



TÍTULO

ACUMULACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN MEMBRANA
DE ESFINGOMIELINA

AUTORA

María Isabel Cabrera González

Tutores
Instituciones
Curso
©
©
Fecha
documento

Esta edición electrónica ha sido realizada en 2023

Dr. D. Pablo Llombart González; Dr. D. Juan Luis Aragonés Gómez
Universidad Internacional de Andalucía; Universidad de Huelva
Máster en Simulación molecular (2021-2022)

María Isabel Cabrera González

De esta edición: Universidad Internacional de Andalucía

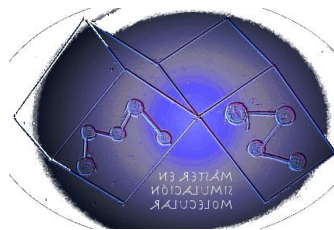
2022



**Atribución-NoComercial-SinDerivadas
4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)**

Para más información:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.en>



ACUMULACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN MEMBRANA DE ESFINGOMIELINA

María Isabel Cabrera González

Trabajo entregado para la obtención del grado de Máster en
Simulación Molecular

Julio 2021

Director:

Pablo Llombart González

Codirector:

Juan Luis Aragonés Gómez

RESUMEN

La simulación molecular de membranas biológicas está en pleno auge, gracias al desarrollo de la tecnología y las inquietudes del colectivo científico en dilucidar el comportamiento real de las membranas celulares. No obstante, poco se sabe acerca de las interacciones de ácidos grasos de cadena larga (VLCFAs) con las membranas biológicas. Este estudio puede jugar un papel importante en el conocimiento sobre las interacciones en la membrana.

El objetivo principal de este trabajo es analizar cómo VLCFA se adapta estructuralmente a una bicapa fluida de esfingomielina (SMP), a diferentes concentraciones de VLCFAs. Concretamente, se seleccionaron C26:0-lisofosfatidilcolina (C26) y C24:0-lisofosfatidilcolina (C24) debido a que su acumulación es característica en enfermedades del metabolismo lipídico. Para ello, se estudiaron las propiedades membranales a concentraciones crecientes de C24, C26 (0.1, 0.2 y 0.3 en cada uno) y en presencia de ambos (0.1-0.1, 0.1-0.2 y 0.2-0.1 en C24, C26 respectivamente) para la membrana de SMP. En cuanto a la temperatura, se empleó 310 K, para tratar de simular las condiciones de una membrana celular en un organismo vivo.

En cuanto al entorno experimental, se accedió a la máquina "Camaragibe" de los ordenadores de la Universidad Complutense de Madrid a distancia. Se empleó el paquete de software libre GROMACS y el campo de fuerza GOMOS-54A7 para los lípidos y SPC para el agua. En dicho entorno, se analizaron perfiles de densidad, área por lípido y fluctuaciones de membrana.

Concentraciones crecientes de ambos ácidos grasos modifican la densidad, fluctuación, ancho y área por lípido de la membrana, disminuyendo permeabilidad y aumentando la compactación lipídica. Concentraciones elevadas están vinculadas a la interdigitación de C24 y C26 en el espacio intermonocapa, exhibiendo un probable desajuste hidrofóbico e interacción de ambos VLCFAs con ambas monocapas.

Nuestros resultados generan una visión inicial para establecer una relación entre acúmulo de VLCFAs y las propiedades membranales, muerte celular y fisiopatología propia de enfermedades del metabolismo lipídico.

ABSTRACT

The molecular simulation of biological membranes is booming, thanks to the development of technology and the concerns of the scientific community in elucidating the real behavior of cell membranes. However, little is known about the interactions of long-chain fatty acids (VLCFAs) with biological membranes. This study can play an important role in understanding membrane interactions.

The main objective of this work is to analyze how VLCFA structurally adapts to a fluid sphingomyelin bilayer (SMP), at different concentrations of VLCFAs. Specifically, C26:0-lysophosphatidylcholine (C26) and C24:0-lysophosphatidylcholine (C24) were selected because their accumulation is characteristic of lipid metabolism diseases. For this, the membrane properties were studied at increasing concentrations of C24, C26 (0.1, 0.2 and 0.3 in each) and in the presence of both (0.1-0.1, 0.1-0.2 and 0.2-0.1 in C24, C26 respectively) for the SMP membrane. Regarding the temperature, 310 K was used, to try to simulate the conditions of a cell membrane in a living organism.

Regarding the experimental environment, the "Camaragibe" machine of the computers of the Complutense University of Madrid was accessed remotely. The GROMACS free software package and the GOMOS-54A7 force field were used for lipids and SPC for water. In said environment, density profiles, area per lipid and membrane fluctuations were analyzed.

Increasing concentrations of both fatty acids modify the density, fluctuation, width and area per lipid of the membrane, decreasing permeability and increasing lipid compaction. High concentrations are linked to the interdigitation of C24 and C26 in the intermonolayer space, exhibiting a probable hydrophobic mismatch and interaction of both VLCFAs with both monolayers.

Our results generate an initial vision to establish a relationship between the accumulation of VLCFAs and membrane properties, cell death and the pathophysiology of lipid metabolism diseases.

Agradecimientos

Gracias a Pablo Llombart por haberme dirigido este trabajo y por haber confiado en mí.

Gracias a todos los profesores por dar su apoyo incondicional y por transmitir su pasión por la dinámica y simulación molecular.

Gracias al centro computacional de la Universidad Complutense de Madrid, por haber ofrecido el acceso a la máquina Camaragibe para el desarrollo de este trabajo.

Y sobre todo gracias a mis padres, hermanas, pareja y amigos que siempre han sido mi apoyo en mi trayectoria universitaria.

*La mente es como un paracaídas:
sólo funciona si se abre.
Albert Einstein.*

INDICE

1. Introducción.....	8
1.1 Motivación del estudio de las membranas lipídicas.....	8
1.2. Importancia de la simulación molecular en membranas lipídicas.....	10
1.3. Objetivos.....	12
2. Materiales y métodos.....	12
2.1 Cálculo de área por lípido.....	14
2.2 Perfil de densidad.....	14
2.3 Distribución de probabilidad de la fluctuación de membrana.....	14
3. Resultados.....	15
3.1 Área por lípido.....	15
3.2 Perfiles de densidad.....	17
3.3 Distribución de probabilidad intrínseca de la altura de la interfase.....	21
4. Discusión.....	24
5. Conclusiones.....	26
6. Bibliografía.....	27

1. Introducción

1.1 Motivación del estudio de las membranas lipídicas

Desde pequeña me ha gustado preguntarme acerca del por qué de las cosas, desde los aspectos más generales a los más particulares. Este carácter inquieto que me define me hace querer saber cada día más cosas, preguntar a cerca de la naturaleza, el entorno, el ser humano y los fenómenos que le rodean. Tal y como defiende la filosofía platónica, pretendiendo buscar la verdad más que pretender poseerla, siempre abierta a nuevas perspectivas y realidades. Partícipe de analizar nuevos argumentos y explicaciones, adoptando siempre una actitud crítica ante ellos.

Muchas veces se dan por hecho fenómenos de la naturaleza como obvios, llegando incluso a creer que hemos alcanzado certezas absolutas sobre el funcionamiento de las cosas, ya que a simple vista parecen sencillas y claras ante nuestros ojos. Se considera que entendemos completamente el funcionamiento de enfermedades, catástrofes naturales, comportamientos animales, fenómenos meteorológicos, así como otras realidades. Pero, ¿qué hay detrás de estos fenómenos?, ¿se ha llegado a la esencia de la cuestión? para ello las disciplinas como la química, biología y, en especial, matemáticas y física, nos permiten acercarnos más a ellos.

El cuerpo humano es un sistema complejo, y más lo son algunas enfermedades que le amenazan. La Bioquímica y Biología Molecular se encarga de estudiar la composición química de los seres vivos, en especial las moléculas que componen células y tejidos. La formación académica en el grado en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad de Málaga, el desarrollo de mi tesis doctoral en detección precoz y tratamiento de niños afectados por adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (ALD-X) y mis inquietudes biofísicas han permitido el desarrollo de este trabajo.

Gracias a las asignaturas de este máster como <<bases físicas y químicas de la termodinámica y mecánica estadística>> me han permitido adquirir las bases físicas de sistemas macroscópicos a través de su estructura microscópica, entender las diferencias entre los posibles colectivos estadísticos, así como conocer la aplicación de la mecánica estadística y termodinámica. Las metodologías computacionales y técnicas de simulación han sido el pilar para utilizar los algoritmos de análisis de estructuras moleculares y herramientas a aplicar en dinámica molecular.

Por ello, en el presente trabajo se pretende conocer el comportamiento de una membrana de esfingomielina a concentraciones crecientes de ácidos grasos de cadena larga, en especial ácido graso tetracosanoico (C24:0) y hexacosanoico (C26:0) ligados a lisofosfatidilcolina (LPC), C24:0-LPC y C26:0-LPC respectivamente, biomarcadores de la enfermedad ALD-X.

1.2 Importancia de la simulación molecular en membranas lipídicas

Los esfingolípidos, cuya base es el glicerol, se constituyen a partir de una molécula de esfingosina. Dentro de este grupo, las esfingomielinas (SMPs) son las más comunes, las cuales poseen cabezas polares de fosfatidilcolina (PC) o fosfatidiletanolamina (PE). Los esfingolípidos son los componentes principales de las células nerviosas y tienen funciones esenciales en el reconocimiento y diferenciación celular. La SMP es un precursor metabólico de la ceramida, componente que en membranas de esfingomielina tienden a reducir la fluidez y de la membrana. La presencia de ceramidas provoca la disminución de la movilidad de proteínas y otro tipo de componentes embebidos en la membrana.

Los ácidos grasos de cadena larga (VLCFAs) están presentes, en condiciones normales, en pequeñas cantidades en las membranas celulares. No obstante, en algunas enfermedades neurodegenerativas graves, como la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (ALD-X), el síndrome de Zellweger y la diabetes tipo II existe una acumulación de VLCFAs en concentraciones anormalmente altas (Ferdinandusse et al. 2017). En cuanto a la ALD-X, la cantidad de VLCFAs saturados en plasma constituye alrededor del 3,1% del total de ácidos grasos para personas sanas y 4,8% del total para pacientes con ALD-X, acumulándose en especial C26:0-LPC y C24:0-LPC. Este aumento de VLCFAs parece traducirse en un aumento de la viscosidad de las membranas de los eritrocitos en esos pacientes (Knazek et al. 1983).

Por todo ello, estos indicios indican que la dinámica celular de las membranas con acúmulo de VLCFA es distinta a la dinámica de una membrana normal y por tanto las propiedades mecánicas también se verán modificadas.

Las bicapas lipídicas constituyen la principal barrera celular que comunica el medio intracelular con su entorno más próximo, bloqueando el flujo de agua y solutos, regulados a su vez por las proteínas transmembrana. La variedad de lípidos y su organización espacial definen las propiedades mecánicas de la membrana, ejerciendo un importante papel en la función celular. Por ejemplo, la longitud y el grado de saturación de las cadenas acilo determinan en grosor y la hidrofobicidad de la membrana. Ésta presenta una gran variedad de propiedades físicas, las cuales modulan la señalización celular y función proteica (Sato y Feix, 2006).

Se ha demostrado que la diferencia estructural entre las monocapas y diferentes zonas de la bicapa, junto con la deformación de esta, pueden alterar las actividades de las proteínas membranales, ya sean canales proteicos o proteínas de unión a la membrana periférica. La composición química de las dos monocapas de la membrana son diferentes entre sí, por ejemplo, casi todos los lípidos aniónicos en las células eucarióticas se enfrentan en el citoplasma, mientras que los lípidos asociados a grupos glicosilados están expuestos al medio extracelular. La bicapa de una célula eucariota típica tiene un espesor de unos 5 nm y un área de cientos de micrómetros cuadrados. A lo largo de la membrana, esta puede contener cientos de tipos de lípidos diferentes. Estos tipos de lípidos en la monocapa interna y externa son muy diferentes (Sato y Feix, 2006). Esta asimetría lipídica no se conserva entre células, orgánulos y organismos, cambiando la distribución lipídica en diferentes estados de actividad. El desorden lipídico se introduce por diferencias en la longitud de la cadena y la saturación de las cadenas hidrofóbicas en el interior de la membrana y la distribución lateral de diversos lípidos de cada monocapa.

Este hecho hace que las fuerzas laterales y transversales dentro de la bicapa, que son muy significativas, se modifican a medida que la membrana se dobla, estira, o incluso cuando se agregan, eliminan o modifican nuevos componentes. La membrana celular tiende a mantener una densidad específica de empaquetamiento lipídico y por ello la presión superficial óptima está al orden de $30 \frac{mN}{m}$. Esta se puede tensar por encima de su estado óptimo, por ejemplo, cuando aumenta el espacio interlipídico por difusión osmótica, llevando a la ruptura de la membrana. Otro factor relevante es el emparejamiento hidrofóbico entre las dos monocapas (interdigitación). Es un carácter esencial en la estabilidad de membranas. Para ello, la longitud de los segmentos hidrofóbicos de los diversos componentes deben coincidir para crear un núcleo apolar consistente. Existen autores que defienden como la coincidencia hidrofóbica afecta a su configuración estructural (Mouritsen y Bloom, 1984). Así, la coincidencia hidrofóbica entre los lípidos de la membrana y la modulación del grosor de la bicapa por la presencia de otros lípidos u proteínas demuestra la formación de dominios estructurales que influyen en distintos procesos fisiológicos (Sonnino y Prinetti, 2013).

Por otra parte, la permeabilidad, comportamiento y propiedades mecánicas de las membranas se han estudiado incluso antes de conocer que las membranas eran bicapas. Durante el siglo XIX Pfeffer estudió la ósmosis de las células vegetales en 1877, van't Hoff desarrolló la teoría osmótica en 1887 y Overton formuló la relación entre el transporte pasivo de un soluto y su solubilidad en aceite en 1898 (Filkenstein, 1987; Kleinzeller, 1999). Aunque a nivel tecnológico es posible caracterizar las bicapas a nivel experimental, en ocasiones la resolución espacial de las técnicas no es la suficiente para alcanzar el nivel microscópico. Por esto hoy en día, las simulaciones de dinámica molecular se han convertido en un método

establecido para comprender y ayudar a predecir procesos importantes a nivel molecular (Song et al., 2022).

1.3 Objetivos

- Preparar entornos de simulación para una membrana de esfingomielina a concentraciones crecientes de C26 y C24.
- Estudiar las propiedades biofísicas de una membrana de esfingomielina a medida que aumentan dichos VLCFA con el software GROMACS
- Obtener propiedades de la membrana a partir los perfiles de densidad, área por lípido y la determinación de la interfase SMP-agua.

2. Materiales y métodos

En este trabajo hemos realizado simulaciones de Dinámica Molecular (DM) para la membrana de SMP a la que le hemos insertado diferentes concentraciones de dos tipos de ácidos grasos de cadena larga (C24 y C26). Para ello, colocamos las moléculas de SMP en dos monocapas, dispuestas en una red triangular en el plano (x,y) y alineadas en el eje z. Para insertar las impurezas de C24 y C26, reemplazamos de forma aleatoria una molécula de SMP por una de C2X a las fracciones molares que aparecen en la tabla X. Las moléculas que conforman la membrana son modeladas empleando el campo de fuerzas GROMOS-54a7. Este modelo es un modelo flexible y no polarizable. A continuación, el sistema es solvatado con moléculas de agua SPC y simulado durante 15 ns a 310K y 1 bar. Para llevar a cabo la DM, fijamos la temperatura y la presión usando el termostato v-rescaling y el baróstato de Berendsen (Gunsteren & Berendsen, 1987) Las ecuaciones del movimiento son integradas mediante el algoritmo de leap-frog con un paso de integración de 2 fs.

Las interacciones de corto alcance son truncadas a un radio de corte de 1.2 nm. Por último, resolvemos las interacciones electrostáticas mediante el método Particle Mesh Ewald (PME), (Petersen, 1995). Estos algoritmos están implementados de manera eficiente en el paquete GROMACS (Lindahl, Hess & Van Der Spoel., 2001) El ordenador empleado posee 8 procesadores y 1 GPU, por lo que de forma paralela se pueden lanzar tandas de 4 simulaciones, no obstante, para no colapsar el sistema se lanzaron en tandas de 3 simulaciones. Cada simulación tarda un largo periodo de tiempo en finalizar, unos tres días por simulación de manera que se llevaron a cabo todas las simulaciones en 4 semanas.

En la tabla 1, tabla 2 y tabla 3 se representa el número de moléculas de SMP, C24 y C26 empleado para simular diferentes concentraciones de éstos VLCFA en la membrana de esfingomielina.

Fracción C24 / SMP	C24 en SMP	
	Nº de moléculas	
	C24	SMP
0.1	28	260
0.2	57	231
0.3	86	202

Tabla 1. Número de moléculas de C24 y SMP para diferentes concentraciones de C24.

Fracción C26 / SMP	C26 en SMP	
	Nº de moléculas	
	C26	SMP
0.1	28	260
0.2	57	231
0.3	86	202

Tabla 2. Número de moléculas de C26 y SMP para diferentes concentraciones de C26.

Fracción C24 C26 / SMP	C24 -C26 en SMP	
	Nº de moléculas	
	C24	C26
0.1-0.1	28	28
0.1-0.2	28	57
0.1-0.2	58	27

Tabla 3. Número de moléculas C24, C26 y SMP para diferentes concentraciones de la mezcla C24:0-LPC y C26:0-LPC. **Nº SMP = 288 – (C24 + C26)**

2.1 Cálculo de área por lípido

En primer lugar, se estudió el área por lípido una vez establecido el equilibrio del sistema, no desde el inicio. Esta propiedad es de muy fácil acceso ya que basta multiplicar las dimensiones de los valores de red de equilibrio del plano (x,y) y dividirlo por el número de lípidos en cada monocapa (144 lípidos).

2.2 Perfiles de densidad

Para calcular los perfiles de densidad basta con hacer un histograma en el eje z de las posiciones de cada átomo y pesarlo por su masa y el volumen (intervalo en z del cajón del histograma multiplicado por el área de la bicapa). Se obtuvieron los valores de densidad para la membrana de esfingomielina, C24 y C26 y mezcla de ambos a diferentes concentraciones, así como la densidad del agua en el sistema.

2.3 Distribución de probabilidad de la fluctuación de membrana

Hemos determinado la altura de la membrana de forma local, $h(x,y)$ (figura 1) . Para ello, en el plano donde se encuentra la bicapa generamos una malla de 30x30 puntos. En cada punto de la malla identificamos cuales son los átomos de la bicapa más externos. Esto se hace ordenando de mayor a menor el valor de la posición z de todos los átomos que hay alrededor de un radio de 1 nm de cada punto de la malla.

Para determinar la altura superior de la membrana promediamos la posición z de los 4 primeros átomos, y para la inferior los 4 últimos valores de la lista. Una vez conocemos $h(x,y)$ en los N puntos de la malla, podemos calcular el valor promedio, $\langle h \rangle$, como el sumatorio de todos los $h(x,y)$ y dividirlo por el numero de puntos totales. A cada valor local de $h(x,y)$ le restamos el valor de $\langle h \rangle$ y calculamos la distribución de probabilidad de esta diferencia. Esta propiedad se puede relacionar con la tensión superficial a partir de la teoría de ondas capilares.

Para todos los promedios se analizaron 300 configuraciones de producción a partir del tiempo de equilibrado de 7.5 ns.

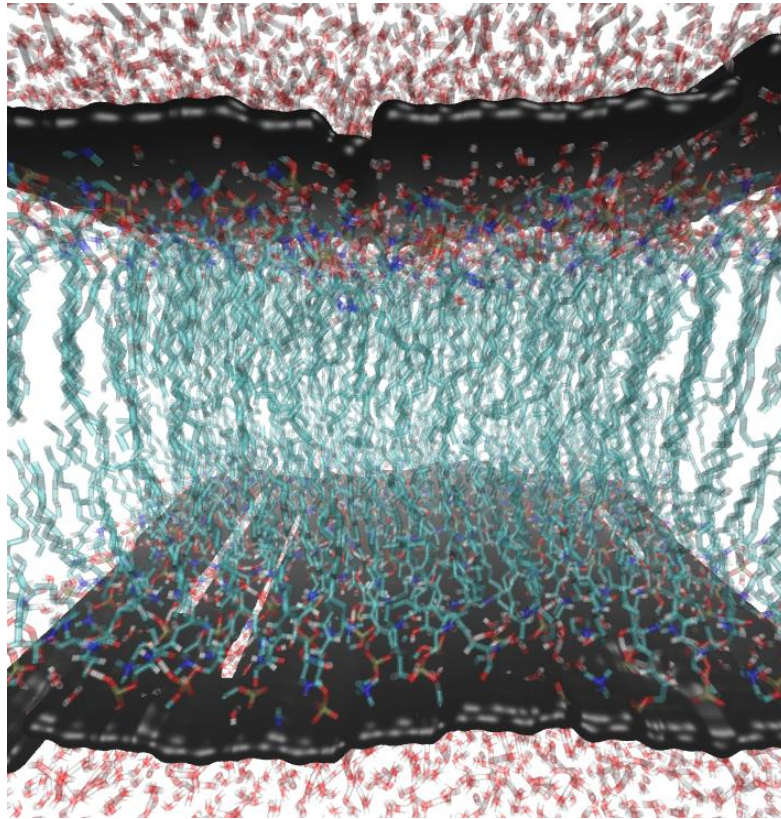


Figura 1. Determinación de la interfase SMP-agua. La superficie negra delimita la zona de contacto entre las moléculas de SMP (zona central) y las moléculas de agua (zonas exteriores)

3. Resultados

3.1 Área por lípido

La medida del área por lípido nos aporta información sobre el grado de compactación de la membrana. Los resultados en referencia a los diferentes casos simulados se muestran en la tabla 4.

El valor obtenido de referencia, área (SMP) = 0.458 nm², para el caso de una membrana de SMP sin impurezas de ácidos grasos. A medida que introducimos en la membrana impurezas de C24, vemos para ambos casos, valores bajos de fracciones molares no contribuyen a un cambio drástico en el área por lípido. Si observamos en la figura 2, existe cierta compactación de la membrana para ambos ácidos grasos, no ocurriendo hasta la fracción 0.2 para el C24 y la fracción 0.3 para el C26. En relación a la presencia de los dos ácidos grasos de forma simultánea, encontramos que disminución de los valores del área por lípido ocurre a fracciones totales de 0.2 (suma de las fracciones de C2X). Además, parece que la compactación es mayor a fracciones molares menores para cada especie cuando hay mezcla de los dos ácidos grasos.

Concentraciones de C24	Área por lípido (nm ²)	Concentraciones de C26	Área por lípido (nm ²)	Concentraciones de C24 y C26	Área por lípido (nm ²)
0,1	0,460	0,1	0,460	0,1-0,1	0,451
0,2	0,445	0,2	0,460	0,1-0,2	0,441
0,3	0,441	0,3	0,447	0,2-0,1	0,438

Tabla 4. Dimensiones de la caja de simulación y área por lípido en membrana de SMP y C24:0-LPC, a diferentes concentraciones de C24, C26 y mezcla de C24 y C26.

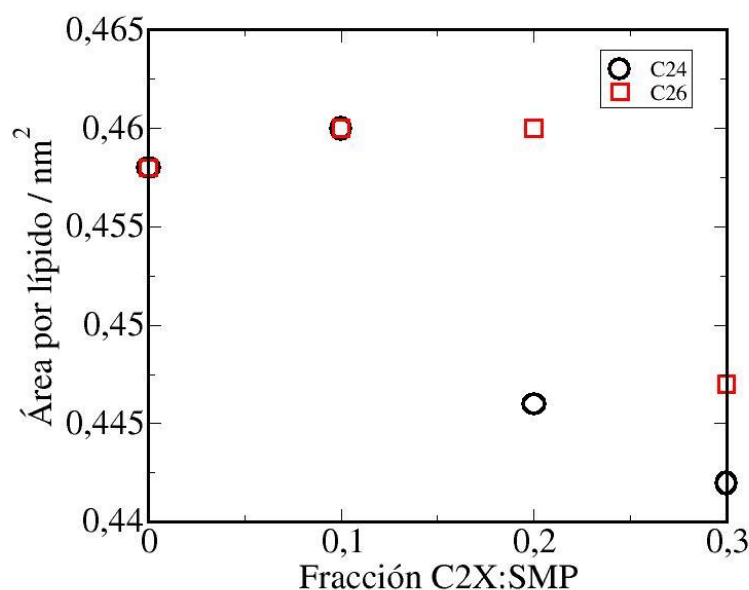


Figura 2. Área por lípido en función de la fracción molar de C2X.

3.2 Perfiles de densidad.

Las simulaciones de DM nos proporcionan directamente la posiciones espaciales de cada átomo y podemos analizarlas calculando los perfiles de densidad a lo largo del eje perpendicular a la interfase SMP-agua. En primer lugar procedemos a analizar la membrana de SMP pura (figura 3). En ella comprobamos que la separación de fases entre el SMP y el agua permanece estable y el perfil de densidad para las moléculas de agua alcanza el valor de equilibrio esperado para el agua volumétrica. Por el contrario la densidad de la membrana presenta 2 máximos localizados en los extremos y corresponden a las cabezas polares de los fosfolípidos. Además, apreciamos una caída en la densidad justo en el centro de la membrana. Esto indica que la membrana de SMP no está interdigitada por completo creando huecos que pueden ser accesibles por otros compuestos.

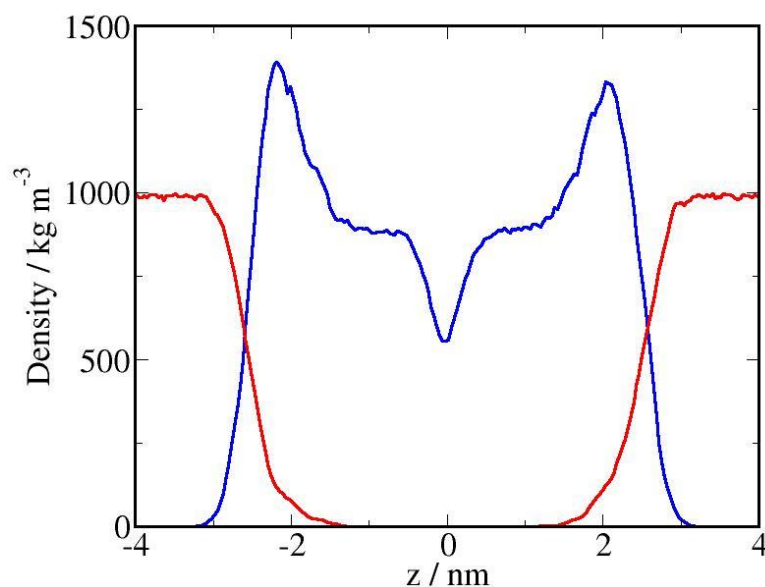


Figura 3. Perfil de densidad de la membrana de SMP (azul) y densidad de las moléculas de agua (roja).

A continuación, comenzamos a reemplazar moléculas de SMP por C24 (figuras 4A-C). En todos los casos vemos que la estructura de la membrana permanece estable y la densidad de agua alcanza el valor constante esperado. Por otro lado, observamos que la densidad de la membrana viene determinada principalmente por la densidad de las moléculas de SMP. En cambio, para el C24 vemos que la cabeza polar interacciona con la cabeza del SMP y además apreciamos un máximo en densidad. Esto indica que tiene una preferencia por acumularse en los huecos entre las dos monocapas que forman la membrana.

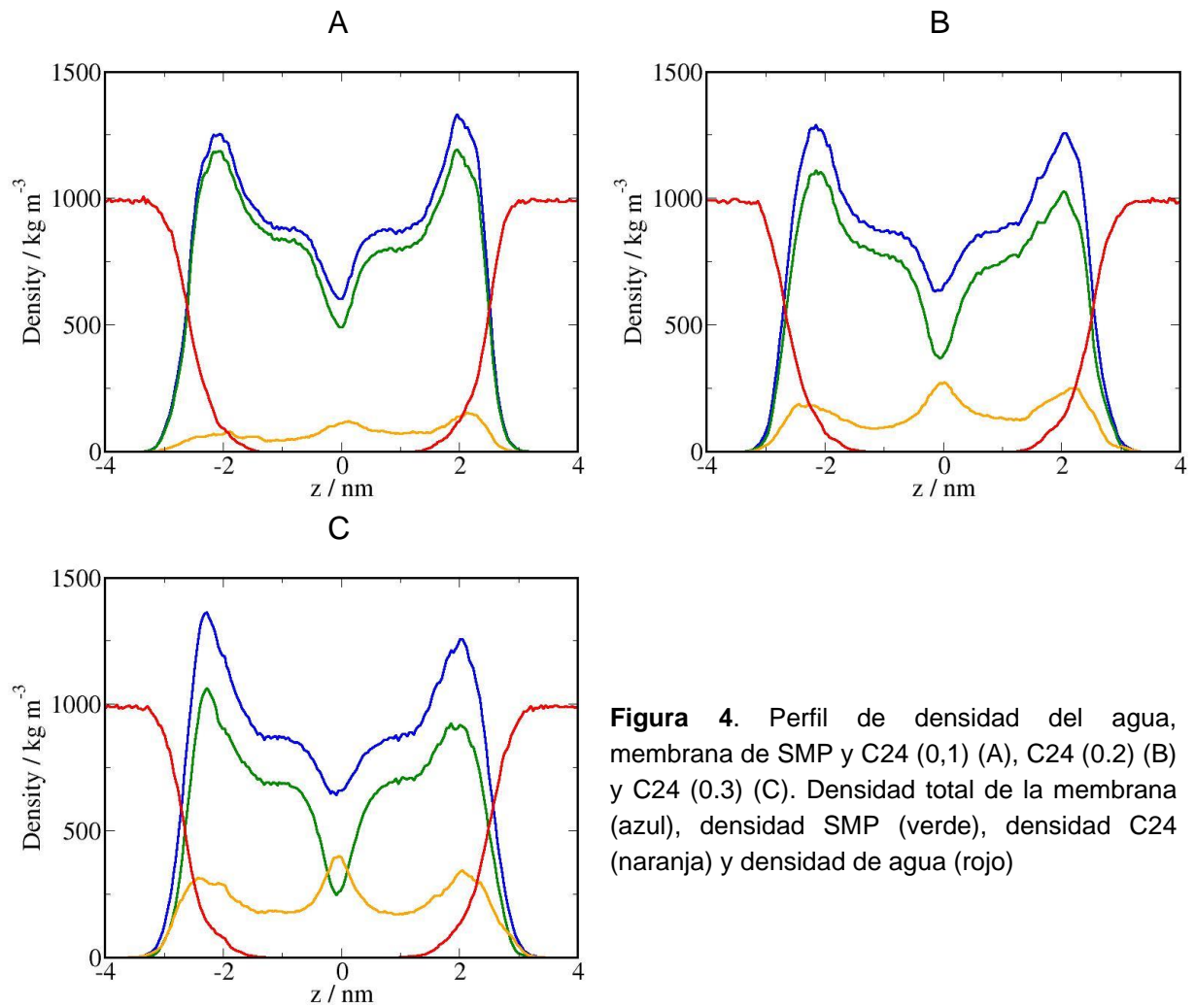


Figura 4. Perfil de densidad del agua, membrana de SMP y C24 (0,1) (A), C24 (0,2) (B) y C24 (0,3) (C). Densidad total de la membrana (azul), densidad SMP (verde), densidad C24 (naranja) y densidad de agua (rojo)

Para el caso del C26 (figuras 5A-C), observamos el mismo comportamiento con la única diferencia que los máximos de la zona central son ligeramente más densos que para el C24. Esto se debe a que el C26 presenta una cadena con 2 dos grupos metilos más. Debido a esta diferencia tiene cierta facilidad extra de atravesar la capa en la que se inserta y conectarse con la otra parte de la membrana imitando el mecanismo del velcro. Destacamos que para los dos tipos de impurezas insertadas, a la fracción molar de 0.3, la zona de separación entre las dos monocapas presentan mayor densidad de ácidos grasos que de SMP.

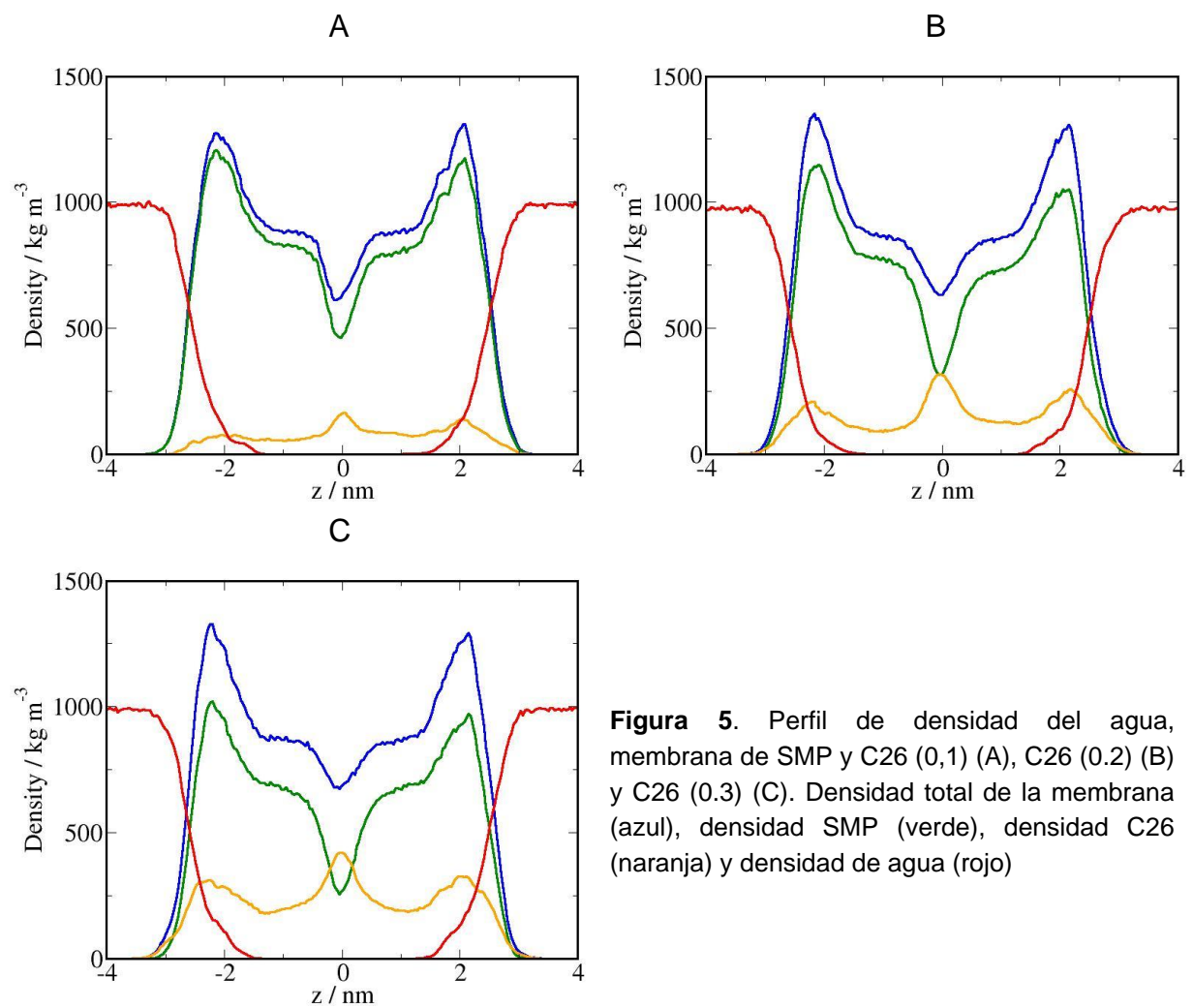


Figura 5. Perfil de densidad del agua, membrana de SMP y C26 (0,1) (A), C26 (0.2) (B) y C26 (0.3) (C). Densidad total de la membrana (azul), densidad SMP (verde), densidad C26 (naranja) y densidad de agua (rojo)

Cuando insertamos de forma simultanea los dos tipos de ácidos grasos encontramos que se conserva el comportamiento de las dos impurezas individualmente (figura 6A-C). En el caso del sistema con fracciones iguales a 0.1 comprobamos que el máximo para el C26 es ligeramente mayor como antes habíamos visto.

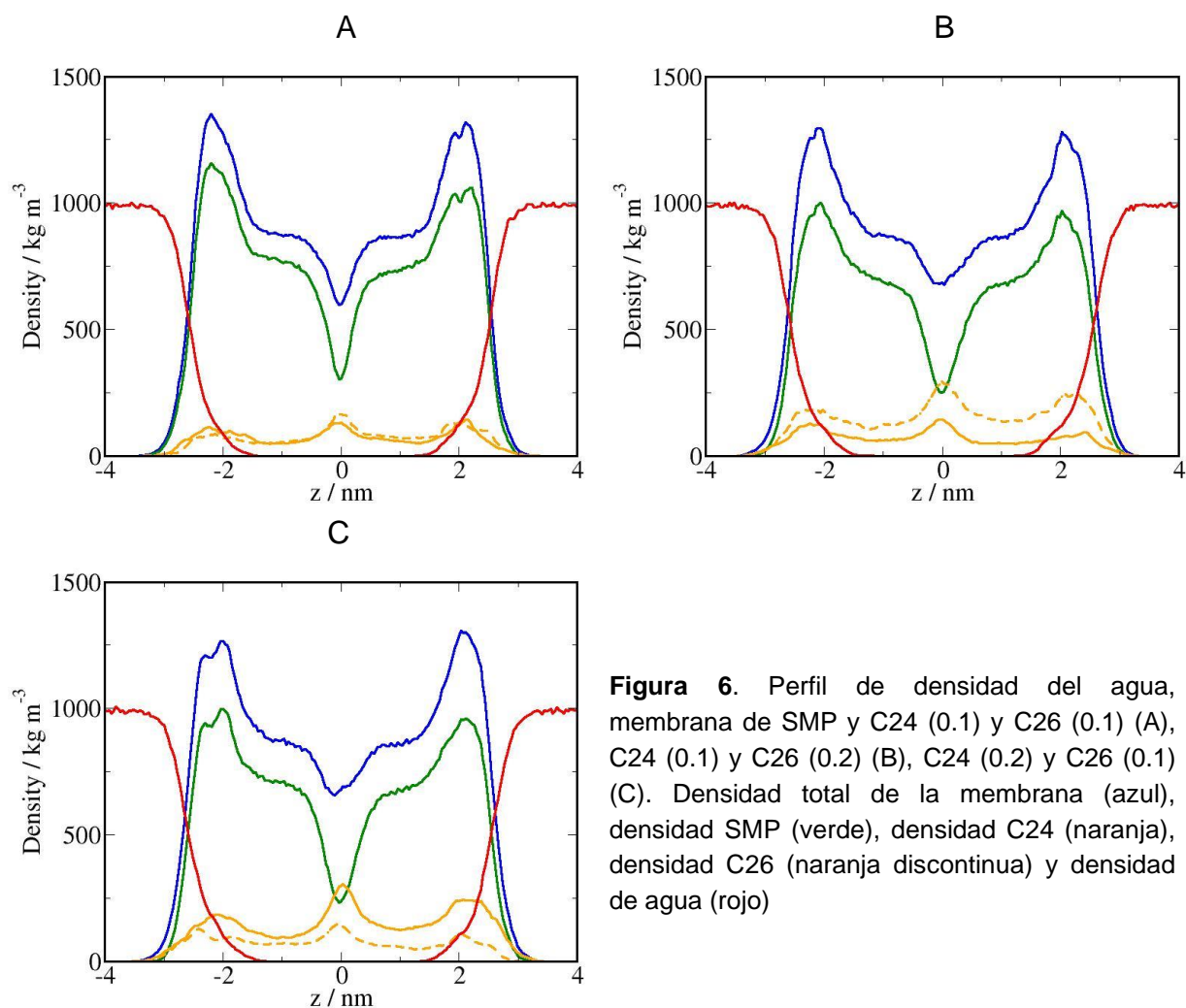


Figura 6. Perfil de densidad del agua, membrana de SMP y C24 (0.1) y C26 (0.1) (A), C24 (0.1) y C26 (0.2) (B), C24 (0.2) y C26 (0.1) (C). Densidad total de la membrana (azul), densidad SMP (verde), densidad C24 (naranja), densidad C26 (naranja discontinua) y densidad de agua (rojo)

En la figura 7 podemos ver configuraciones extraídas de las simulaciones para todos los casos. En ella podemos apreciar claramente el entrecruzamiento del C24 y C26.

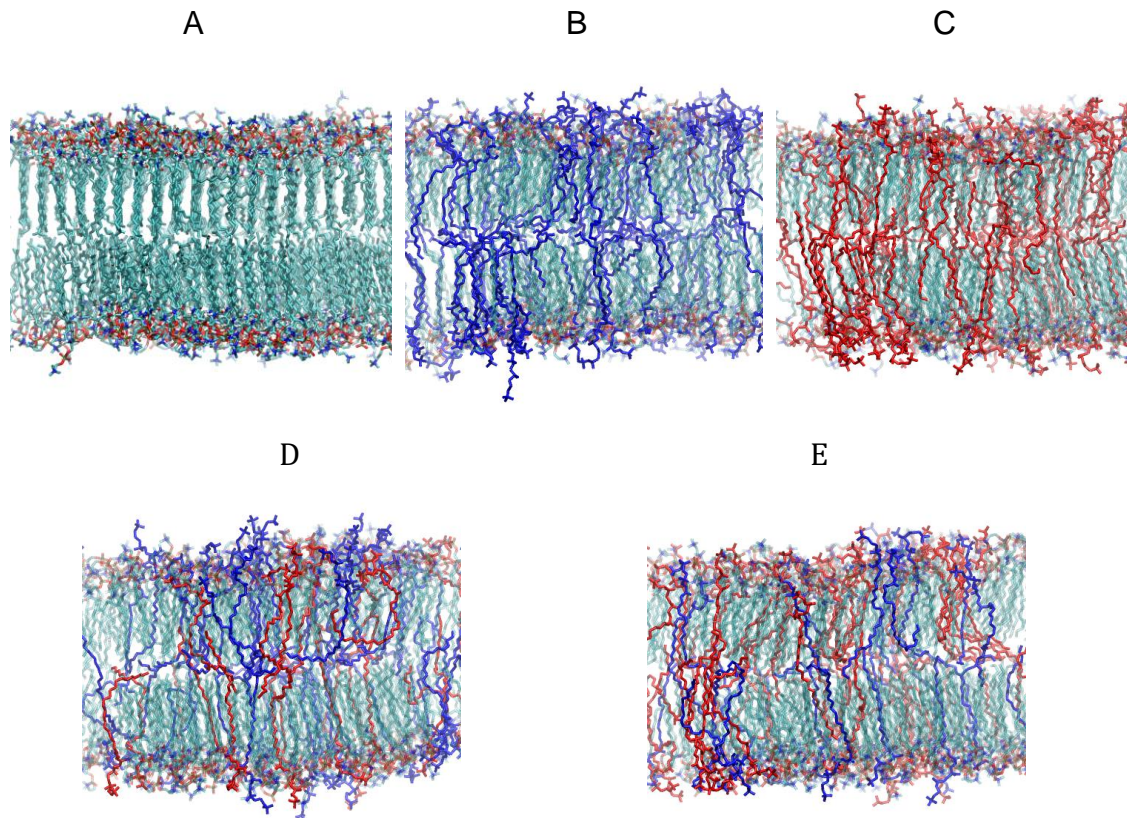


Figura 7. Configuraciones obtenidas tras 15 ns de simulación. La primera imagen se corresponde con la membrana de SMP pura. En la siguiente imagen es para la inserción de la fracción molar 0.3 de C24 (azul). A continuación tenemos la configuración para la fracción molar 0.3 de C26 (rojo). Por último, las dos configuraciones de la fila inferior se corresponden a fracciones molares de 0.2-0.1 de C24-C26 y 0.1-0.2 de C24-C26.

3.3 Distribución de probabilidad intrínseca de la altura de la interfase.

Empleando el algoritmo descrito en el apartado de métodos, hemos determinado la posición de la interfase SMP-agua, $h(x,y)$, para cada configuración salvada durante las simulaciones y determinado su fluctuación intrínsecamente a un punto de referencia situado en la altura media de la interfase. Esta propiedad nos permite tener una primera aproximación de cómo de blanda es la superficie. Una distribución estrecha indicaría que hay baja probabilidad de que la diferencia entre la altura local y la promedio sea elevada. En este caso podríamos decir que cuanto mas estrecha sea la distribución menos ondulaciones presentaría respecto a su plano de

referencia. Estas distribuciones típicamente se pueden ajustar a un modelo con una función gaussiana.

En la figura 8 vemos como la membrana pura se ajusta casi perfectamente a la función a excepción de los extremos de las colas. Este hecho puede ser por dos motivos, el sistema no haya relajado al 100% o que la probabilidad de fluctuar la interfase hacia arriba o hacia abajo no sea perfectamente equivalente. Al tratarse de una fase con cierto componente elástico debido a la necesidad de muelles en la topología molecular de las moléculas orgánicas, es posible que las superficie tenga cierta tendencia a fluctuar mas hacia el agua y la distribución refleje un pequeño sesgo hacia valores positivos. En el caso de la inserción de C24 podemos apreciar un comportamiento no monótono. A concentraciones bajas de C24 la distribución se ensancha y alcanza el mayor valor de anchura. Al incrementar la fracción molar la distribución se estrecha de nuevo sin llegar al valor que presenta la membrana pura y no apreciándose diferencias entre las fracciones 0.2 y 0.3.

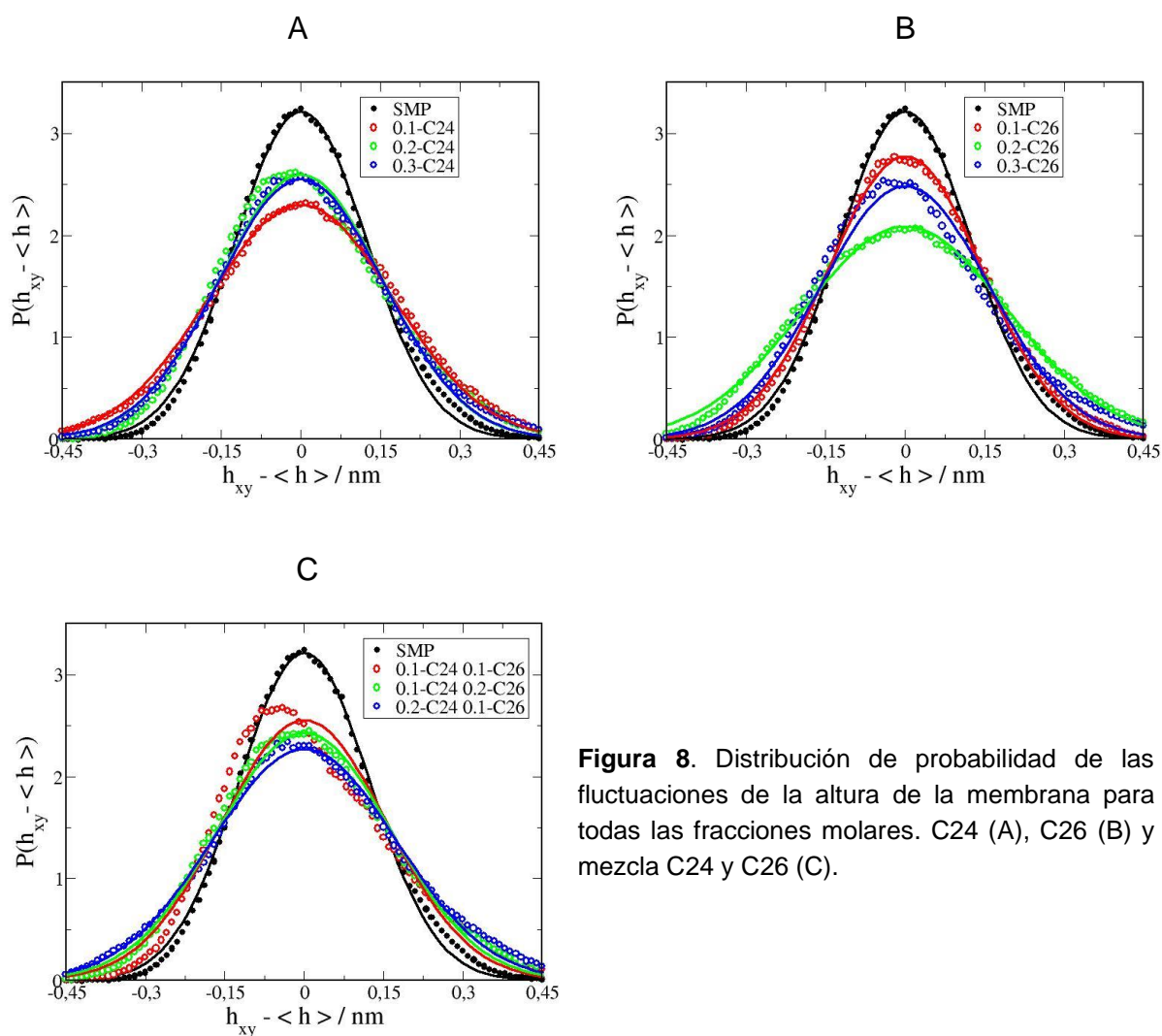


Figura 8. Distribución de probabilidad de las fluctuaciones de la altura de la membrana para todas las fracciones molares. C24 (A), C26 (B) y mezcla C24 y C26 (C).

Para el caso del C26, el comportamiento de las distribuciones es muy similar. En este caso las distribuciones se ensanchan para 0.1 y 0.2 pero se estrecha en 0.3 pero sin alcanzar el sistema puro de referencia. Al igual que para el área por lípido, parece que los comportamientos de los dos ácidos grasos son similares, pero hay un ligero desplazamiento hacia concentraciones mayores de C26. Por el contrario, para la mezcla de los dos tipos de ácidos grasos, si apreciamos un comportamiento monótono en función del aumento de la concentración total (0.2 y 0.3) de impurezas.

A mayor presencia de impureza vemos que la distribución se ensancha cuando la fracción total es 0.3. Para las dos combinaciones de que dan total a la fracción de 0.3 no apreciamos una diferencia significativa en la distribución.

Por último, es destacable que a la fracción total de 0.2 (0.1 C24 + 0.1 C26), la distribución deja de estar centrada en 0 y puede intuirse un segundo pico que correspondería a una distribución bimodal que podría ser característico de una fase tipo ondulante. Por desgracia, el tamaño del sistema no es lo suficientemente grande para realizar un espectro de fluctuaciones capilares que nos daría información de la longitud característica de la fase ondulada.

4. Discusión

La SMP es uno de los fosfolípidos más ubicuos en las membranas de muchas células eucariotas. Se conoce que esta molécula lipídica posee una gran influencia en las propiedades biofísicas de la membrana. Además, constituyen una parte importante del cerebro y de las células nerviosas como componente de las vainas de mielina. La SMP está implicada en numerosas funciones como la transducción de señales mediada por el receptor de las células T (TCR) y la subsiguiente activación de las células T, a través de la balsa lipídica. Además, parece ser que la SM está implicada en la señalización en la apoptosis y muerte celular (Kagan et al. 2022).

Por otra parte, los ácidos grasos saturados de cadena larga se acumulan en diversas enfermedades asociadas a la neurodegeneración del sistema nervioso (Kemp & Wanders, 2010). Entre los trastornos más destacados por este acúmulo está la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (ALD-X) específicamente C24 y C26, precisamente objeto de este estudio, son los biomarcadores principales (Burton et al. 2022). Por ello, es importante el estudio del comportamiento de estos lípidos a nivel celular, y cómo se comportan en la membrana. Hemos utilizado las simulaciones de DM se para obtener la información sobre el comportamiento lipídico. Para ello, en este trabajo se estudió y analizó cómo VLCFA, concretamente C24 y C26 se comporta, adapta y modula las condiciones de una membrana de SMP. Se mantuvo la temperatura constante a 310 K para simular condiciones térmicas que se encuentran a nivel celular.

En primer lugar, cabe mencionar que el área por lípido de nuestra caja de simulación disminuye a diferentes concentraciones para cada tipo de VLCFA. Tanto en las simulaciones en presencia de C24 como de C26 se obtienen resultados parecidos, los lípidos se acumulan en la membrana, y ocasionando por tanto una mayor compactación. A continuación, se realizó la determinación de la densidad parcial de las membranas en presencia de agua, SMP y VLCFA. En cuanto a la densidad parcial de SMP en agua se obtuvo similar en todas las simulaciones. La membrana de esfingomielina presenta un mínimo de densidad debido a la incompleta interdigitación entre las dos monocapas dónde se encuentran las colas hidrocarbonadas enfrentadas entre sí. Este mínimo de densidad es aprovechado por los VLCFA para insertarse en la membrana y en ocasiones interdigitarse en la monocapa que se encuentra enfrentada.

En cuanto a las fluctuaciones de altura de la membra, se deduce que para las concentraciones crecientes de C24 y C26 por separado, las simulaciones se ajustan a la función gaussiana, de manera que la probabilidad de que la fluctuación capilar hacia arriba/abajo es prácticamente equivalente. En cuanto a la mezcla C24 (0.1) y C26 (0.1), la distribución no se ajusta a la función gaussiana, de manera que hay

más probabilidad de que las fluctuaciones capilares sean hacia la membrana que hacia el agua, puede ser debido a que ambos actuarían de manera sinérgica en dicha fluctuación como todos los hilos de un velcro. No obstante, para el caso 0.1 y 0.2 M de ambos la fluctuación se ajusta, puede ser debido a que las concentraciones son diferentes.

Como línea futura de estudio, sería interesante calcular la tensión superficial en sistemas de mayor tamaño, mediante la transformada de Fourier de la función $h(x,y)$ podríamos conocer con más exactitud la propiedades reológicas de la membrana. El estudio de las propiedades reológicas de la membrana podría explicarnos el comportamiento celular en ALD-X y entender acerca de su fisiopatología.

5. Conclusiones

- El área por lípido de la caja de simulación disminuye a medida que aumentan las concentraciones de VLCFA
- La densidad parcial de esfingomielina en agua fue similar en todas las simulaciones. La membrana de esfingomielina presenta un mínimo de densidad por la incompleta interdigitación dónde se insertan estos VLCFA
- Para concentraciones crecientes de C24 y C26 por separado la probabilidad de que la fluctuación capilar sea hacia arriba o abajo es equivalente.
- Para la mezcla con ambos en 0.1 M la distribución no se ajusta a la función gaussiana, puede ser debido a que ambos actúan de manera sinérgica. No obstante, en el caso de concentraciones 0.1 y 0.2 M la fluctuación se ajusta, puede ser debido a que las concentraciones son diferentes.

Bibliografía

Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S. A., & Karplus, M. (1983). CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of computational chemistry*, 4(2), 187-217.

Burton, B. K., Hickey, R., Hitchins, L., Shively, V., Ehrhardt, J., Ashbaugh, L., ... & Basheeruddin, K. (2022). Newborn Screening for X-Linked Adrenoleukodystrophy: The Initial Illinois Experience. *International Journal of Neonatal Screening*, 8(1), 6.

Chhabra, K., Balakrishnan, U., Amboiram, P., & Jalan, A. (2022). Infant Presenting With Developmental Regression and Infantile Spasms Diagnosed as Zellweger Spectrum Disorder. *Journal of Neonatology*, 09732179221100435.

Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., ... & Kollman, P. A. (1995). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 117(19), 5179-5197.

Ferdinandusse, S., Falkenberg, K. D., Koster, J., Mooyer, P. A., Jones, R., van Roermund, C. W., ... & Waterham, H. R. (2017). ACBD5 deficiency causes a defect in peroxisomal very long-chain fatty acid metabolism. *Journal of medical genetics*, 54(5), 330-337.

Finkelstein, A. Water Movement through Lipid Bilayers, Pores, and Plasma Membranes: Theory and Reality; John Wiley & Sons: New York, 1987; Vol. 4.

Gunsteren, W. V., & Berendsen, H. J. (1987). Groningen molecular simulation (GROMOS) library manual. *Biomos, Groningen*, 24(682704), 13.

Hodson, L., Skeaff, C. M., & Fielding, B. A. (2008). Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in lipid research*, 47(5), 348-380.

Huang, W., Lin, Z., & Gunsteren, W. V. (2011). Validation of the GROMOS 54A7 force field with respect to β -peptide folding. *Journal of chemical theory and computation*, 7(5), 1237-1243.

Jorgensen, W. L., & Tirado-Rives, J. (1988). The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society*, 110(6), 1657-1666.

Kagan, T., Stoyanova, G., Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. (2022). Ceramide from sphingomyelin hydrolysis induces neuronal differentiation, whereas de novo ceramide synthesis and sphingomyelin hydrolysis initiate apoptosis after NGF withdrawal in PC12 Cells. *Cell Communication and Signaling*, 20(1), 1-13.

Kemp, S., & Wanders, R. (2010). Biochemical aspects of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathology*, 20(4), 831-837.

Knazek, R. A., Rizzo, W. B., Schulman, J. D., & Dave, J. R. (1983). Membrane microviscosity is increased in the erythrocytes of patients with adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *The Journal of Clinical Investigation*, 72(1), 245-248.

Kleinzeller, A. Charles Ernest Overton's Concept of a Cell Membrane. *Curr. Top. Membr.* 1999, 48, 1-22.

Lindahl, E., Hess, B., & Van Der Spoel, D. (2001). GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *Molecular modeling annual*, 7(8), 306-317.

Mouritsen, O. G., & Bloom, M. Y. E. R. (1984). Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophysical journal*, 46(2), 141-153.

Petersen, H. G. (1995). Accuracy and efficiency of the particle mesh Ewald method. *The Journal of chemical physics*, 103(9), 3668-3679.

Ramstedt, B., & Slotte, J. P. (2002). Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS letters*, 531(1), 33-37.

Sato, H. and Feix, J.B. (2006) Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 45, 9997–10007

Schmid, N., Eichenberger, A. P., Choutko, A., Riniker, S., Winger, M., Mark, A. E., & van Gunsteren, W. F. (2011). Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European biophysics journal*, 40(7), 843-856.

Song, W., Corey, R. A., Ansell, T. B., Cassidy, C. K., Horrell, M. R., Duncan, A. L., ... & Sansom, M. S. (2022). PyLipID: A python package for analysis of protein–lipid interactions from molecular dynamics simulations. *Journal of chemical theory and computation*, 18(2), 1188-1201.

Sonnino, S., & Prinetti, A. (2013). Membrane domains and the “lipid raft” concept. *Current medicinal chemistry*, 20(1), 4-21.