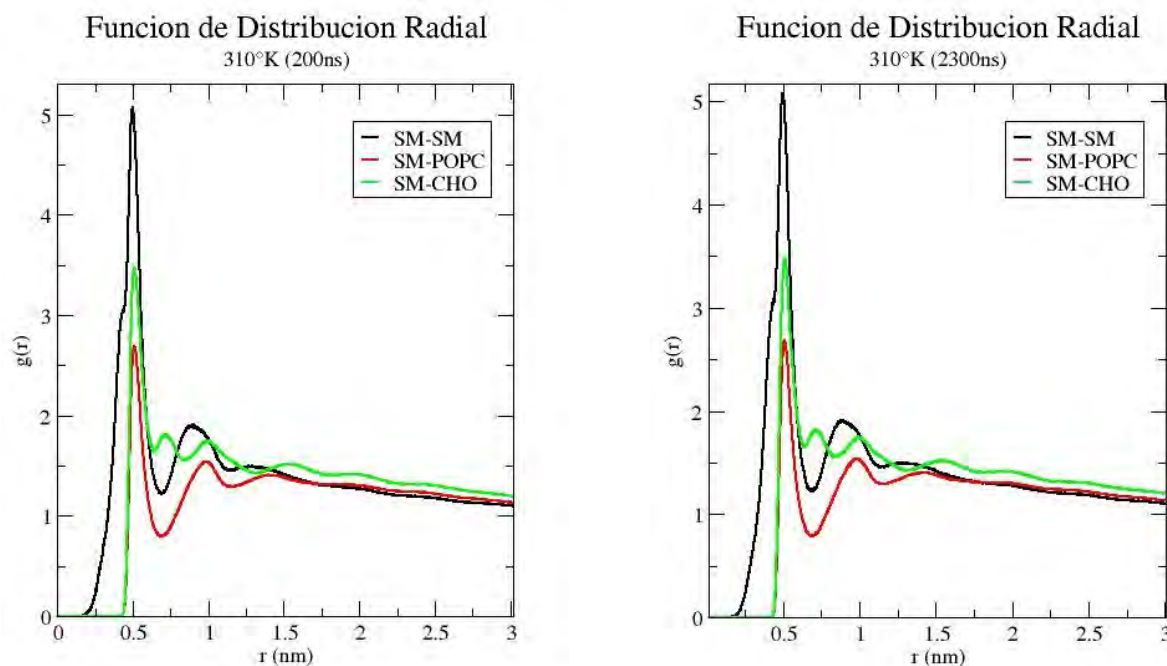


Figura 3.18: Función de Distribución Radial a dos tiempos de simulación diferentes

La figura 3.18 corresponde a la función de distribución radial considerando al lípido como un todo, es decir, considerando a todos los pseudo átomos que componen a cada lípido y no sólo enfocándonos en uno específico como se hizo en la escala de todos los átomos. En este caso se obtienen gráficas que sí muestran una relación espacial entre los lípidos que en el caso de todos los átomos se perdía debido, quizás, al número de grados de libertad involucrados.

Las dos gráficas en 3.18 muestran una clara predominancia en la interacción de SM consigo mismo aproximadamente a  $0.5 \text{ nm}^2$ , sin embargo a esta misma distancia existe la mayor densidad para SM con CHO y, que a diferencia de las otras curvas ésta tiene varios picos y valles que se difuminan conforme la distancia aumenta, lo cual podría hacer referencia a un arreglo periódico de estos componentes, también podría destacarse que el segundo y tercer pico de la curva verde son prácticamente máximos locales y que ésta decae más lento que la correlación de los otros pares.

A pesar de esta aparente correlación entre esfingomielina y colesterol los análisis de  $g(r)$  a tiempos posteriores: 2300ns, 2580ns, 2640ns, 4320ns, 5440ns y 8800ns no han mostrado cambios

en la estructura de la membrana, esto podría implicar un aparente equilibrio, cuestión que contrasta con el caso de todos los átomos en el que la estructura, a pesar de permanecer inalterada espacialmente, tenía ciertos cambios sustanciales en la densidad de probabilidad radial entre los componentes.

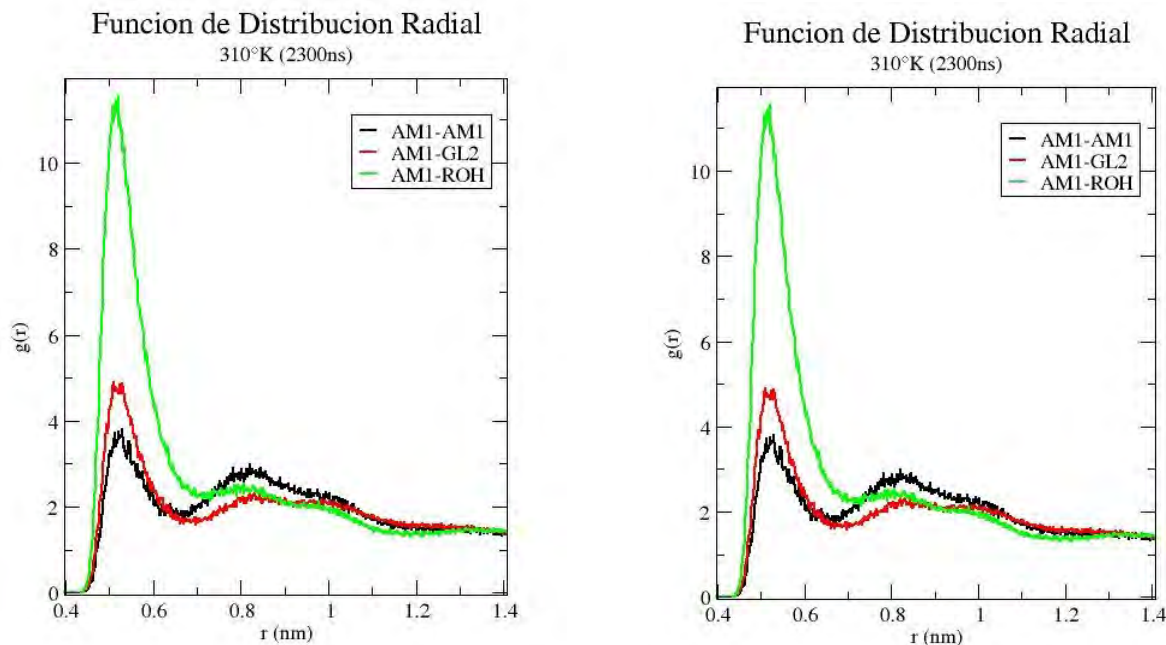


Figura 3.19: Función de Distribución Radial a dos tiempos de simulación diferentes, considerando la pseudo molécula AM1 como punto de referencia para el análisis.

En la figura 3.19 el análisis se hace tomando como punto de referencia a AM1 del SM, GL2 representando a POPC y ROH que es un átomo en la molécula de colesterol. Se escogieron estos por que son los que corresponden a los átomos usados en el modelo de todos los átomos.

En estas dos gráficas se puede ver una mayor afinidad de SM con CHO, que al considerar el lípido como un todo, quizás porque al considerar todo el lípido, SM puede interactuar consigo mismo desde el otro lado y en la cola donde está el átomo AM1 se forma el puente de hidrógeno con el colesterol, por lo general. Este acomodo puede deberse al movimiento rotacional de los fosfolípidos para así acomodarse de manera tal que por un lado de SM tenga un colesterol y en el otro una SM, formándose así un conglomerado de estos agentes.

### 3.2.2. Desplazamiento Cuadrático Medio

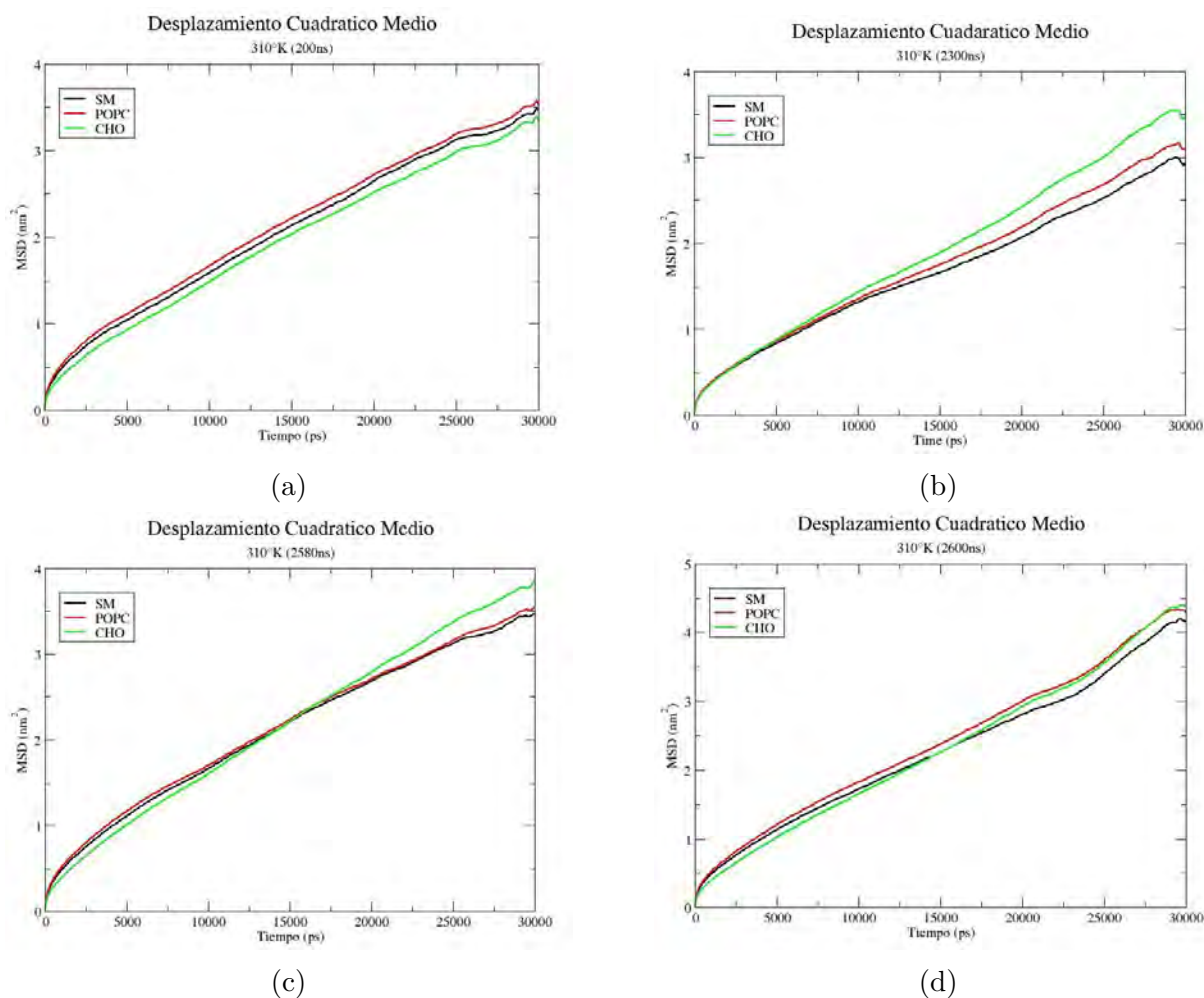


Figura 3.20: Desplazamiento Cuadrático Medio de SM, POPC y CHO a distintos tiempos de simulación.

En la gráfica 3.21a podemos observar un desplazamiento cuadrático medio que crece de manera lineal, correspondiente a una difusión browniana la cual contribuye a la distribución de moléculas de una región con alta concentración molecular a una de baja concentración, esto tiende a homogeneizar el sistema [9].

Después en 3.21b se puede notar que el comportamiento difusivo del colesterol permanece pero los fosfolípidos parecen limitar, al menos un poco su movimiento, lo cual podría deberse a que al difundirse el colesterol existe una interacción con SM ó POPC que es energéticamente favorable tal que se forman cúmulos.

Acorde a [16], incluso una molécula de colesterol es capaz de propiciar el efecto condensador



en SM y se reporta que el colesterol tiende a migrar de regiones con altas concentraciones de colesterol a lugares con baja concentración por lo que, quizá, algunas moléculas de CHO se juntan con SM debido a esta interacción energética favorable y otras continúan difundiéndose en su búsqueda de alejarse de otras moléculas de su misma clase.

Luego en 3.21c los valores de SM, POPC y CHO son muy similares entre si, con mayor desplazamiento cuadrático medio que en el tiempo anteriormente graficado, con una muestra de mayor capacidad difusiva por parte del colesterol en los últimos 10ns de la gráfica. Después a los 3.21d se parece a la gráfica 3.21a pero con la diferencia de que en este caso, en el punto en que la línea verde correspondiente al colesterol, atraviesa la línea negra del SM se ve un pequeño declive en SM, lo cual nuevamente podría deberse a la aglomeración de lípidos con colesterol pero esta vez sólo de SM con CHO.

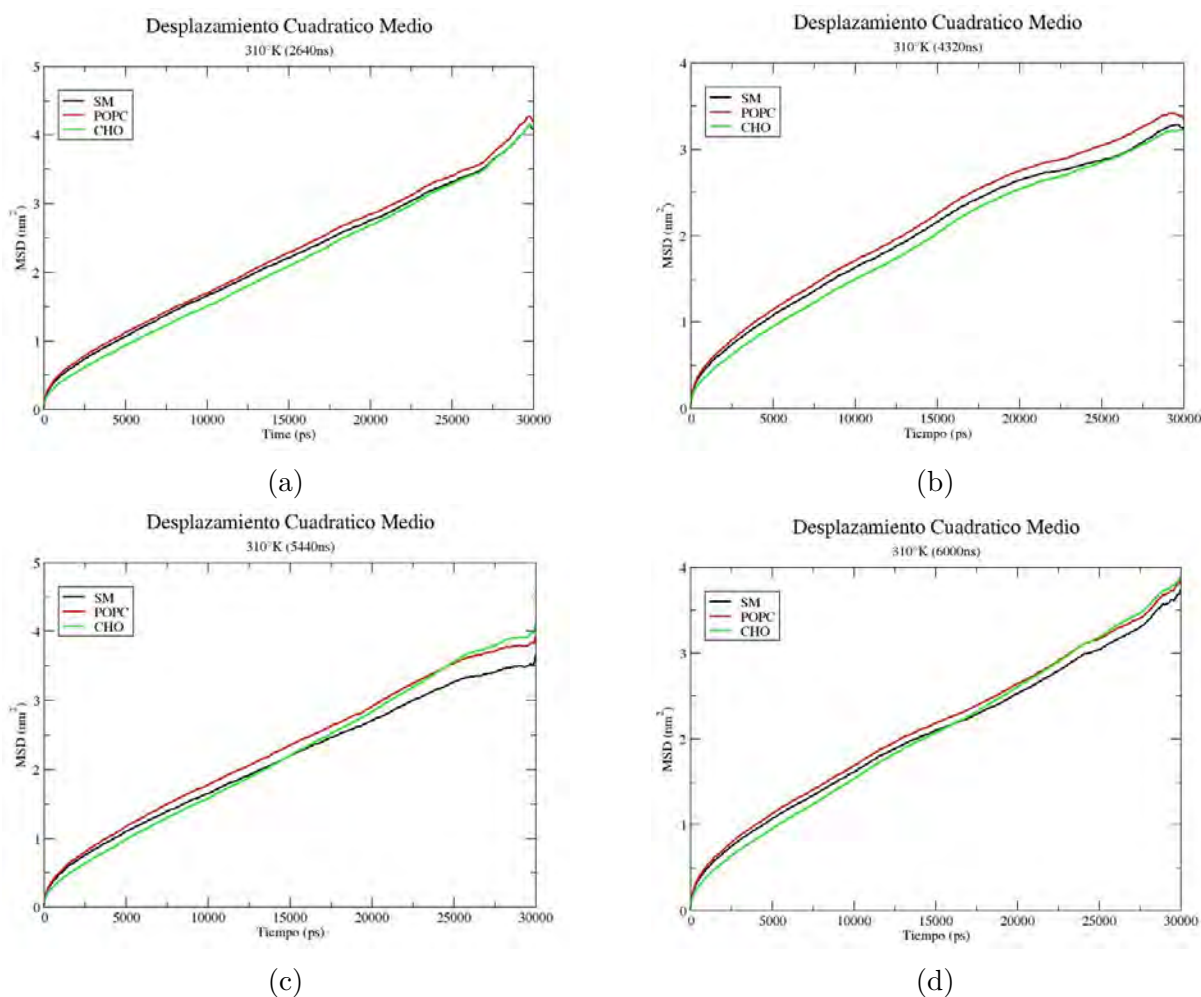


Figura 3.21: Desplazamiento Cuadrático Medio de SM, POPC y CHO a distintos tiempos de simulación.

Ahora se consideraran las cuatros gráficas presentadas en 3.21, la primera a 2640ns vemos una dispersión Browniana similar para los tres componentes, con un ligero incremento al final de CHO para empatar con SM. Después a 4320ns existe menor difusión de los tres y al final una disminución en SM que empata con CHO.

La figura 3.22c muestra como el colesterol se difunde más, casi de la misma manera que el POPC, mientras que SM se mueve menos  $nm^2$  en el momento en que los valores de CHO aumentan.

### 3.2.3. Perfil de Densidad

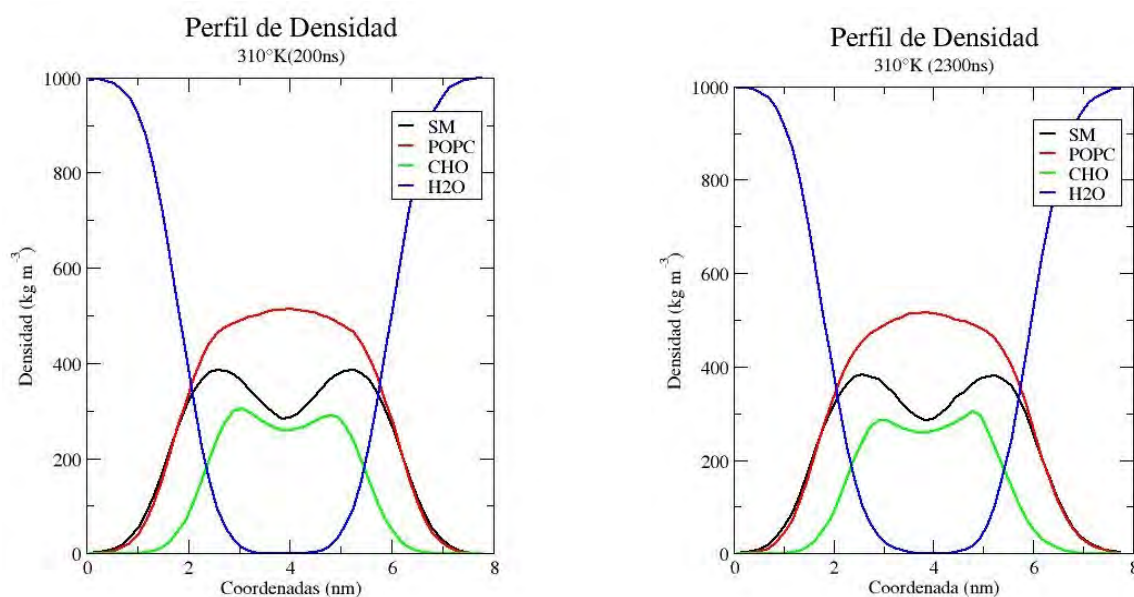
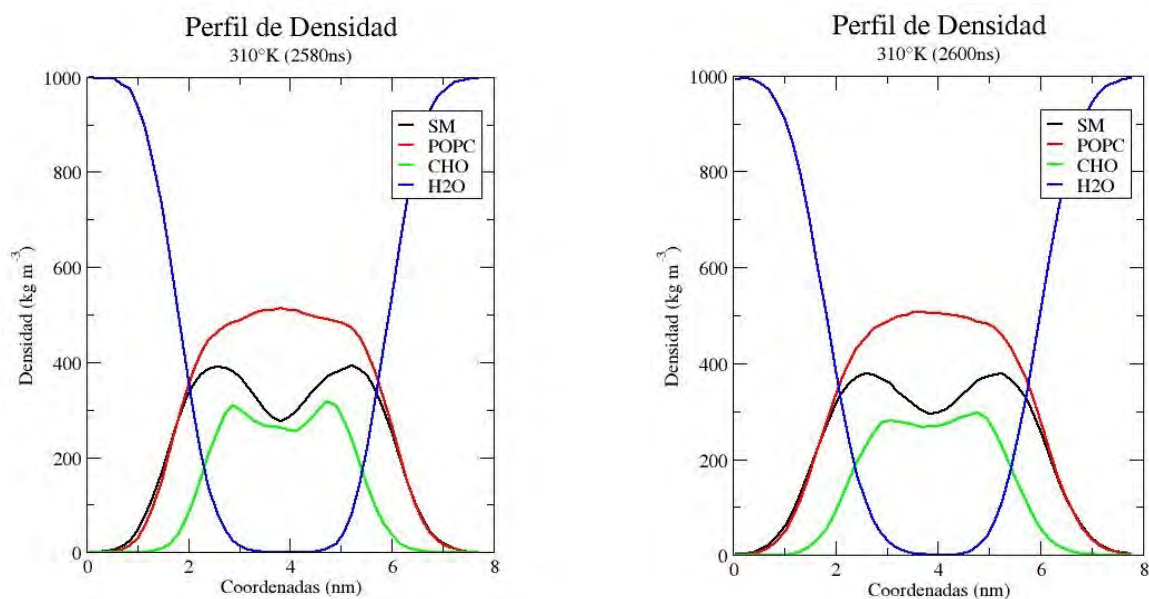


Figura 3.22: Perfil de Densidad a lo largo del eje z.



Ahora pasando a los perfiles de densidad observando el caso a 200ns y a 2300ns de la figura 3.2.3, la única diferencia aparente es la forma en que se distribuye el colesterol en la membrana sobre el eje z, esto podría relacionarse con la migración que muestra el desplazamiento cuadrático medio entre estos dos tiempos.

Después al poner atención a la curva verde en 2580ns podemos ver dos picos aproximadamente equidistantes y con una densidad de probabilidad similar, en cambio a 2600ns los picos se ven ligeramente más achatados y dispersos en el caso de SM y CHO, lo cual apunta a una relación de distribución espacial entre estos dos componentes.

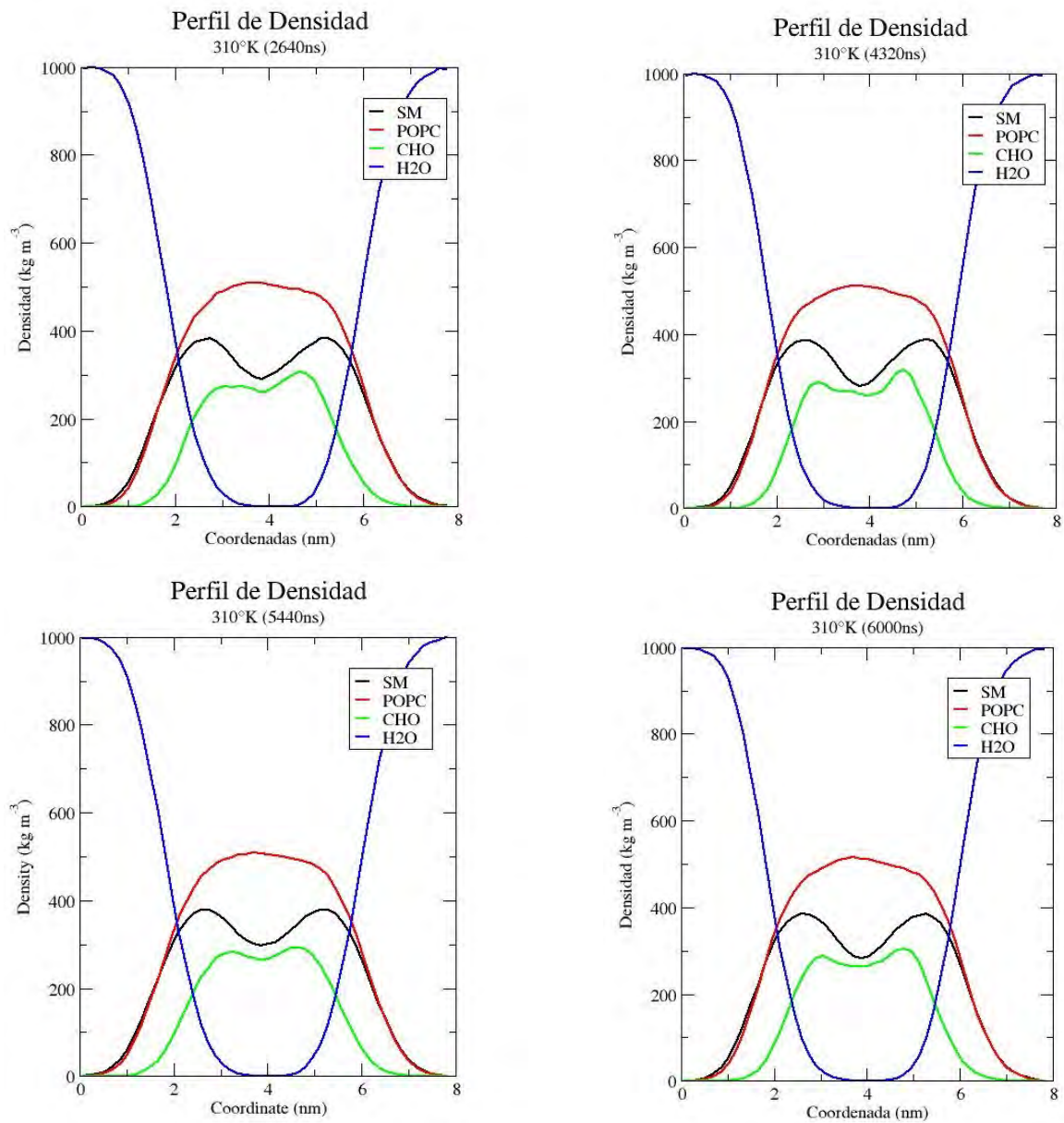


Figura 3.23: Perfil de Densidad a lo largo del eje  $z$ .

Por último los cuatro perfiles de densidad en la figura 3.23, se puede notar variación en la distribución del colesterol en la bicapa pero los demás componentes parecen mantener la forma de la curva y la densidad de probabilidad estática. A 5440 ns donde la mayor densidad del colesterol se concentra en la interface de las dos capas entre 3 y 5 nanómetros, con probabilidad muy similar de estar en una capa que en la otra.

### 3.2.4. Área por Lípido

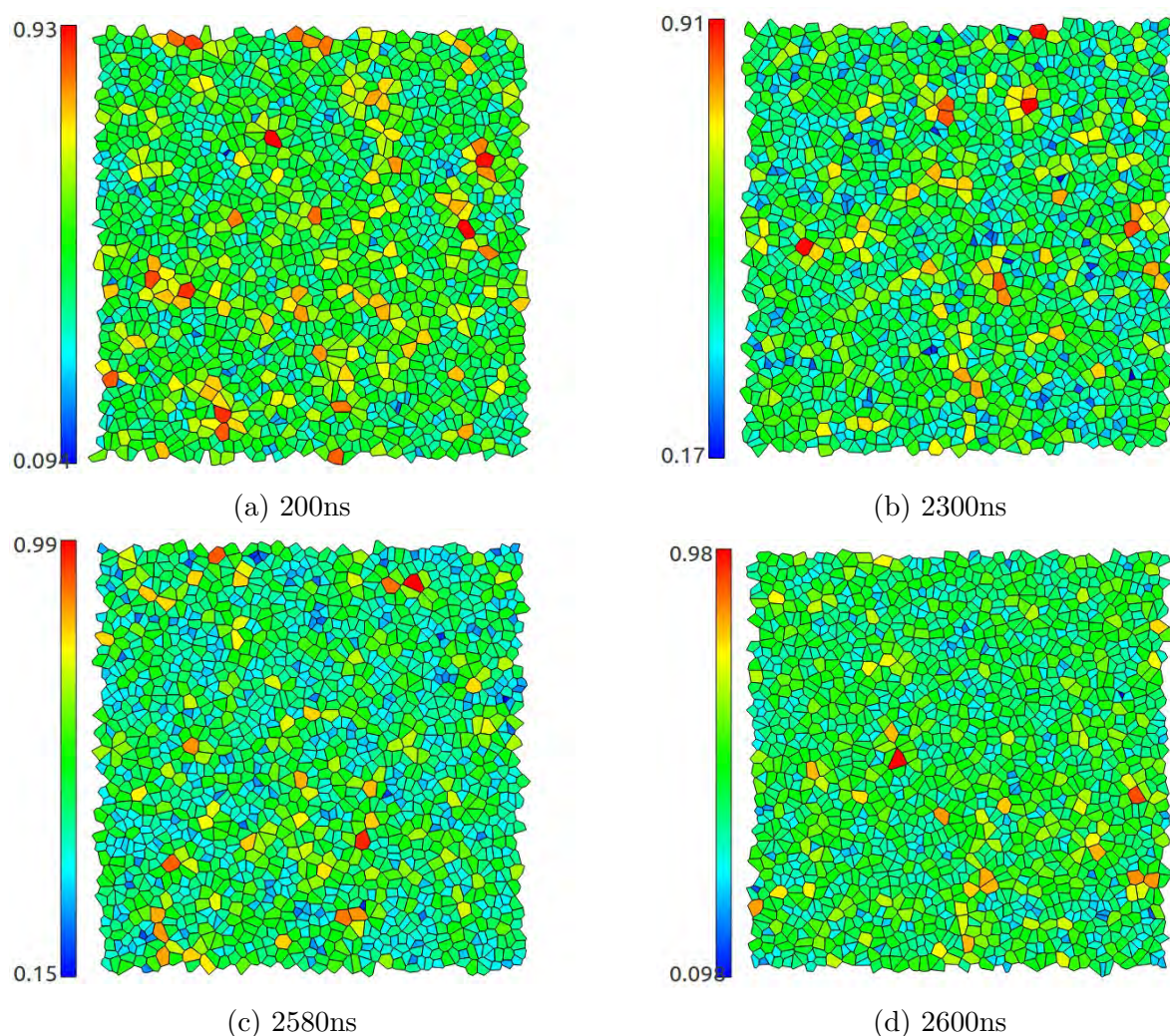


Figura 3.24: Diagramas de Voronoi representando el área por lípido a distintos tiempos de simulación.

Cuadro 3.8: Área Promedio

|      | 200ns           | 2300ns          | 2580ns          | 2600ns          |
|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| CHO  | 0.428712 $nm^2$ | 0.465417 $nm^2$ | 0.445556 $nm^2$ | 0.457093 $nm^2$ |
| SM   | 0.487003 $nm^2$ | 0.462689 $nm^2$ | 0.476548 $nm^2$ | 0.462188 $nm^2$ |
| POPC | 0.49851 $nm^2$  | 0.471505 $nm^2$ | 0.489616 $nm^2$ | 0.475515 $nm^2$ |

Observando la figura 3.24 de 200ns a 2300ns se observa un cambio en el área por lípido representada por cada polígono, mientras al primer tiempo parece haber una distribución primordialmente de zonas verdes, existen ciertas regiones de amarillo y rojo indicándonos una mayor área por lípido en esa zona que en otras de la membrana pero a 2300ns parecen empezar a

formarse mayores zonas de azul oscuro que aunque el menor valor a este tiempo es mayor que el menor a un tiempo anterior, la distribución en el diagrama parece indicar que una mayor cantidad de lípidos están disminuyendo su área, lo cual también se ve reflejado en los valores promedios de los fosfolípidos en la figura 3.8 y un incremento en los valores del colesterol.

Al observar las gráficas inferiores en 3.24 se puede ver que a 2580 aparecen más zonas azul claro distribuidas en el diagrama pero al ver los valores extremos es claro que de las cuatro gráficas en esta figura hasta el momento es la que cuenta con valores más dispersos. Verificando la gráfica (d) la brecha entre mínimo y máximo en este caso crece a comparación del tiempo anterior. Observando la figura 3.8 el comportamiento de los fosfolípidos y el colesterol es similar al del intervalo comparado anteriormente.

### 3.2.5. Espesor de Membrana

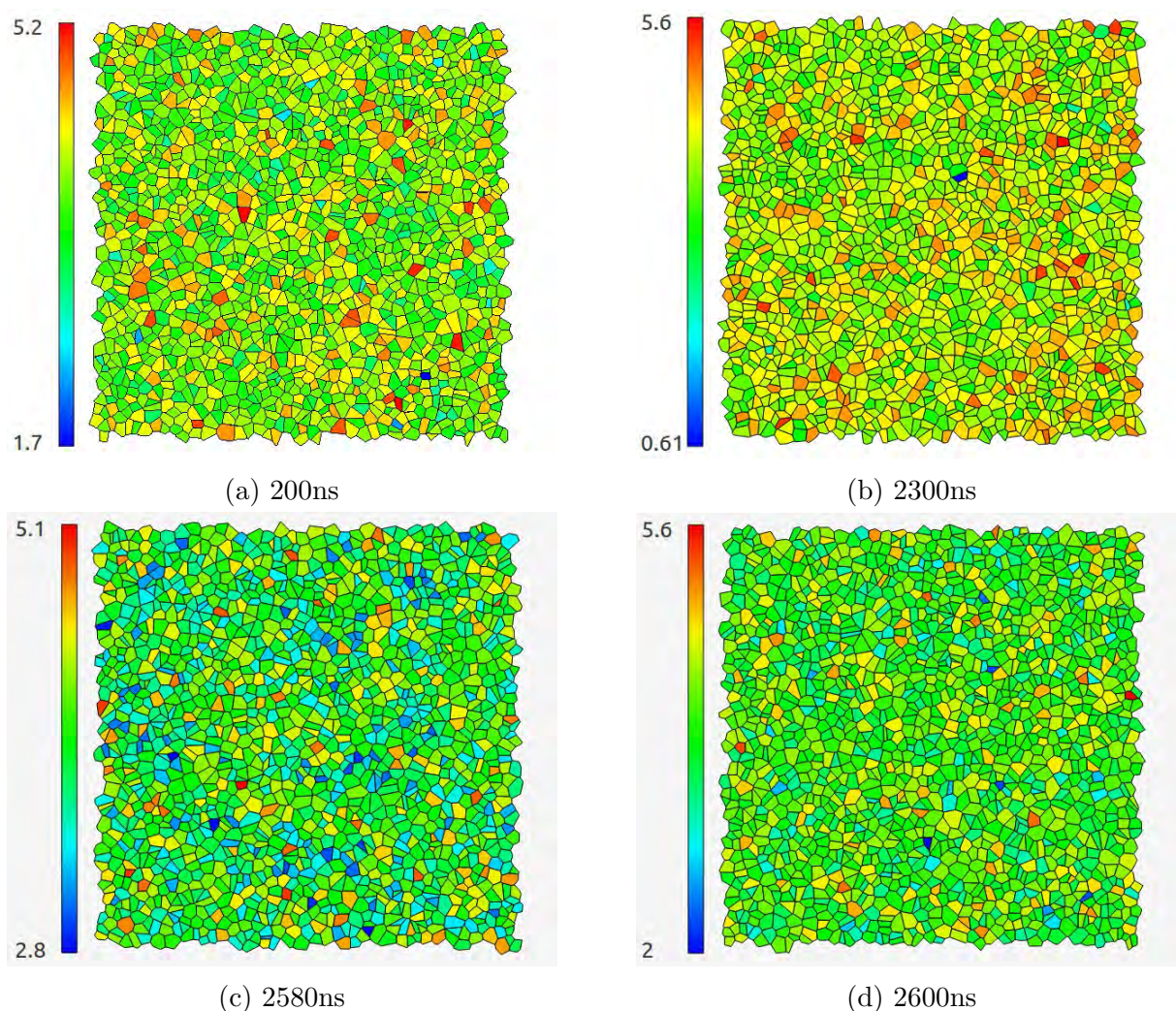


Figura 3.25: Diagrama de Voronoi y Visualización 3D del espesor de la membrana.

Cuadro 3.9: Espesor Promedio de Membrana

|      | 200ns      | 2300ns     | 2580ns     | 2600ns     |
|------|------------|------------|------------|------------|
| CHO  | 3.47356 nm | 3.53648 nm | 3.51739 nm | 3.52995 nm |
| SM   | 4.07108 nm | 4.23195 nm | 4.23819 nm | 4.24464 nm |
| POPC | 4.10381 nm | 4.1949 nm  | 4.14911 nm | 4.14902 nm |

Finalmente se toman en consideración las cuatro gráficas en 3.25 en las que podemos observar a un primer tiempo varias zonas rojas y amarillas indicando mayor espesor de membrana que por ejemplo los que son verde, al avanzar en el tiempo a 2300ns el diagrama parece ser exclusivamente rojo y amarillo para un tiempo posterior a 2580 los espesores disminuyen y muestran

varias zonas azules que no estaban presentes en los diagramas anteriores, 20 nanosegundos después a 2600ns las zonas azules comienzan a desaparecer, lo cual indica que los espesores están aumentando nuevamente. Cuando observamos 3.9 podemos ver que el único valor que parece tener un cambio sustancial es el espesor de SM lo cual podría indicar que este lípido al ser afín al colesterol e intentar protegerlo ensancha sus cabezas, acorde al modelo del paraguas y es por eso que el espesor promedio de este ente crece en mayor medida que el de POPC.



# Capítulo 4

## Conclusiones

En los capítulos anteriores se hizo una descripción de antecedentes útiles para relacionarlos con la fase de líquido ordenado la cual guarda relación con las balsas lipídicas en el experimento, balsas que son conglomerados o paquetes unidos por el colesterol.

Después se presentó una serie de resultados para distintas propiedades de la membrana con la idea de dilucidar la fase  $L_o$  al comparar los distintos análisis con la teoría presentada, para así tener una idea clara de todas las propiedades del sistema y si estas se asimilan a las descritas en la literatura [7], [10], [16], [20], [21], [24].

Acorde a lo observado en la función de distribución radial podemos concluir que existe una correlación entre SM y CHO, la cual guarda una aparente relación con el número de puentes de hidrógeno, ya que la estructura, a distintos tiempos de simulación, indica que existe una mayor probabilidad de que SM y CHO estén cerca uno del otro, que el que muestran otros pares. En el caso de formación de puentes de hidrógeno de los fosfolípidos con el colesterol se ve que existe un mayor número de puentes para SM-CHO que POPC-CHO lo que apoya la teoría de que los puentes de hidrógeno son una de las motivaciones para que se formen cúmulos de SM-CHO, que guardan relación con la fase de líquido ordenado.

También se debe destacar que tanto los perfiles de densidad como la medición del desplazamiento cuadrático medio nos indican un sistema dinámico con aparentes estados de arresto a

---

distintos tiempos de simulación, aunado esto a la disminución del área por lípido para ciertos componentes a causa del efecto condensador del colesterol, propiciando así una fase más ordenada al compactar las colas, esto nos da un vestigio de la formación y desestabilización de los paquetes que asociamos a la fase  $L_o$ .

Los parámetros de orden no cambian a distintos tiempos de simulación, situación que parece indicar que las colas de SM permanecen bastante ordenadas con respecto a la normal a todo tiempo. Por estos resultados la formación de aglomerados es factible y podría continuarse investigando la dinámica del sistema pero incluyendo una proteína, que en ciertos casos ayuda a la formación de balsas para su transporte. También puede incluirse ciclodextrina que es un agente capaz de extraer colesterol de la membrana, lo cual podría ayudarnos a diferenciar la dinámica del sistema con y sin colesterol.

Por último se pueden usar diagramas de Voronoi para identificar de manera visual si existen conglomerados de SM con CHO y si estos se separan del POPC para así ayudarnos a discernir si se da la coexistencia de estas dos fases de acuerdo a los parámetros que estamos utilizando.

# Bibliografía

- [1] Klaus Gawrisch Alexander J. Sodt Michael Logan Sandar. «The Molecular Structure of the Liquid-Ordered Phase of Lipid Bilayers». En: *American Chemical Society* 136 (2013), 725732.
- [2] M.P. Allen y D.J. Tildesley. *Computer Simulation of Liquids*. Vol. 1. Clarendon Press, 2006.
- [3] Aleksandre Fedorov Rodrigo F. M. de Almeida y Manuel Prieto. «Sphingomyelin/Phosphatidylcholine Phase Diagram: Boundaries and Composition of Lipid Rafts». En: *Biophysical Journal* 85.4 (2003), 2406–2416.
- [4] Alicia Alonso Aritz B. García-Arribas y Felix M. Goñi. «Cholesterol interactions with ceramide and sphingomyelin». En: *Chemistry and Physics of Lipids* 199 (2016), págs. 26-34.
- [5] Sarah L. Veatch Aurelia R. Honerkamp-Smith y Sarah L. Keller. «An introduction to critical points for biophysicists; observations of compositional heterogeneity in lipid membranes». En: *Biochimica et Biophysica Acta* 1788 (2009), 53–63.
- [6] Trzesniak-D. de Vries A. H. Elsener A. Marrink S. J. van Gunsteren W. F. Baron R. «Comparison of thermodynamic properties of coarse-grained and atomic-level simulation models». En: *ChemPhysChem* 8.3 (2007), págs. 452-461.
- [7] Max L. Berkowitz. «Detailed molecular dynamics simulations of model biological membranes containing cholesterol». En: *Biochimica et Biophysica Acta* 1788 (2008), 86–96.
- [8] Andreas Heuer Davit Hakobyan. «Key Molecular Requirements for Raft Formation in Lipid/Cholesterol Membranes». En: *PLOS One* 9.2 (2014), págs. 1-11.

- [9] Herve Rigneault Didier Marguet Pierre-Francois y Hai-Tao He. «Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order». En: *The EMBO Journal* 25.15 (2006), 3446–3457.
- [10] Gerald W Feigenson. «Phase behavior of lipid mixtures». En: *Nature Chemical Biology* 2.11 (2006), págs. 560-564.
- [11] G.W. Feigenson. «Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures.» En: *Biochimica et Biophysica Acta* 1788 (2009), 47–52.
- [12] Asanga Bandara Afra Panahi George A. Pantelopulos Tetsuro Nagai y John E. Straub. «Critical size dependence of domain formation observed in coarse-grained simulations of bilayers composed of ternary lipid mixtures». En: *The Journal of Chemical Physics* 147.9 (2017), págs. 1-9.
- [13] Juyang Huang y Gerald W. Feigenson. «A Microscopic Interaction Model of Maximum Solubility of Cholesterol in Lipid Bilayers». En: *Biophysical Journal* 76 (1999), 21422157.
- [14] Björn Sommer Gunther Lukat Jens Krüger. «APL@Voro: A Voronoi-Based Membrane Analysis Tool for GROMACS Trajectories». En: *Journal of Chemical Information and Modeling* 53 (2013), 29082925.
- [15] Andrew Jackson Jeremy Pencer y John Katsaras. «Lipid Bilayer Structure Determined by the Simultaneous Analysis of Neutron and X-Ray Scattering Data». En: *Biophysical Journal* 95 (2008), 2356–2367.
- [16] Milan Hodošček Jernej Zidar Franci Merzel. «Liquid-Ordered Phase Formation in Cholesterol/Sphingomyelin Bilayers: All-Atom Molecular Dynamics Simulations». En: *The Journal of Physical Chemistry* 113.48 (2009), 15795–15802.
- [17] S Levental I. Veatch. «The continuing mystery of lipid rafts». En: *Journal of Molecular Biology* (2016), 1–23.
- [18] K. Jacobson M. Levi y E. Gratton. «Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes». En: *Biophysical Journal* 80 (2001), 1417–1428.

- [19] Gloria Arlette Méndez Maldonado. «Estudio de las Propiedades Estructurales de una Suspensión Iónica Bidimensional». Tesis doct. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2008.
- [20] Derek Marsh. «Cholesterol-induced fluid membrane domains: A compendium of lipid-raft ternary phase diagrams». En: *Biochimica et Biophysica Acta* 1788 (2009), 2114–2123.
- [21] Jian Dai Mohammad Alwarawrah y Juyang Huang. «A Molecular View of the Cholesterol Condensing Effect in DOPC Lipid Bilayers». En: *The Journal of Physical Chemistry* 114.22 (2010), págs. 7516-7523.
- [22] G. Hunt N. Jain y G.W. Feigenson. «Phase studies of model biomembranes: macroscopic coexistence of L+L , with light-induced coexistence of L+Lo phases». En: *Biochimica et Biophysica Acta* 1768 (2007), 2777–2786.
- [23] R. W. Pastor y Jr. A. D. MacKerell. «Development of the CHARMM Force Field for Lipids». En: *The Journal of Physical Chemistry Letters* 2 (2011), págs. 1526-1532.
- [24] Anne Hinderliter Paulo F.F. Almeida Antje Pokorny. «Thermodynamics of membrane domains». En: *Biochimica et Biophysica Acta* 1720 (2005), 1–13.
- [25] y Eric Jakobsson R. Jay Mashl y H. L. Scott. «Sphingomyelin-Cholesterol Domains in Phospholipid Membranes: Atomistic Simulation». En: *Biophysical Journal* 87.9 (2004), 1092–1100.
- [26] Tomasz Róg y Marta Pasenkiewicz-Gierula. «Cholesterol-Sphingomyelin Interactions: A Molecular Dynamics Simulation Study». En: *Biophysical Journal* 91 (2006), 3756–3767.
- [27] S. L. Soo. «Fluid Dynamics of Multiphase System». En: 1 (1967), págs. 1-5.
- [28] W. F. Drew Bennett Svetlana Baoukina Eduardo Mendez-Villuendas y D. Peter Tieleman. «Computer simulations of the phase separation in model membranes». En: *The Royal Society of Chemistry* 161 (2012), 63–75.
- [29] Sarah L. Veatch y Sarah L. Keller. «Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol». En: *Biophysical Journal* 85 (2003), 3074–3083.

- [30] Justin Legleiter Yufeng Liu y John F. Nagle. «Structure of Gel Phase DMPC Determined by X-Ray Diffraction». En: *Biophysical Journal* 83 (2002), 3324 –3335.