



TÍTULO

TRANSICIONES DE FASE EN LA MEMBRANA DE ESFINGOMIELINA

AUTOR

Diego Martín-Albo Rodríguez-Escalona

	Esta edición electrónica ha sido realizada en 2022
Directores	Dr. D. Luis González MacDowell ; Dr. D. Pablo Llombart González
Instituciones	Universidad Internacional de Andalucía ; Universidad de Huelva
Curso	<i>Máster Universitario en Simulación Molecular (2020/21)</i>
©	Diego Martín-Albo Rodríguez-Escalona
©	De esta edición: Universidad Internacional de Andalucía
Fecha documento	2021

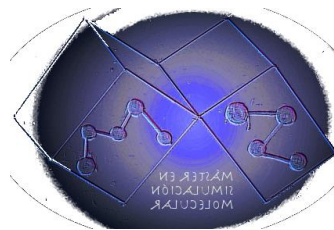


**Atribución-NoComercial-SinDerivadas
4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)**

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>



TRANSICIONES DE FASE EN LA MEMBRANA DE ESFINGOMIELINA

DIEGO MARTÍN-ALBO RODRÍGUEZ-ESCALONA

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

Noviembre 2020/ 2021

Directores:

Luis González MacDowell
Pablo Llombart González

RESUMEN

Conocer el funcionamiento de las membranas biológicas o bicapas lipídicas es de gran interés tanto para la biología como para la físico-química, debido a la complejidad de estas estructuras, que pueden transicionar entre distintas fases como la denominada *cristal líquido*, *ondulada* o la fase *liquida ordenada*.

Por la dificultad de poder obtener estas estructuras de una forma pura y gracias a los avances en la tecnología y los estudios de dinámica molecular, este trabajo ha tratado de simular el comportamiento de una membrana monocomponente formada por una bicapa de esfingomiélna someténdola a temperaturas que varían entre los 0 y los 75°C, en un sistema formado por la bicapa de estudio en un entorno de solvente agua.

Las simulaciones se realizaron accediendo a los ordenadores pertenecientes a Camaragibe de la Universidad Complutense de Madrid a distancia, utilizando el paquete de software libre GROMACS y utilizando los modelos de campo de fuerza GROMOS54A7 y de agua SPC, todo ello facilitado por los doctores Pablo Llombart y Luis G. MacDowell, supervisores de este trabajo.

De las simulaciones se obtuvo información relacionada con características como los perfiles de densidad, área por lípido, el desplazamiento cuadrático medio o los coeficientes de difusión de la membrana, gracias a la que podemos observar las características de las distintas fases por las que pasa la membrana.

La membrana pasa por estos estados conforme aumenta la temperatura, variando también su densidad, ancho, área por lípido y difusividad, afectando los cambios de temperatura al sistema y haciendo que al final la membrana pase a un estado más desordenado o fluido.

Estos resultados concuerdan con lo visto en estudios previos de lípidos en sistemas parecidos.

ABSTRACT

Understanding the behaviour of biological membranes or lipid bilayers is of major interest for both biology and physico-chemistry, because of to the complexity of these structures, which can transition between different phases such as liquid crystal, ripple or ordered liquid phases.

Due to the difficulty of obtaining these structures in a pure form and thanks to advances in technology and molecular dynamics studies, this work has tried to simulate the behavior of a monocomponent membrane formed by a sphingomyelin bilayer by subjecting it to temperatures ranging between 0 and 75°C, in a system formed by the bilayer of study in a water solvent environment.

The simulations were performed by accessing the computers belonging to Camaragibe of the Universidad Complutense de Madrid remotely, using the free software package GROMACS and using the GROMOS54A7 force field and SPC water models, all provided by Dr. Pablo Llombart and Dr. Luis G. MacDowell, supervisors of this work.

From the simulations we obtained information related to characteristics such as density profiles, area per lipid, mean square displacement or diffusion coefficients of the membrane, thanks to which we can observe the characteristics of the different phases through which the membrane passes.

The membrane passes through these states as temperature increases, varying in density, width, area per lipid and diffusivity, with temperature changes affecting the system and ultimately causing the membrane to move to a more disordered or fluid state.

These results are consistent with previous studies of lipids in similar systems.

Agradecimientos

Quiero agradecer este trabajo a mis tutores, los Doctores Luis González MacDowell y Pablo Llombart González, por su excelente guía e interés, así como por mostrar enorme paciencia y comprensión.

A mis compañeros Cristóbal y Daniel, sin duda una de las mejores cosas que me llevo de este master.

A mis amigos, que son como mi familia, siempre apoyándome en todo y sabiendo animarme hasta en los peores momentos.

Y por último a mi familia, que avanza conmigo en cada paso que doy y tiene más confianza en mí que la que yo mismo puedo llegar a tener. Si cada vez puedo subir más alto, es porque se que si caigo ellos estarán para recogerme.

Índice de contenido

Agradecimientos	5
1. Introducción	7
1.1. Bicapas lipídicas: estructura, importancia y estudios.....	7
1.2. Simulación Molecular. Antecedentes y futuro.	11
1.3. Motivación.....	14
2. Objetivos	15
3. Materiales y métodos	16
3.1. Condiciones de contorno periódicas	16
3.2. Energía potencial e interacciones entre partículas	17
3.3. Coeficientes de difusión.....	20
3.4. Densidad.....	22
3.5. GROMACS	23
4. Resultados	28
4.1. Densidad de membrana en agua.....	28
4.1.1. Densidad de especies atómicas en SMP.....	29
4.1.2. Densidad de esfingomielina y agua	33
4.2. Área por lípido de la membrana.....	36
4.3. Desplazamiento cuadrático medio (MSD) y Coeficiente de difusión de membrana	37
5. Conclusiones.....	41
6. Referencias.	42

1. Introducción

1.1. Bicapas lipídicas: estructura, importancia y estudios

Puede afirmarse con rotundidad que uno de los componentes esenciales de toda célula son las membranas, exactamente las membranas de fosfolípido, con funciones variadas como delimitar la propia célula y los orgánulos que se encuentran dentro de ella. Al mismo tiempo suponen el medio gracias al cual se transportan sustancias como iones y otros metabolitos. Además, los orgánulos internos también se valen de las membranas en la síntesis de moléculas orgánicas, por ejemplo, como las proteínas.

En una célula, la estructura general de las membranas, ya sea la plasmática o la de los orgánulos internos, es común. Se trata de moléculas de lípidos ordenadas de forma que las cabezas polares están en contacto con el medio polar, mientras que las colas apolares están enfrentadas, formando una especie de barrera. Insertadas en esta barrera se pueden encontrar proteínas que realizan diversas funciones, tales como transporte de solutos o señalización celular. Las uniones entre proteínas y los lípidos de la membrana son no covalentes.

Los lípidos que encontramos en la membrana son principalmente tres: fosfoglicéridos, esfingolípidos y el colesterol. Tanto fosfoglicéridos como esfingolípidos, están formados por ácidos grasos, esto es, una cola hidrocarbonada a un extremo carboxilo (-COOH), y que en su estructura puede tener dobles enlaces (insaturaciones). La longitud de la cadena y la presencia de insaturaciones son factores determinantes en la temperatura de fusión de estas moléculas, esto es, la temperatura a la cual se rompen los enlaces: una mayor longitud de cadena aumenta la T^a de fusión, mientras que la presencia de dobles enlaces la disminuye. La diferencia fundamental en estos dos tipos de lípidos está su estructura:

- Fosfoglicéridos: dos ácidos grasos se unen por enlace tipo éster (CO-O) a una molécula de glicerol
- Esfingolípidos: una única cadena de ácido graso se une por enlace amida (CO-N) a una cadena de esfingosina, a la que se puede unir un grupo fosfato (fosfoesfingolípidos) o moléculas de azúcar (glucoesfingolípidos)

A pesar de las diferencias químicas y estructurales, ambos presentan una zona polar hidrofílica, la cabeza de grupo fosfato, y otra apolar hidrofóbica, las cadenas hidrocarbonadas. Ambos tipos de fosfolípido están presentes en la membrana celular, y por lo general los fosfoglicéridos están en mayor proporción en más tipos celulares, pero la esfingomielina está especialmente presente en las células nerviosas, concretamente en las vainas de mielina que recubren el axón de estas.

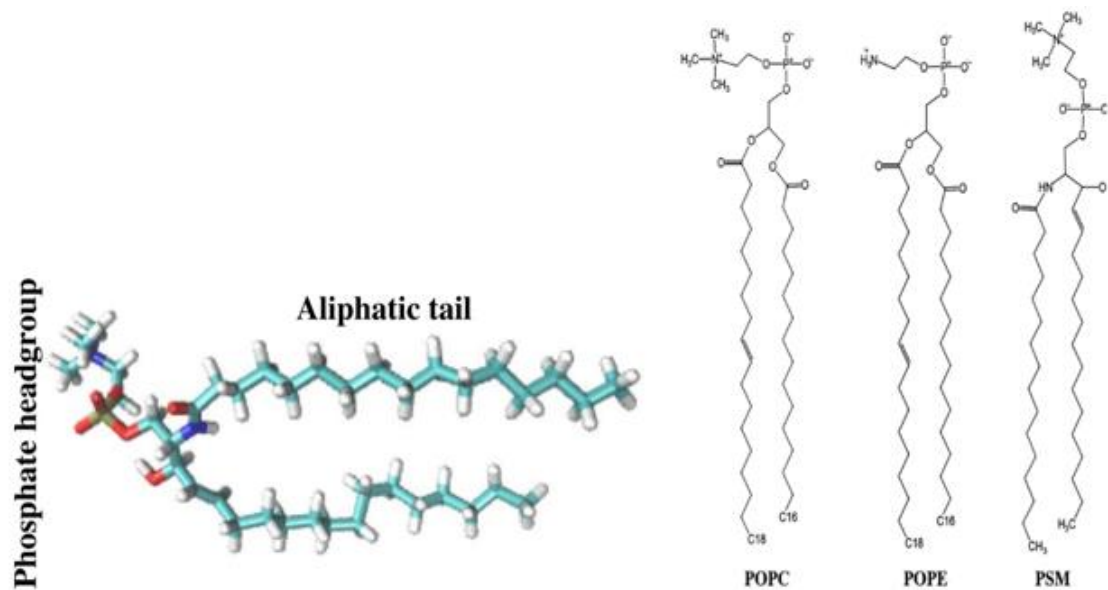


Figura 1 A. Representación de Representación 3D de una molécula de una esfingomielina donde se pueden apreciar los átomos, sus enlaces y conformación. Imagen adaptada de la original. Fuente: Saeedimagine et al., 2019. B. Estructura química de algunos lípidos: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-PC (POPC); 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-PE (POPE); N-palmitoylsphingomyelin (PSM). Fuente: Bera & Klauda, 2017.

Las esfingomielinas básicamente están formadas por una esfingosina con una cadena de dieciocho carbonos, un ácido graso unido por un enlace amino, y una cabeza polar, por lo general un grupo fosfocolina (Figura 1) (Bera & Klauda, 2017; Saeedimagine et al., 2019). Esta estructura, en un entorno adecuado hace que agrupaciones de estas moléculas formen las bicapas de una membrana: en presencia de agua, las cadenas hidrofóbicas se esconden de ésta y el grupo hidrofílico, la cabeza polar, se alinea a ambos lados de la bicapa dejando las colas en el centro de la membrana. Dicha conformación hará de la membrana una barrera que, en principio, no podría ser atravesada por sustancias hidrofílicas.

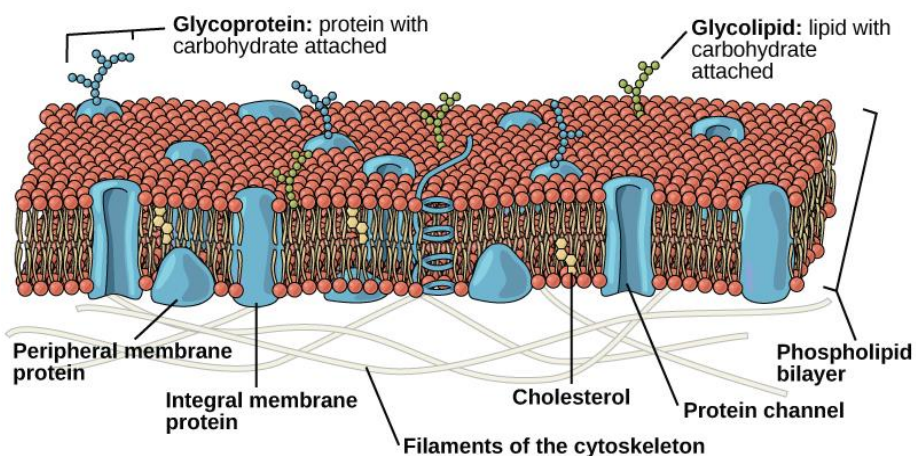


Figura 2 Dibujo esquemático de una membrana celular. Una combinación de fosfolípidos, colesterol, colesterol, proteínas y carbohidratos. Fuente: La Membrana Celular - Conceptos de Biología - OpenStax CNX, n.d.

Las bicapas lipídicas poseen una serie de características que hacen que sea un sistema muy eficiente para actuar como membranas biológicas.

- Pueden crecer sin limitación, gracias a lo cual alcanzan tamaños celulares.
- Se auto ensamblan, creando compartimentos cerrados y consiguiendo así que las colas hidrofóbicas queden totalmente escondidas del agua.
- Son estructuralmente estables, pero también fluidas: los enlaces entre moléculas de la misma bicapa no impiden que estas se muevan con cierta libertad, y hace que en conjunto su estructura se asemeje a un líquido ordenado.
- Son barreras eficaces que sin embargo permiten el paso de solutos polares, y así se consigue que se mantengan diferencias de concentración y se generen gradientes entre los compartimentos que separan las membranas.

Entender la dinámica de las bicapas lipídicas es objeto de interés, tanto desde un punto de vista físico como biológico: desde el punto de vista físico, porque presentan características similares a las de un cristal líquido, y las membranas han sido el centro de estudio para explicar el orden y las transiciones de fase en este tipo de estructuras; desde el punto de vista biológico, porque son la base de las membranas celulares, y los estudios de sus interacciones con distintos tipos de moléculas puede ser de ayuda a la hora de entender aspectos de las variadas funciones celulares.

En las investigaciones sobre membranas, uno de los mayores retos es el de comprender compleja funcionalidad. Por su rica composición de lípidos y la consecuente baja temperatura de fusión, se piensa que estas existen por lo general en un estado denominado fase fluida de cristal-líquido (*“fluid, liquid crystalline(lc) phase”*)(Brown & London, 1998).

Esa fase fluida es una de las fases en las que se pueden encontrar las bicapas lipídicas dependiendo de la temperatura del sistema. En la fase gel o sólida las cadenas hidrocarbonadas están rígidas, mientras que en la fase de cristal-líquido estas cadenas son móviles. La temperatura que marca el cambio de un estado a otro de la membrana se le denomina temperatura de transición (T_m), que es la necesaria para que se produzca la fusión de los lípidos y depende de la naturaleza de la fracción hidrofóbica de estos.

En la fase gel o sólida las cadenas hidrocarbonadas están en alargadas al máximo, formando una estructura muy compacta por el alto grado de interacción entre ellas, con lo que la difusión lateral es reducida. Por otro lado, en la fase fluida las cadenas se encuentran plegadas, por tanto, la compactación es menor y la difusión aumenta.

En membranas de ciertos tipos de lípidos, como fosfatidilcolinas, la transición ocurre en dos pasos a medida que se incrementa la temperatura, pasando por una fase de pre-transición a pocos grados por debajo de la T_m , que puede deberse a los cambios en la proximidad del grupo polar, así como una mayor interacción entre el medio y la cabeza de los lípidos (Eeman & Deleu, 2010). En dicha fase, las cadenas de los lípidos de membrana se encuentran en un estado a medio camino entre el estado ordenado y el fluido.

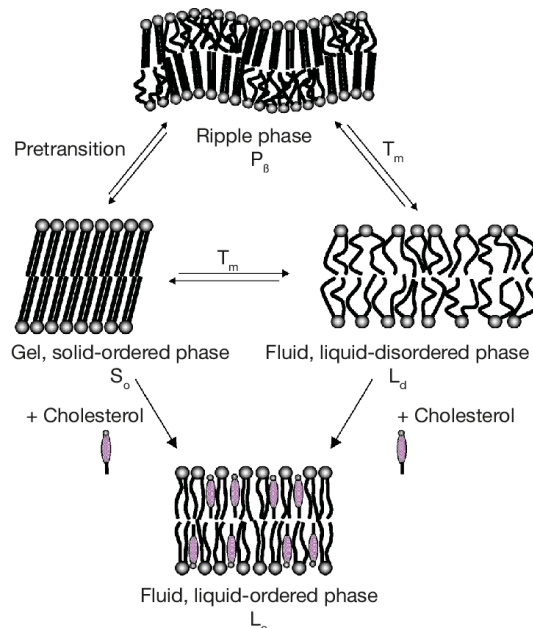


Figura 3. Esquema que representa la estructura de las bicapas lipídicas en las distintas fases en que estas transitan. Fuente: (Eeman & Deleu, 2010)

Las esfingomielinas son una parte importante del complejo entramado de las membranas, pero dada su dificultad de obtención en una forma pura para su estudio, se han realizado estudios con esfingomielinas de huevo (ESM) y de palmitoil (PSM) ya que, según los mismos, son los extractos naturales que más se acercaban a una estructura uniforme de la esfingomielina pura. En estos estudios, y obviando las diferencias que puedan encontrarse con otras formas de esfingomielina, se ha observado mediante distintas técnicas como la difracción de rayos X, el comportamiento de las bicapas en un rango de temperaturas de 3° a 55°C.

ESM presenta una fase de ondulación (“ripple phase”) en el rango de 3° a 38°C, que se describe como muy estable en estas temperaturas. A partir de 38°C se observa la transición a fase fluida.

PSM se encuentra en fase gel por debajo de 24°C, en estado de transición de fases gel-ondulación alrededor de 24°, y otra transición a fase fluida a 41°C (Goñi et al., 2020; Goñi & Alonso, 2006).

Estos cambios en su fluidez tienen una base termodinámica e implica una variación de la densidad y el coeficiente de difusión, lo cual tiene una gran importancia biológica,

ya que supondría una alteración en el comportamiento de una membrana celular respecto a su estado normal, y por tanto repercute en las funciones celulares.

Por todos estos motivos, es relevante llevar a cabo un estudio computacional que permita conocer las características físico-químicas de estas estructuras moleculares, de las que podemos obtener información mediante técnicas de simulación molecular.

1.2. Simulación Molecular. Antecedentes y futuro.

Podría decirse que la simulación molecular es el término que engloba métodos computacionales como Monte Carlo y la Dinámica Molecular, surge con la idea de dar unos resultados lo más exactos posibles a problemas cuyo origen está en la mecánica estadística, y por tanto permite determinar propiedades macroscópicas mediante la aplicación de un modelo teórico usando un programa de ordenador.

Está claro que su historia va totalmente ligada al desarrollo de ordenadores y la evolución de la informática en general, ya que su mejora continua ha permitido que se realicen cálculos cada vez más complicados que consumen muchos más recursos, pudiendo resolver problemas que nacen y se aplican a muchos sistemas.

La DM se define como el conjunto de técnicas de computación para estudiar las propiedades de un sistema de múltiples partículas que obedecen los principios básicos de la mecánica clásica, y como dichas propiedades van evolucionando con el tiempo (Frenkel, Daan, 2001).

Echando la vista atrás en el tiempo, la primera simulación de DM se llevó a cabo por Alder y Wainwright a finales de los años cincuenta del pasado siglo, cuyo estudio consistía en un modelo de esfera-dura. (Alder & Wainwright, 2004). El potencial del método hizo que más tarde se llevase a cabo para el estudio de líquidos y veinte años después se implementó la primera simulación aplicando el método de Monte Carlo (Metropolis, 1987). Desde entonces, el campo de la simulación molecular ha evolucionado hasta suponer un factor realmente importante en un gran espectro de áreas científicas, ya que sus aplicaciones pueden ir desde el mero estudio de propiedades termodinámicas al diseño de materiales, fármacos o la predicción de estructuras proteicas.

A día de hoy, la dinámica molecular se aplica al estudio de casi cualquier tipo de macromoléculas, como ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos... y estos sistemas pueden llegar a ser realmente grandes, al tener millones de átomos, como ocurre con las membranas, sobre todo para las proteínas embebidas en ellas, que representan un reto demasiado grande para afrontarlo tan solo mediante métodos experimentales. En muchos sentidos, las simulaciones de DM son muy similares a los experimentos de laboratorio, ya que cuando llevamos uno de estos a cabo seguimos una serie de pasos, como la preparación de la muestra que deseamos estudiar. Acto seguido, la sometemos a un instrumento de medida y obtenemos un valor numérico de la propiedad de interés para un tiempo determinado.

Para la DM los pasos son análogos, ya que primero preparamos la muestra seleccionando un sistema de N partículas y, mediante la resolución de las ecuaciones de movimiento de Newton para el sistema, obtenemos unos datos. Estos datos irán cambiando para un sistema que es dinámico, hasta que llega un momento que dejan de hacerlo: hemos alcanzado el punto de equilibrio. Es entonces cuando se lleva a cabo la medida deseada.

Parte de su importancia reside en que puede resultar una alternativa a un experimento más “real” o material, cuando las condiciones ideales de este no están a nuestro alcance en el mundo físico. También supone un valioso ahorro de tiempo, y por tanto también económico, ya que permite el estudio de múltiples sistemas a la vez: lo que en un laboratorio podría tardar días o semanas, con métodos computacionales puede llevarse a cabo en horas o días.

Una de las aplicaciones más prometedoras es el cálculo de la energía de formación de complejos ligando-receptor para el descubrimiento de nuevos fármacos, como la que probablemente fuese la primera simulación de un sistema biológico, el estudio del inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPTI) en vacío. Más adelante, se llevó a cabo otro estudio con una quinasa p38: se saturaba la molécula diana con posibles ligandos que más tarde se acababan eliminando por evaporación, quedando solo los ligandos que se uniesen mejor a la zona de acoplamiento, encontrando así los mejores ligandos que pudiesen actuar como inhibidores. (Morales-Navarrete, 2016)

Del correcto funcionamiento de las proteínas, dependen la mayor parte de funciones vitales que permiten que se mantenga la actividad celular, de ahí que uno de los principales objetivos de las simulaciones por ordenador en cuanto a sistemas biológicos sea conseguir predecir la forma en que estas estructuras se pliegan, ya que esto determina si la proteína podrá llevar a cabo su función o no. A pesar de ser algo tan importante y de las décadas de investigación que ha implicado, sigue siendo un problema por resolver el predecir con cierta exactitud como ocurre el proceso de plegamiento. Pero esto podría estar a punto cambiar.

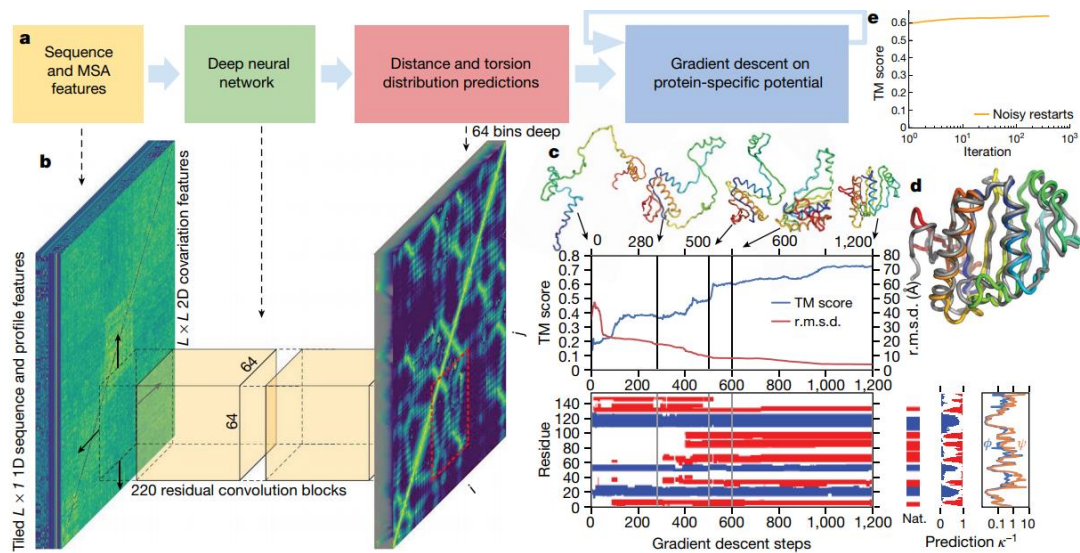


Figura 4. El proceso de plegado. **a.** Esquema de los pasos del proceso. **b.** Una red neuronal predice el plegado basándose en los datos que se recogen mediante alineamiento múltiple de secuencias (MSA). **c.** una iteración por el método de steepest descent con 1200 pasos, con una puntuación asignada y su desplazamiento cuadrática media. Encima, algunas imágenes de la estructura predicha a cada paso. **d.** primera estructura candidata superpuesta a la estructura nativa (en color gris). **e.** La puntuación media de la estructura con el potencial más bajo frente al número de iteraciones. Imagen tomada del mismo artículo de (Senior et al., 2020).

Pensemos que hace unos 20 años era realmente difícil usar la DM computacional para si quiera llegar a plegar un péptido en su estructura correcta, y a día de hoy ya se usa la aproximación mediante inteligencia artificial gracias al proyecto de Google AlphaFold(Senior et al., 2020) para reproducir lo más fielmente posible la estructura terciaria de una proteína, con resultados realmente prometedores(Figura 4).

Es indudable que la potencia de computación ha aumentado enormemente en los últimos treinta años, hasta el punto en que la capacidad de ordenadores personales pueda ser mayor que la de aquellos que se usaban en los estudios de 1987. Y este crecimiento es exponencial, por tanto, si hacemos caso a la ley de Moore, no sería raro imaginar que la potencia de cálculo en una o dos décadas sea miles o millones de veces mayor que ahora, con lo que se podrán llevar a cabo simulaciones de sistemas mucho más grandes y complejos, quien sabe si a escala celular. Pero casi con toda seguridad, podremos predecir lo que ocurre en una parte concreta de estos sistemas, ya sea que se encarga de sintetizar nuestras proteínas las proteínas, en una escala de tiempo suficiente para transcribir un pequeño gen, o en una membrana biológica en el tiempo que distintos tipos de molécula difunden a través de ella para que la célula pueda realizar sus funciones.

1.3. Motivación.

Las razones que me han llevado a querer hacer este trabajo residen en mi formación de grado en Bioquímica, y mi afición por las nuevas tecnologías y como su mejora a implementación permiten llevar a cabo grandes avances y encontrar soluciones a problemas de los sistemas biológicos que aún son difíciles de resolver.

Durante mis años en Bioquímica adquirí conocimientos acerca de cómo las macromoléculas rigen nuestra vida, desde los genes en fracciones de ADN que dictan la estructura del entramado celular, a las interacciones entre distintas células mediadas por la formación de complejos ligando-receptor, pasando por el funcionamiento de la membrana y como esta supone un pilar fundamental para que la célula pueda llevar a cabo el resto de funciones. Sin embargo, fue en los últimos años cuando empecé a conocer las posibilidades de las ciencias computacionales en el estudio de todo lo aprendido hasta entonces. La asignatura de modelización molecular, y los profesores que la impartieron, me abrieron el mundo de los algoritmos de análisis de estructuras moleculares, y como tecnologías de fama reciente como el Machine Learning o las redes neuronales están trabajando para resolver problemas que llevan décadas estudiándose en biología.

Como trabajo de fin de grado, pude conocer como la modelización molecular puede ayudar a mejorar los procesos en investigación y avances en medicina, lo que abrió mi curiosidad y me hizo querer saber más.

En relación con lo anterior, desde hace años me apasiona conocer avances tecnológicos, ver como la mejora de los ordenadores y dispositivos móviles se hace mayor de una forma exponencial, hasta el punto de que a día de hoy usamos dispositivos y sistemas que solo eran imaginables en películas de ciencia ficción de hace una década o que estaban reservados para instituciones de alto nivel.

Por ello he querido conocer de primera mano una de las tecnologías y mecanismos que creo estarán muy presentes en nuestra futura vida cotidiana.

La motivación científica surge de las propiedades de esta molécula y su importante presencia en sistemas biológicos, ya que la estructura de membrana de esfingomielina de huevo presenta un gran grado de histéresis durante su transición (Goñi & Alonso, 2006), y para intentar entender este fenómeno, hemos querido llevar a cabo un estudio colaborativo.

2. Objetivos

Objetivo General

Mediante métodos de simulación molecular, estudiar el comportamiento y propiedades de una bicapa lipídica correspondiente a un modelo de membrana de esfingomiélin en un rango de temperaturas que van desde los 0° a los 75°C (273-348 K) en intervalos de 15°C, y así ver las diferencias entre las distintas fases en que transita la membrana.

Objetivos específicos

Preparar entornos de simulación para temperaturas deseadas

Realizar la simulación de DM utilizando el software de código abierto GROMACS

Analizar los resultados obtenidos calculando los valores de coeficiente de difusión, área por lípido y densidad de la membrana.

3. Materiales y métodos

3.1. Condiciones de contorno periódicas

Antes de empezar cualquier simulación, hay que definir las condiciones en que esta va a ocurrir, y dadas las fuerzas de atracción y repulsión que se dan en sistemas fluidos, y los problemas que esto puede suponer para el cálculo, lo mejor es considerarlo un sistema ordenado, cristalino, consiguiendo así minimizar estas interacciones.

Cuando se llevan a cabo las simulaciones se usa un número relativamente pequeño de moléculas, una fracción concreta de la muestra real, ya que una cantidad más realista sería mucho más costosa computacionalmente. Esta fracción está contenida en una caja de simulación.

Determinar el tamaño de la caja para nuestra fracción de muestra puede implicar cambios en propiedades como la densidad o las fuerzas que experimentan unas partículas por su interacción con el resto o las paredes de la caja, y que estos valores se alejen de la realidad. Así, si se quiere recrear fielmente lo que ocurriría en el sistema, hay que establecer una serie de condiciones de forma que actúe como si estuviese rodeado por su entorno real, minimizando las desviaciones provocadas por efecto de las paredes de una caja.

Para lograr esto, se establecen las condiciones de contorno periódicas: partimos de una caja de simulación con unas dimensiones fijas de acuerdo a las condiciones de nuestro colectivo NVT o NPT, y la consideramos la celda unidad o central; alrededor de esta se encuentran celdas iguales en todas las direcciones, de forma que al iniciar la simulación el sistema evoluciona hasta el estado deseado, pero durante el movimiento de las partículas, cuando una abandona la caja por un lado, otra partícula igual entra por el lado opuesto (ver figura 5).

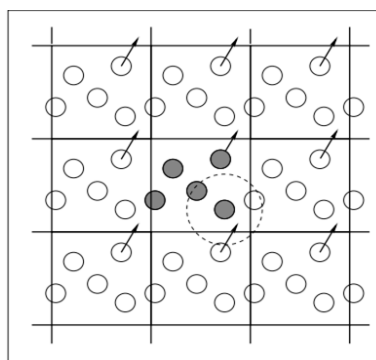


Figura 5. Condiciones de contorno periódicas. Cuando una partícula sale de la caja de simulación, una partícula de la imagen se mueve para sustituirla. En el cálculo de las interacciones de las partículas dentro del rango de corte, se incluyen tanto los vecinos reales como los de la imagen se incluyen tanto los vecinos reales como los de la imagen. Allen, M. P. (2011). *Introduction to Molecular Dynamics Simulation*. In *Lecture Notes, Norbert Attig* (Vol. 23, pp. 161–197)

3.2. Energía potencial e interacciones entre partículas

Para una simulación sea fiel a un sistema real, las funciones que describen la fuerza de las partículas deben representar la naturaleza de las interacciones que ocurren.

Antes del desarrollo de los sistemas de simulación se atendía tajantemente a las leyes de la mecánica, y si había algún fallo al predecir trayectorias, se suponía que el error cometido se debía al desconocimiento o la inexactitud de las fuerzas que rigen un sistema. En los estudios de DM, esto sigue siendo así en parte, pero ahora se toman otras medidas, como incorporar la mecánica cuántica a la hora de establecer el sistema.

Dado que la fuerza gravitatoria no se consideraba suficientemente influyente en el movimiento molecular y por tanto en la predicción de sus trayectorias, se tomó en cuenta la fuerza electromagnética, la cual viene principalmente descrita por las ecuaciones de Maxwell. En simulaciones moleculares se consideran la fuerza electrostática como un conjunto limitado de fuerzas electromagnéticas, y las interacciones de este tipo se van a evaluar gracias a la ecuación de fuerza entre cargas puntuales descrita por la ley de Coulomb:

$$F(r_{ij}) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r^3} \mathbf{r}$$

Siendo cada q cada carga interaccionando, \mathbf{r} el vector de distancia de las cargas, ϵ_0 la permitividad en el vacío, y r el radio. El campo electrostático alrededor de una de las cargas a una cierta distancia queda definido por la ecuación:

$$E(r_{ij}) = \frac{q_i}{4\pi\epsilon_0 r^3} \mathbf{r} = E(r_{ij}) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r^2} \hat{\mathbf{r}}$$

Aquí $\hat{\mathbf{r}}$ es el vector unidad en dirección a la carga que interactúa con i . El potencial electrostático asociado a la carga es el trabajo que se necesita para llevarla hasta un punto de posición \mathbf{r} con respecto a la misma carga:

$$\phi(r) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r}$$

Y finalmente la energía potencial U entre dos partículas con carga es el trabajo que se necesita para separar dichas cargas a una distancia infinita, y queda definida por:

$$U(r_{ij}) = q_j \phi_i(r_{ij}) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r}$$

Aunque la ley de Coulomb se desarrolló para describir las fuerzas entre objetos cargados que interactúan a distancias macroscópicas, en la mecánica cuántica operaba a escala subatómica. Se cambia la descripción mecánica de los sistemas, donde

ahora tenemos que los electrones y núcleos ligeros se comportan como ondas, pero sus interacciones pueden ser descritas por la ley de Coulomb.

Una vez que tenemos claro qué implican las energías potenciales en las interacciones podemos hablar más concretamente de las de tipo intra o intermolecular.

3.2.1. Potencial intermolecular

La energía intermolecular en un sistema de partículas que están interactuando suelen ser la suma de todos los potenciales de cada una, entre los que se encuentran los de tipo electrostático y de van der Waals, y desde el punto de vista de la mecánica cuántica, ambos potenciales son de naturaleza electrostática (Alavi, 2015). Se trata de interacciones que pueden tener contribuciones tanto atractivas como repulsivas. Las contribuciones repulsivas se dan a las distancias atómicas más cortas, debido a la repulsión electrónica de las capas más externas de la molécula, cuando existe posibilidad de solapamiento. Gracias a esto se consigue un cierto orden en los sistemas, lo que al final determina la estructura de los mismos.

Por el contrario, la contribución atractiva se da a largo alcance y no es tan fuerte en las partículas como en el conjunto, haciendo que se mantenga un cierto nivel de cohesión.

Sin tener en cuenta la precisión en la descripción del sistema en cuanto a las moléculas, sí es importante brindar toda detalle posible a la hora de describir las interacciones por pares de moléculas entre los núcleos y nubes electrónicas, lo cual suele ser una función bastante más complicada. Para enfocar esto, se suele considerar los centros de interacción en la posición de los núcleos atómicos de la molécula, de forma que la interacción total entre un par de moléculas poliatómicas se podría describir por la suma total de todos los posibles pares de contribuciones entre los centros de una molécula 1 con la otra molécula 2:

$$U(r_{12}, \Omega_1, \Omega_2) = \sum_{i=1}^{n_s} \sum_{j=1}^{n_s} U_{ij}(r_{ij})$$

Donde n_s es el número de sitios de interacciones entre las moléculas 1 y 2, U_{ij} es el potencial de interacción esférico y r_{ij} es la distancia que separa a los sitios de interacción.

Al hablar de los sitios de interacción, hay dos formas principales de definir estos sitios: mediante los denominados modelo de todos los átomos o el modelo de átomos unidos. El primero considera cada grupo químico como un centro de interacción, mientras que el segundo considera a cada átomo de la molécula.

Como se mencionaba antes, el potencial de van der Waals es uno de los potenciales intermoleculares que se dan, y una forma común de describir este tipo de interacción, es mediante el potencial de Lennard-Jones, que se da entre pares de átomos normalmente denominados i y j :

$$V_{LJ}(r_{ij}) = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] = \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] = \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6}$$

Donde ϵ se relaciona con la fuerza de la interacción, mientras que σ define la distancia a la cual el potencial es cero, r_{min} es la distancia mínima a la que existe potencial (Rapaport, 2004).

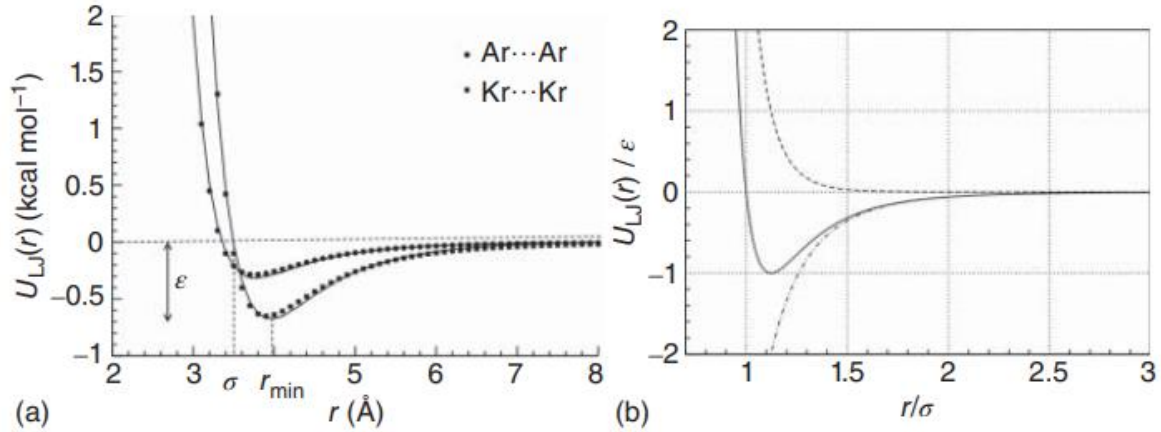


Figura 6. La imagen a) se corresponde a las energías de interacción entre dos átomos de argón y de Kriptón que varían con la distancia. La forma que se dibuja se corresponde con la forma típica del potencial de Lennard Jones, que se puede observar en la imagen b). Imagen tomada de la fuente (Alavi, 2015)

3.2.2. Potencial intramolecular

La energía potencial intramolecular es aquella por la que se mantienen las longitudes de enlace, sus ángulos y los diedros en la molécula pero que además dan a la misma una cierta flexibilidad.

Se da entre átomos enlazados en una misma molécula, y de acuerdo a la mecánica clásica está definida de la siguiente forma

$$U_{intra}(R) = \sum_{ij} U_{bond}(|R_i + R_j|) + \sum_{ijk} U_{angle}(\theta_{ijk}) + \sum_{ijkl} U_{torsion}(\phi_{ijkl})$$

Siendo el primer término la representación de la interacción entre dos átomos contiguos, como un enlace covalente. Se suele definir como

$$U_{bond}(R_{ij}) = \frac{1}{2} k_{R,ij} (R_{ij} - R_{ij,0})^2$$

- $k_{R,ij}$ es la constante de fuerza para en enlace entre los átomos i y j , $R_{ij,0}$ es la longitud de equilibrio de enlace con el mínimo potencial. Es la descripción de un potencial armónico.

El segundo termino se corresponde con la energía del ángulo de enlace. El potencial analítico de flexión angular más utilizado en las simulaciones moleculares para representar estos datos es el potencial armónico.

$$U_{angle}(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{\theta,ijk} (\theta_{ijk} - \theta_{ijk,0})^2$$

- De nuevo, $k_{\theta,ijk}$ representa la constante de fuerza, esta vez para el ángulo de equilibrio, ahora entre los átomos ij y jk .

El último término, es la energía asociada al ángulo de torsión, que se debe la variación de los ángulos diedros en cuatro átomos conectados de forma consecutiva. Es la energía más débil de las descritas, y se describe principalmente como

$$U_{torsion}(\phi_{ijkl}) = \frac{1}{2} A (1 + \cos(m\phi_{ijkl} - \phi_{ijkl,0}))$$

- Donde A es la barrera límite del potencial, m es la periodicidad y δ es la fase del potencial.

Cada uno de los tipos de enlace o interacción se muestran en la Figura 7

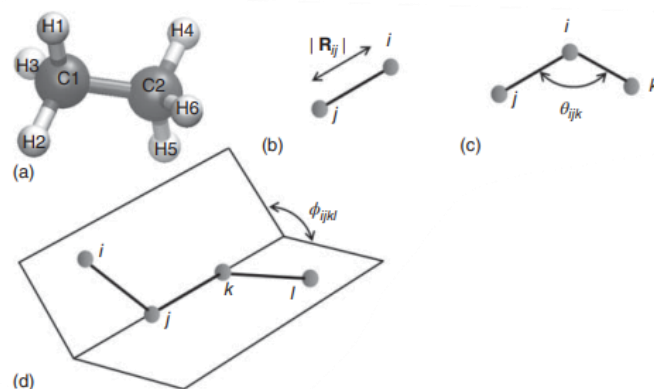


Figura 7. (a) Una molécula de etano utilizada como ejemplo para representar las interacciones intramoleculares (b) debida al enlace entre átomos, (c) al ángulo de enlace y (d) al ángulo diedro. Imagen tomada y editada de (Alavi, 2015)

3.3. Coeficientes de difusión

Los sistemas macroscópicos en el equilibrio tienen propiedades que se mantienen uniformes e invariables en el tiempo y definen el estado del sistema, como son la presión, temperatura y densidad. Al hacer simulaciones, podemos observar el comportamiento del sistema cuando le imponemos otras condiciones que hacen que salga del equilibrio. Pueden darse flujos de materia, energía y nuevas interacciones en las distintas partes del sistema. Y si se relajan las imposiciones, los flujos cambian a cierta velocidad hasta que las variables termodinámicas vuelvan al equilibrio. El comportamiento de los sistemas fuera de equilibrio puede ser caracterizado mediante propiedades como el coeficiente de difusión. (Alavi, 2015; Rapaport, 2004)

La difusión se define como un proceso de transporte pasivo en el que una sustancia se mueve desde una zona de alta concentración a otra con menor concentración, hasta que los niveles en ambas se igualan (Figura 8) Esto ocurre por ejemplo con los metabolitos o sustancias que se mueven en el citosol celular y que atraviesan la membrana. Se podría decir que el gradiente formado por la diferencia de

concentración es una especie de potencial que consigue que las sustancias atraviesen la membrana, y la difusión es la forma en que ese potencial se disipa. Sin embargo, es un proceso que se da sin gasto de energía. (3.5 Passive Transport - Concepts of Biology - OpenStax CNX, n.d.)

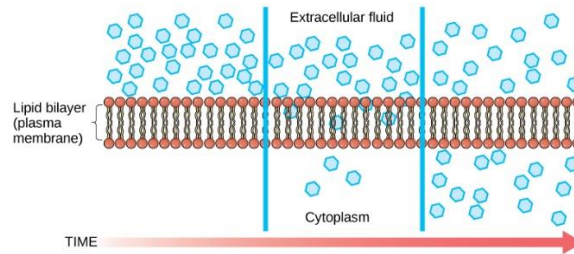


Figura 8. Ilustración de una membrana permeable a una cierta sustancia y como esta difunde de acuerdo al gradiente, desde una zona de alta a otra de baja concentraciones. Créditos: (3.5 Passive Transport - Concepts of Biology - OpenStax CNX, n.d.)

En DM, para un sistema continuo el coeficiente de difusión D se obtiene por la Ley de Fick, una ley que relaciona el flujo de masas con el gradiente de densidad.

$$j = -D\nabla c$$

Donde j es el flujo de materia y $c(r, t)$ es la concentración. Si consideramos la variación de j en el tiempo, combinando la ecuación de la ley de Fick en una que exprese la conservación de materia, quedaría descrito mediante la ecuación

$$\frac{\delta c(r, t)}{\delta t} + \nabla j(r, t) = 0 \quad \rightarrow \quad \frac{\delta c(r, t)}{\delta t} - D\nabla^2 c(r, t) = 0$$

Resolviendo mediante la condición de frontera

$$c(r, 0) = \delta(r) \quad \rightarrow \quad c(r, t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{d/2}} \exp\left(-\frac{r^2}{4Dt}\right)$$

A tener en cuenta, d hace referencia a la dimensionalidad del sistema. Si de lo anterior nos centramos en la dependencia temporal del sistema tenemos que

$$\langle r^2(t) \rangle \equiv \int dr c(r, t) r^2$$

Obtendremos la ecuación para la evolución temporal de $\langle r^2(t) \rangle$ multiplicando la tercera ecuación por r^2 e integrando:

$$\frac{\delta}{\delta t} \int dr c(r, t) r^2 = D \int dr c(r, t) \nabla^2 r^2$$

Simplificando el lado izquierdo y aplicando la integración al lado derecho resulta tal que

$$\frac{\delta \langle r^2(t) \rangle}{\delta t} = D \int dr c(r, t) \nabla^2 r^2 = 0 + 2dD \int dr c(r, t) = 2dD$$

Relacionándose el coeficiente de difusión con el ancho del perfil de concentración.(Disalvo & Simon, n.d.; Frenkel, Daan, 2001)

El cálculo del coeficiente de difusión guarda una fuerte relación con el desplazamiento cuadrático medio, ya que se trata del desplazamiento recorrido por una partícula, que en nuestra simulación posee una serie de coordenadas, en un momento inicial, y que va recorriendo el sistema (figura 9). Si se va calculando ese cambio de coordenadas o desplazamiento, y se toman los cuadrados de las distancias recorridas, al hacer su promedio se obtiene el desplazamiento cuadrático medio(MSD)(Alavi, 2015)(Leach, 2001). El MSD para N moléculas en una simulación viene definido por la ecuación:

$$MSD(t) = \langle |r(t) - r(0)|^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |r_i(t) - r_i(0)|^2$$

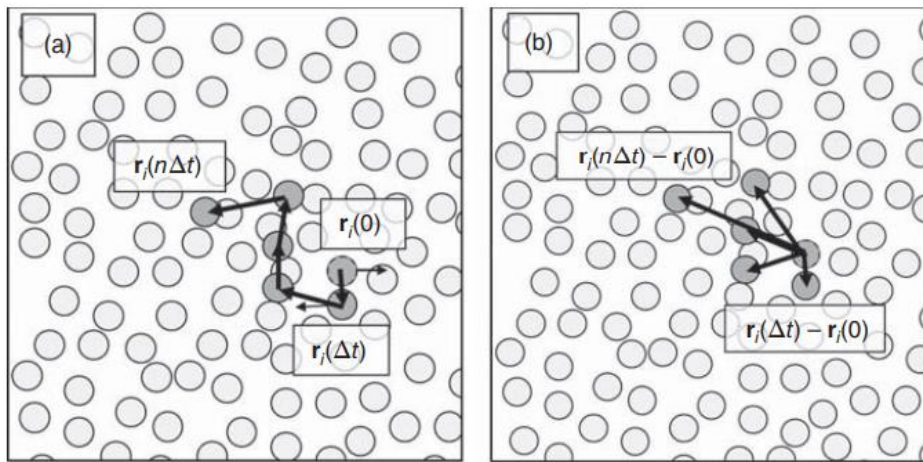


Figura 9.(a) Posición de una partícula de referencia i en r_i a tiempo $t=0$ y después de varios pasos. (b) Los vectores de desplazamiento de la partícula

Para membranas, por lo general la movilidad de los lípidos presentes se expresa con el coeficiente de difusión lateral, que se calcula a partir del MSD y mediante la ecuación de Einstein(Niemelä et al., 2004).

$$D_{lat} = \frac{\langle r^2 \rangle}{2dt}$$

Donde d sería la dimensionalidad, de forma que la difusión lateral que ocurre en el plano de una membrana, $n=2$.

El coeficiente de difusión se obtiene mediante el cálculo de MSD en el plano de la membrana (xy), por ser el plano en que se observa comportamiento browniano de las moléculas.

3.4. Densidad

En términos generales, la densidad da la información de la cantidad de sustancia que hay en un volumen determinado. Dicha cantidad de sustancia, puede expresarse en términos de masa, moles o número de partículas, ya sean átomos o moléculas.

En el caso más concreto de la simulación molecular, mediante la densidad podemos saber cómo se distribuye la materia a lo largo de las distintas dimensiones.

Cuando se encuentran distintas fases, como ocurre entre una fase líquida y otra gaseosa, la densidad varía de forma continua entre la fase vapor de densidad ρ_v y la fase líquida de densidad ρ_l . Esto también ocurre en la simulación que se estudia en este trabajo, donde se encuentran dos fases formadas, una de agua y la otra que es una bicapa de EM. El perfil de densidad probablemente es la forma más directa de medir la estructura de la interfase bicapa-agua.

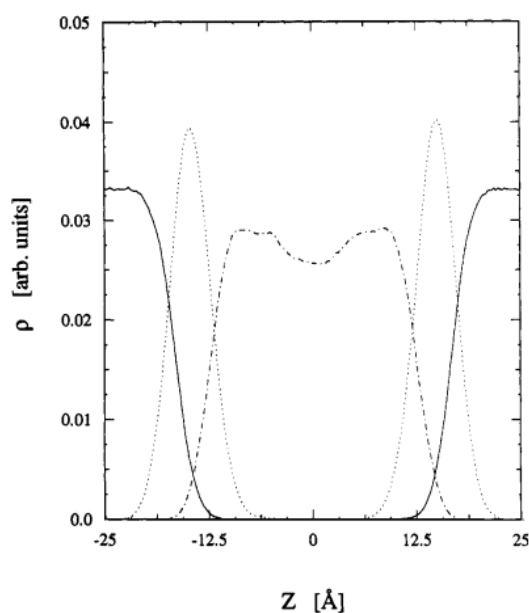


Figura 10. Perfiles de densidad de agua (línea continua), de glicerol 1-monoleato (los grupos en la zona de la cabeza) (línea de puntos) y una cadena de átomos alquil (línea de guiones y puntos) en función de las coordenadas en el eje perpendicular a la interfase. Fuente (Wilson & Pohorille, 1994)

En nuestra simulación se ha obtenido el perfil de densidad de masas (MDPs) para cada grupo, esto es, la membrana por un lado así como algunas de las especies atómicas más relevantes en la molécula de esfingomiélica, y la fase de agua después.

3.5. GROMACS

GROMACS son las siglas de GRONingen MACHine for Chemical Simulations. Se trata de un paquete de software de código abierto y libre, un motor con el que realizar las simulaciones de dinámica de distintos tipos de molécula.

Es un software desarrollado por Berendsen Herman en la Universidad de Groningen, Holanda, en un principio debido a la propia necesidad de conseguir simulaciones más eficientes, pero que decidió publicarse como software libre y de código abierto, se ha convertido en una infraestructura compartida, construida en colaboración por varias universidades y laboratorios de investigación, gracias a lo cual ha ido mejorando y dando nuevas versiones. Para este trabajo se utilizó la versión de GROMACS 5.1 (Abraham et al. 2015), cuyo código, tutoriales, manuales y documentación están completamente disponibles en <http://www.gromacs.org>

Este programa soporta los distintos tipos de campos de fuerza existentes, pudiendo implementarse aquel que sea necesario. En el caso de este estudio, se utilizó el campo de fuerza GROMOS54A7(Huang, Lin, y Van Gunsteren 2011).

Para llevar a cabo las simulaciones son necesarios una serie de archivos de entrada, los inputs, los cuales contienen la configuración inicial del sistema, las características de las partículas que lo forman y la información del campo de fuerza utilizado; y los archivos de salida, donde encontraremos los valores de la simulación, como las coordenadas finales, la velocidad, trayectorias e información necesaria para obtener todas las propiedades termodinámicas del sistema.

Por otro lado, existen una serie de herramientas que nos permiten visualizar las simulaciones y representar gráficamente los análisis extraídos de las mismas, como Grace y Visual Molecular Dynamics (VMD).

3.5.1. Modelos de la simulación

Una de las limitaciones de la aplicación de la DM a las simulaciones es la naturaleza de los campos de fuerza que experimentan las partículas de nuestro objeto de estudio, y como de aproximado puede ser el modelo de campos de fuerza empleado que describe las interacciones entre las distintas partículas del sistema durante en las simulaciones(Huang et al., 2011; Lin & Van Gunsteren, 2013). Este parámetro debe describirse con suficiente precisión como para reproducir las propiedades y mecanismos que se dan en el proceso a analizar, ya que la precisión de los resultados que obtengamos depende de ello(Schmid et al., n.d.).

3.5.1.1. Campo de fuerza GROMOS54A7

Se han desarrollado diversos modelos de campos de fuerza a lo largo de los años, como CHARMM, OPLS, AMBER o GROMOS (Christen et al. 2005; Jo et al. 2008; Jorgensen, Maxwell, y Tirado-Rives 1996; Salomon-Ferrer, Case, y Walker 2013). De este último se han ido desarrollando diferentes tipos, variando sus parámetros según los requerimientos de los usuarios y las simulaciones.

El uso del campo de fuerza GROMOS esta principalmente destinado a simulaciones cuyo ambiente implica temperaturas y presiones de interés biológico(20-40°C ; 1 bar) para líquidos, cristales y soluciones, condiciones que pueden darse en sistemas biomoleculares como ocurre con las proteínas, ácidos nucleicos o lípidos.

Las versiones más usadas de GROMOS son la 43A1(1996), 45A3(2001), 53A6(2004) y el que se usa en el presente trabajo, el GROMOS54A7 desarrollado en 2011(Huang et al., 2011).

El campo de fuerza GROMOS 54A7 es una modificación de la versión 53A6 en la que en rasgos generales cambian cuatro parámetros(Lin & Van Gunsteren, 2013; Schmid et al., n.d.):

1. La energía de torsión de los ángulos de enlace, a la que en el apartado 3.3.2 se definía como energía de torsión o la energía provocada por los ángulos diedros. También se reajustaron algunos parámetros en interacciones de van der Waals. Con esto se consigue un incremento en los enlaces por puentes de hidrógenos entre grupos N-H y C=O presentes en las moléculas.
2. Se introduce un grupo -CH₃ cargado con la idea de aumentar la repulsión entre los grupos -CH₃ y -OM en moléculas tipo dipalmitoilfosfaditilcolina
3. Parametrización de las interacciones de van der Waals para átomos de Na⁺ y Cl⁻ aumentando la energía libre de hidratación, con la idea de introducir propiedades de solvatación en el sistema.
4. Dos nuevos diedros impropios se añaden para facilitar el cálculo de la energía libre implicada en los cambios de quiralidad de las moléculas.

Estos cambios mostraron mejoras significativas en diversos estudios, reproduciendo mejor que 53A6 los equilibrios de plegado y mejorando la estabilidad de la estructura secundaria de proteínas, y representando mejor el ordenamiento de motivos de glicerol o colina en membranas (Lin & Van Gunsteren, 2013; Poger & Mark, 2012; Schmid et al., n.d.)

3.5.1.2. Modelo de agua SPC

En las simulaciones de DM, el solvente es una de los tipos de molécula más necesarios, y el agua probablemente sea el mejor candidato para incluir en los estudios y ver cómo afecta a las propiedades del modelo.

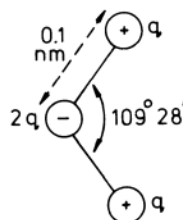


Figura 11. Modelo de agua SPC. Geometría y cargas. Fuente: Berendsen et al., 1981

En simulaciones de interfaces lipido-agua, uno de los modelos que más se usan es el de una única carga o *Simple Point Charge* (SPC) (Berendsen et al., 1981). También existe el denominado modelo de una única carga extendido o *Extended Simple Point Charge* (SPC/E), pero en este trabajo se ha preferido usar el primero por algunas razones. (Fuhrmans et al., n.d.)

MD run characteristics:	
density	$\rho = 1 \text{ g cm}^{-3}$
temperature	$T = 300 \text{ K}$
nr or mols N	$N = 216$
time step	$\Delta t = 0.0005 \text{ ps}$
time span	$t = 12.5 \text{ ps}$
cut-off radius	$R_c = 0.85 \text{ nm}$
MD run results :	
potential energy	$-E = 42.2 \text{ kJ.mol}^{-1} (41.8^*)$
pressure	$pV/NkT = -0,36 (0.0)$
difussion constant D =	$D = 3.6 \times 10^{-2} \text{ ms}^{-2}$

Figura 12. Propiedades del modelo SPC de agua. Los números entre paréntesis representan resultados experimentales. Imagen tomada y editada de Berendsen et al., 1981.

El modelo SPC/E se desarrolló para tener en cuenta la energía de la polarización en las moléculas de agua, dando una mejor distribución radial, densidad, constante de difusión o constante dieléctrica. Sin embargo, estas mejoras no son fáciles de aplicar en mezclas sin afectar a la solubilidad. Dado que la solubilidad es un factor importante en las interfases como la de agua-membrana como es este caso, es preferible usar el modelo SPC. (Tieleman & Berendsen, 1996)

3.5.2. Infraestructura y configuración

La simulación se realizó accediendo de forma remota a los ordenadores Camaragibe de la Universidad Complutense de Madrid mediante credenciales otorgadas. En dicha máquina, había un directorio personal con una serie de archivos preparados para realizar la simulación.

Entre estos archivos se encontraban los relativos a la topología del sistema, un directorio con la información de los campos de fuerza, tanto el GROMOS54A7 como el de agua SPC mencionados antes. El archivo *grompp.mdp* tenía la información relativa a los parámetros de simulación.

La simulación se realizó en el colectivo canónico generalizado isotérmico-isobárico, controlado con el termostato de Berendsen. Para la “búsqueda de vecinos” se establecieron las condiciones de contorno periódicas y una distancia de las interacciones de corto alcance “*rlist*” 1.20 nm. También se definió 1.20 nm para el radio de corte del potencial y un radio de 0.65 nm a partir del cual el potencial de L-J cambia.

En los parámetros de control de la simulación se utilizó un paso de tiempo $dt = 0.001 \text{ ps}$ y un valor de pasos $nsteps = 50000000$ lo que establece una duración de simulaciones de 50ns.

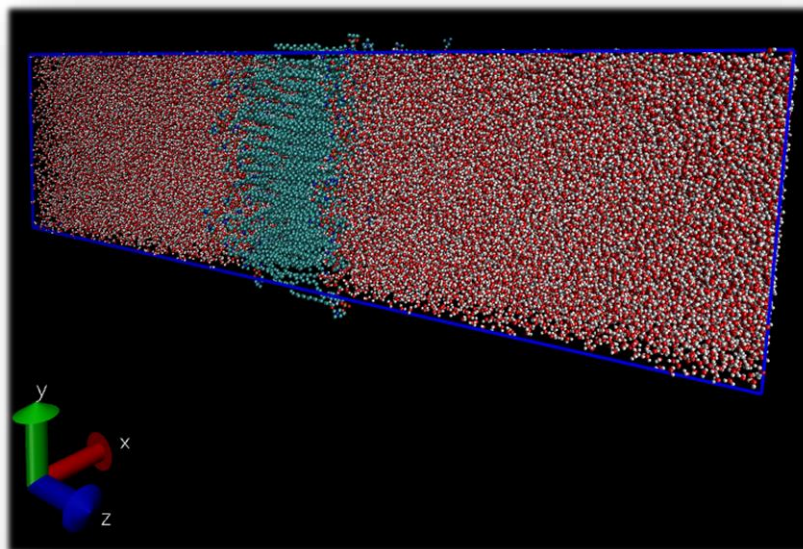


Figura 13. Captura de pantalla de VMD del estado inicial del sistema a 273K o 0°C

Para la realización de cada la simulación fue necesario disponer de los archivos de configuración del sistema *conf.gro*, *grompp.mdp*, *smp.itp*, el directorio *gromos54a7.ff* con los archivos de campos de fuerza, el archivo de topología *topol.top* y el script para correr la simulación *run_gromacs.sh*.

Como cada simulación se realizaba a una temperatura distinta manteniendo iguales el resto de parámetros, tan solo hizo falta modificar el valor de las temperaturas en *grompp.mdp* a la deseada en cada caso. Se realizaron 6 simulaciones con temperaturas entre 0 y 75°C/273 y 348K, con 15°C/K de diferencia en cada una, todas a una presión de 1 bar en todos los ejes.

Las simulaciones tardan un largo periodo de tiempo en completarse, unos 5 días, debido a la gran cantidad de moléculas del sistema, 50800 de agua y 288 de esfingomielina, 167952 átomos en total, por lo que se necesita mucha potencia de computación. Las dimensiones de la caja para este sistema son :

T (K)	Lx (nm)	Ly (nm)	Lz(nm)
273	8,894	7,494	27,882
288	8,914	7,500	28,047
303	8,895	7,463	28,535
318	8,892	7,533	28,601
348	8,807	7,800	28,644
Media	8,881	7,558	28,341

Tabla 1. Medidas de la caja de simulación para cada temperatura y valor medio para cada lado de la caja.

4. Resultados

Al finalizar las simulaciones a distintas temperaturas, mediante el uso de comandos gmx se pudieron obtener los archivos correspondientes a la densidad, tanto del agua del medio como de la propia membrana, y al desplazamiento cuadrático medio(MSD).

También se calculó el parámetro de área/lípido para cada simulación mediante el tamaño de los laterales de la caja y la cantidad de moléculas de PSM

Sin embargo, esto no fue un gran problema, ya que con los datos reportados las demás simulaciones se siguen obteniendo resultados concluyentes.

4.1. Densidad de membrana en agua

En todas las simulaciones la gráfica de densidad de agua frente a la de esfingomielina, presentaba el mismo patrón: en las zonas en que es menor la densidad de agua, es mayor la de esfingomielina, dándose unos máximos de densidad en lo que podría ser la zona de interfase lípido-agua(ver Figura 14).

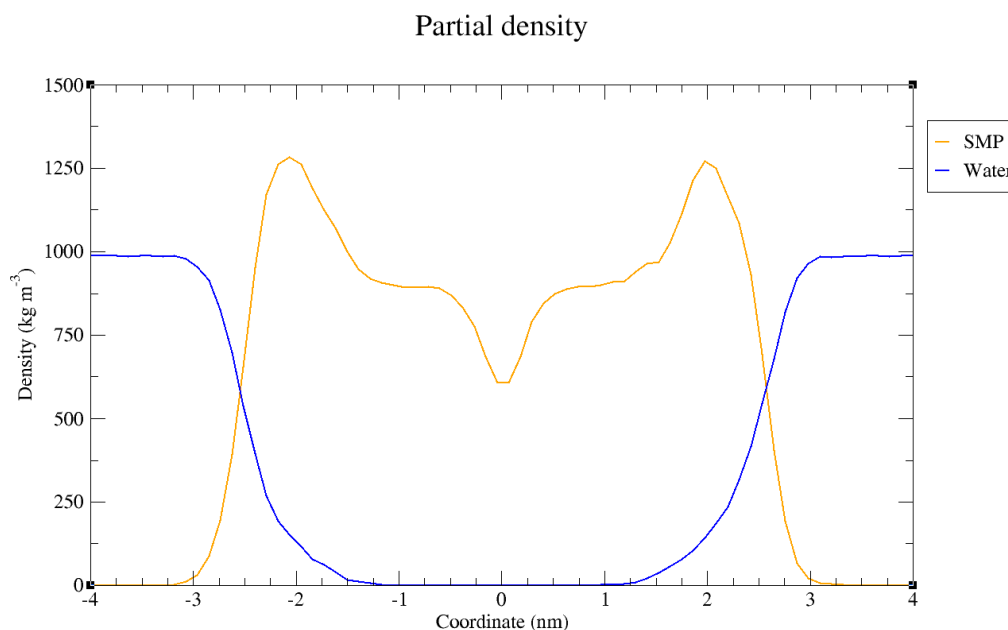


Figura 14. Gráfica de densidad de las fases de simulación, membrana(SMP) y agua. La densidad del agua disminuye a medida que aumenta la de la membrana.

Este comportamiento corresponde a lo esperado en un sistema de este tipo, teniendo en cuenta los estudios previos (ver ejemplo de Figura 10): la densidad del agua disminuye donde aumenta la de la membrana, hasta llegar a cero, por lo tanto, no hay a penas moléculas de agua entre las de la membrana, tan solo en las zonas donde se supone que estarían las cabezas polares de los lípidos, que si están en contacto con agua.

Además, aunque la densidad de moléculas de esfingomielina muestra unos máximos en 11.3 y 15.2 nm (aproximadamente) también presentan un mínimo relativo de

densidad en la zona de 13 a 13.5 nm. Esto se debería a la zona en que las colas hidrocarbonadas de la bicapa se enfrentan (ver Figura 15)

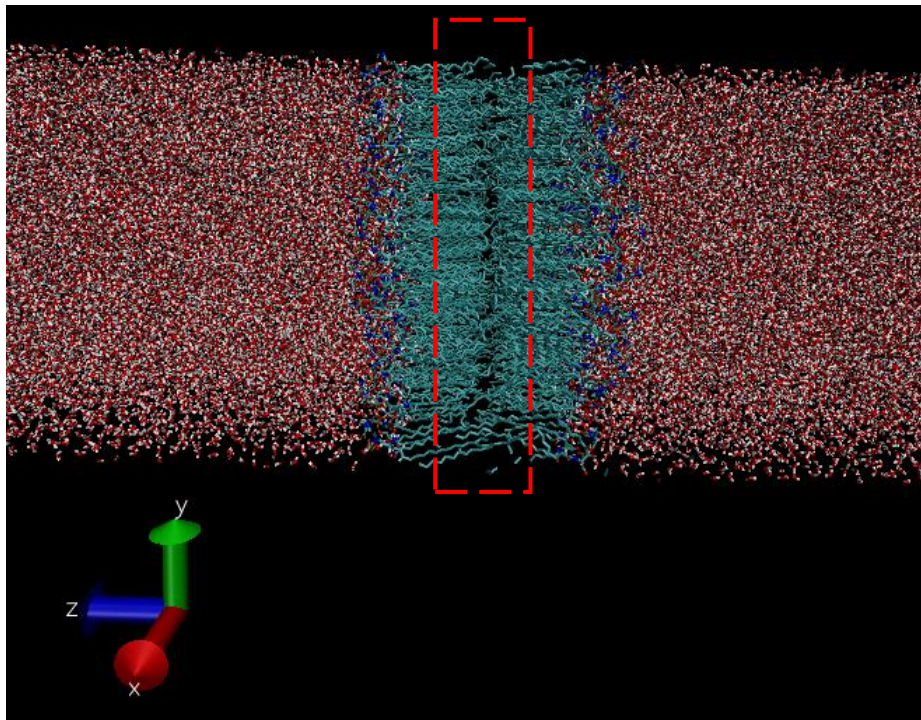


Figura 15. Zona de baja densidad de moléculas de esfingomielina, donde las colas apolares se disponen enfrentadas.

4.1.1. Densidad de especies atómicas en SMP

Para obtener más datos estructurales de la membrana, se procedió a analizar perfiles de densidad de las especies atómicas o grupos funcionales más representativos o más relevantes de la cabeza polar del lípido por ser las más expuestas a las moléculas de agua las cuales pueden observar en la imagen: oxígenos (O1, O2), nitrógenos (N1, N2) y fósforo (P1).

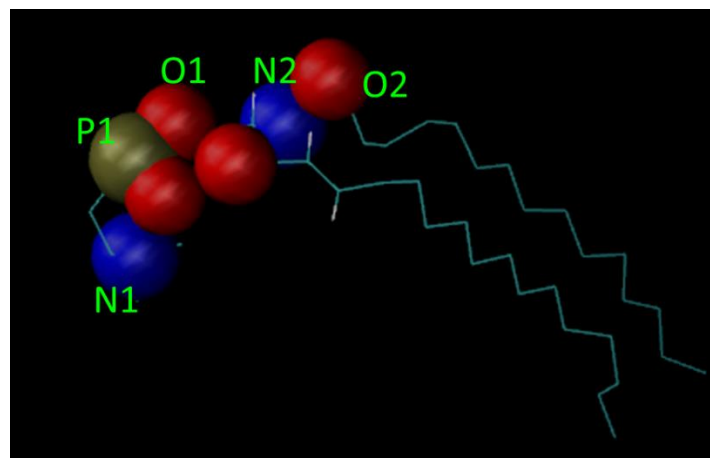


Figura 16. Molécula de esfingomielina con átomos resaltados como esferas coloreadas. Las esferas azules se corresponden con átomos de nitrógeno; las esferas rojas, átomos de oxígeno; la esfera dorada es el átomo de fósforo.

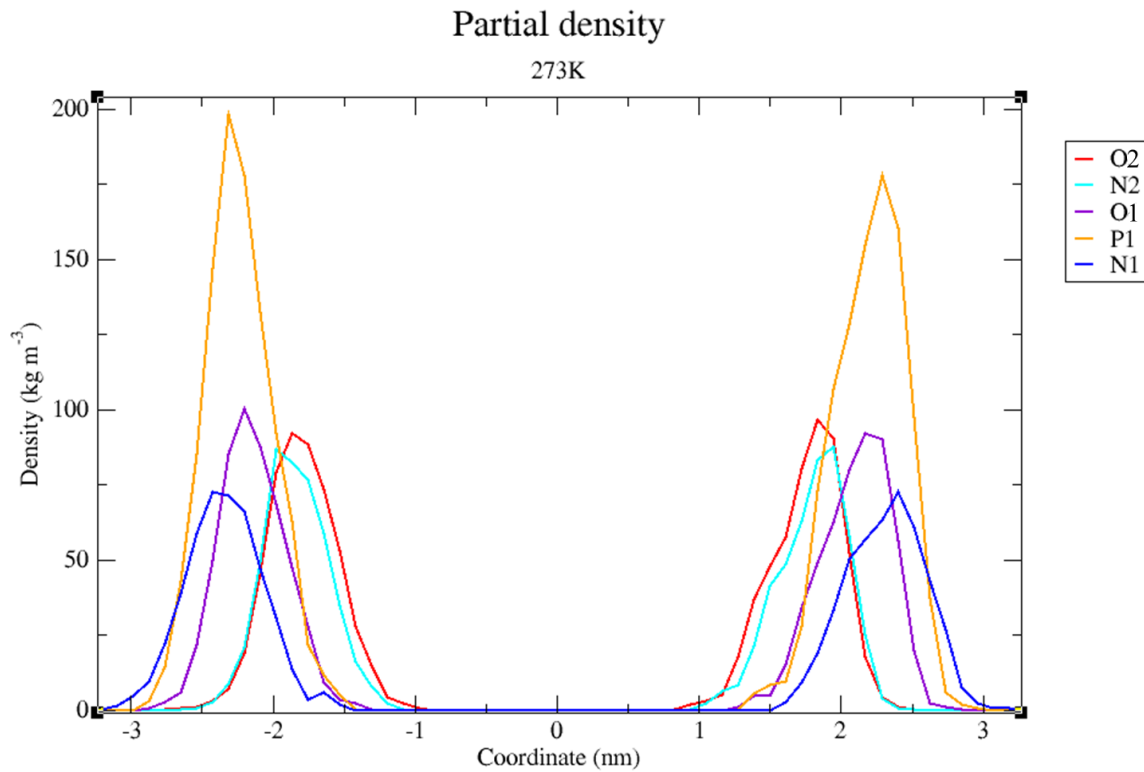
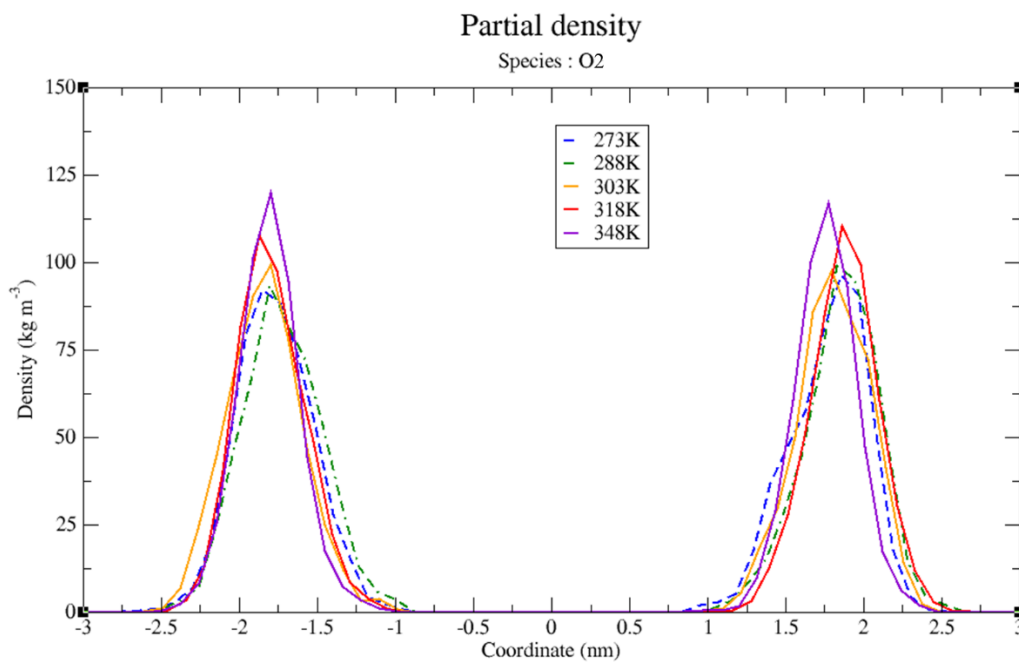


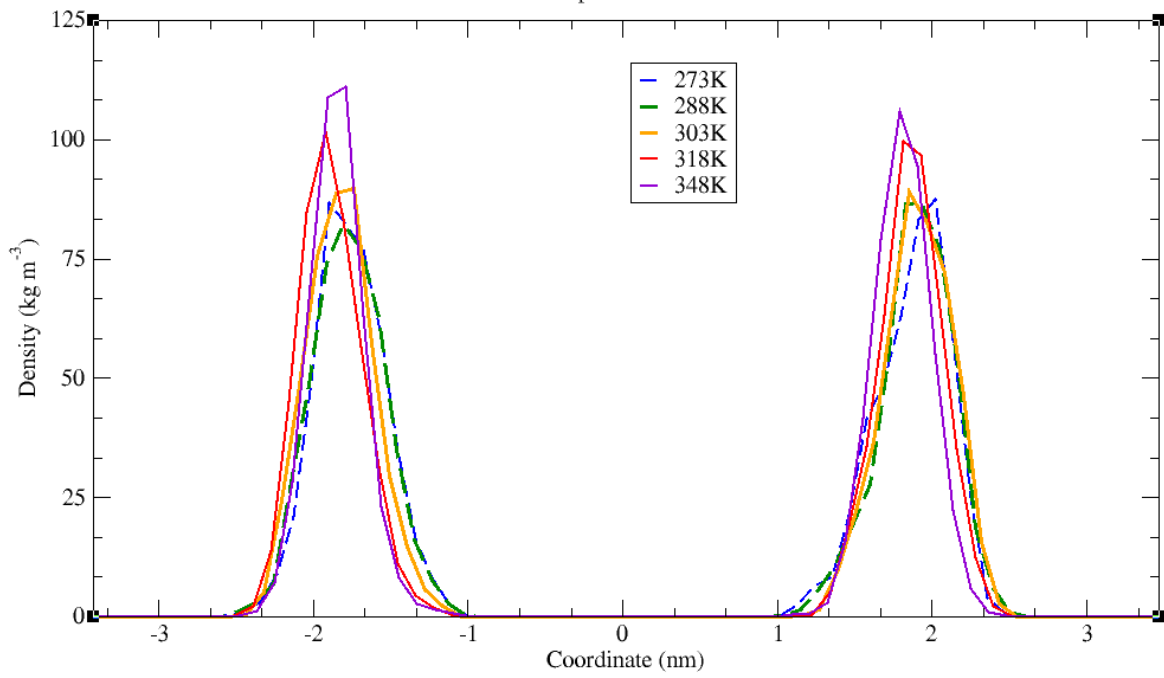
Figura 17. Perfiles de densidad de las especies de oxígeno (O4, O5), nitrógeno (N1, N2) y fósforo (P1) a una temperatura de 273K

Como se puede observar en la figura 17 y de acuerdo a lo que se aprecia en las figuras 15 y 16, una de las especies más presentes en el extremo o zona de la interfase de la membrana es el fósforo, dado que es parte de la cabeza polar de la molécula, que se expone al medio de agua. Cerca está el N1, por estar en el extremo polar también, y más expuesta que el fósforo dado que el alcance de su perfil de densidad es mayor.



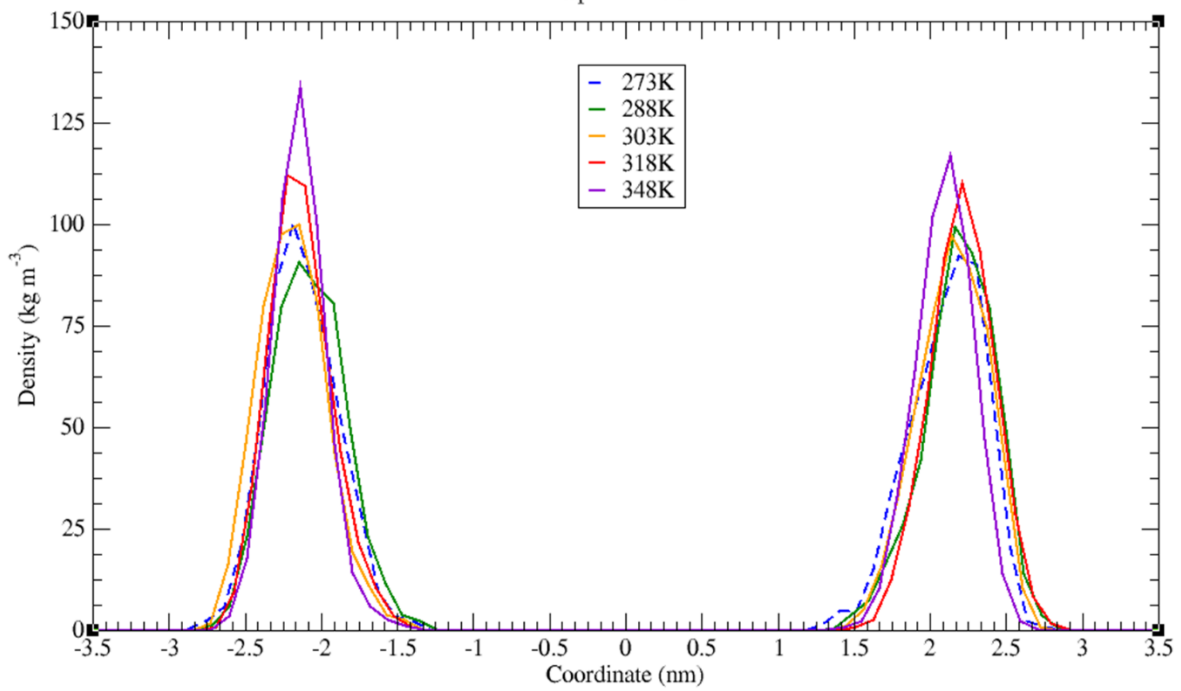
Partial density

Species : N2



Partial density

Species : O1



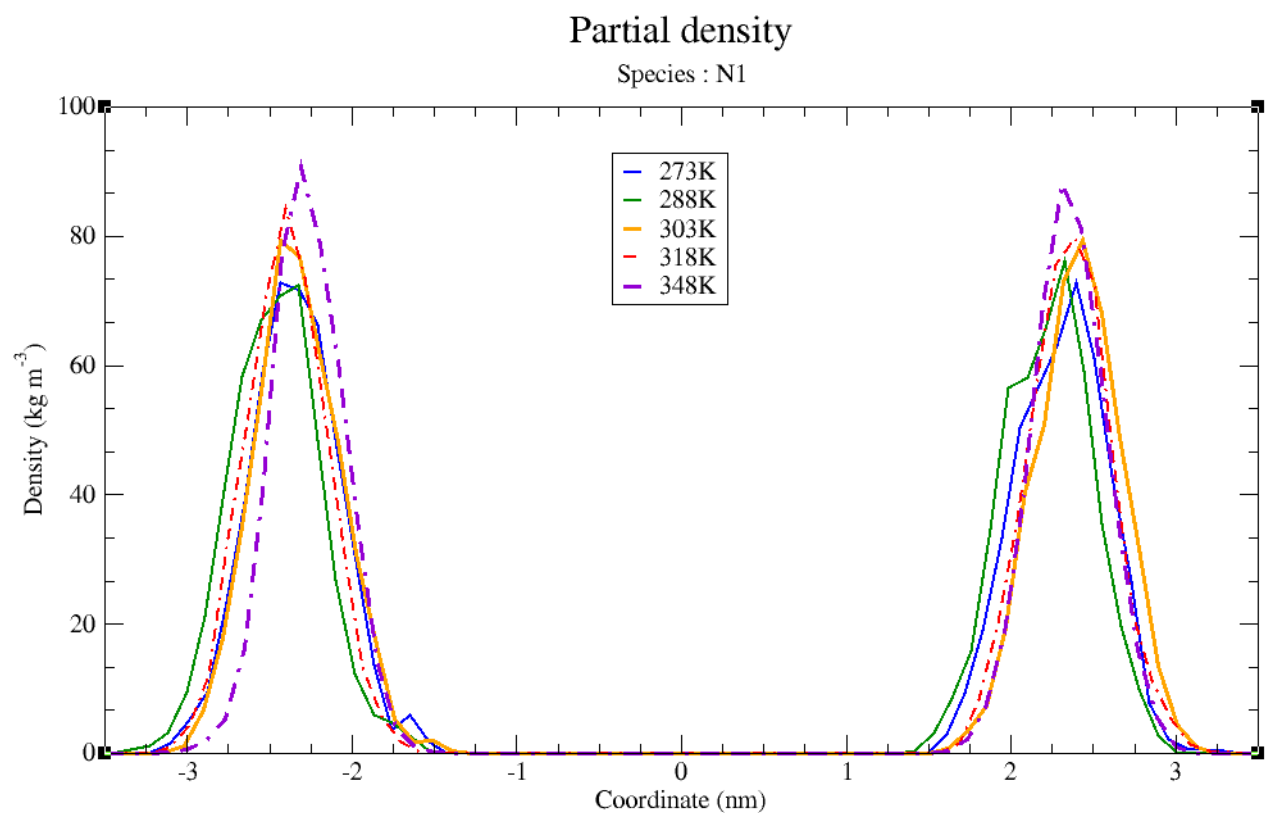
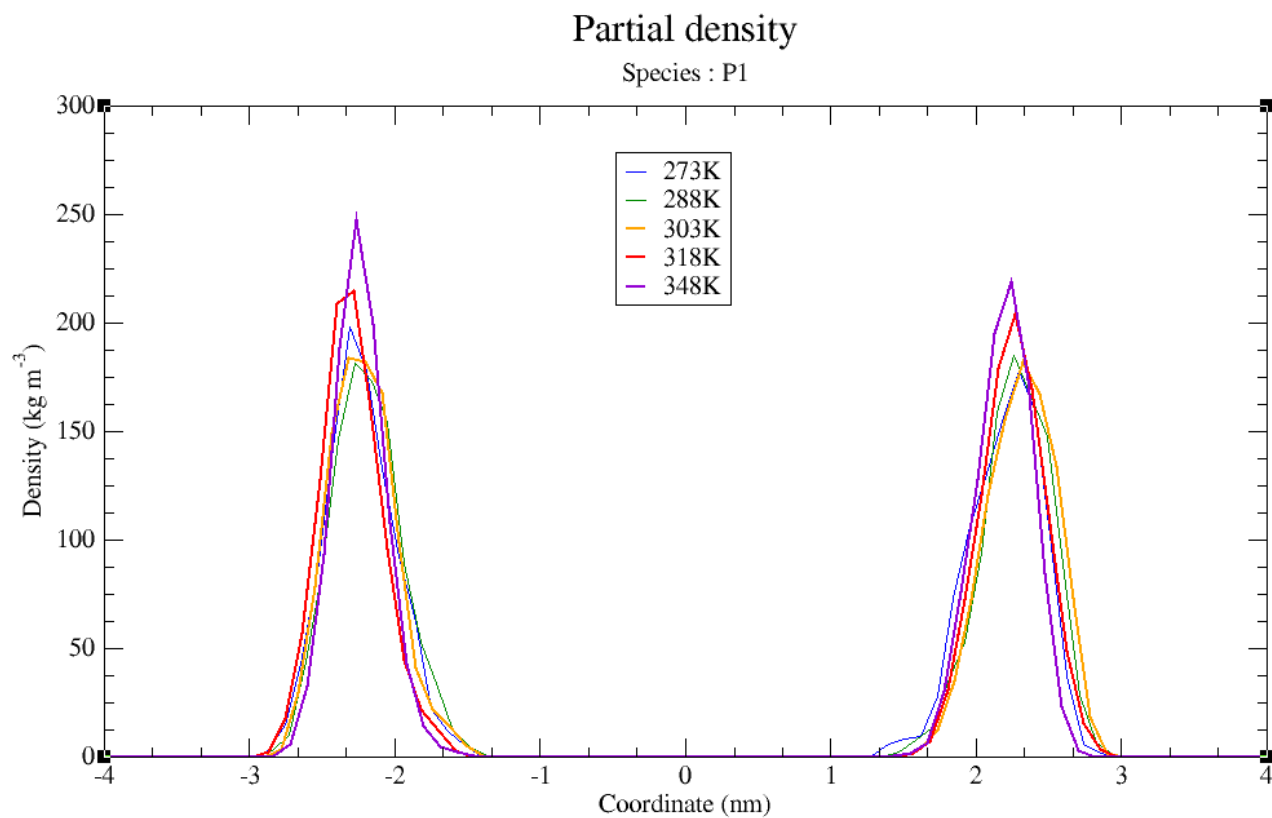


Figura 18,19,20,21,22. Densidades parciales de las especies atómicas O5, N2, O3 y O6, O4, P1 y N1, presentes en la esfingomielina a las distintas temperaturas a las que se han realizado las simulaciones.

De acuerdo a lo que se observa en las figuras 18-22 en general la densidad varía con la temperatura, de forma que a bajas temperaturas los máximos son menores. Es decir, hay una cierta tendencia de aumento de la densidad con la temperatura.

Además, con el aumento de la temperatura también se observa que las zonas de menor densidad de cada especie se estrechan y las de mayor densidad se estrechan. Esto se observa especialmente en N1 y P1, siendo los átomos más expuestos al agua y que pasan por mayores cambios en su densidad conforme aumenta la temperatura del sistema.

Al ser los que, aparentemente más sufren este cambio estructural, podrían ser las especies donde se da el inicio del desorden del resto de la molécula de SMP y su cambio estructural. Estos cambios de densidad indican que la bicapa está sufriendo un proceso de descompresión cuando la temperatura aumenta.

4.1.2. Densidad de esfingomielina y agua

Los cambios de densidad tienen más significado cuando se observa la densidad de las moléculas de esfingomielina completas, la distribución de moléculas se ensancha.

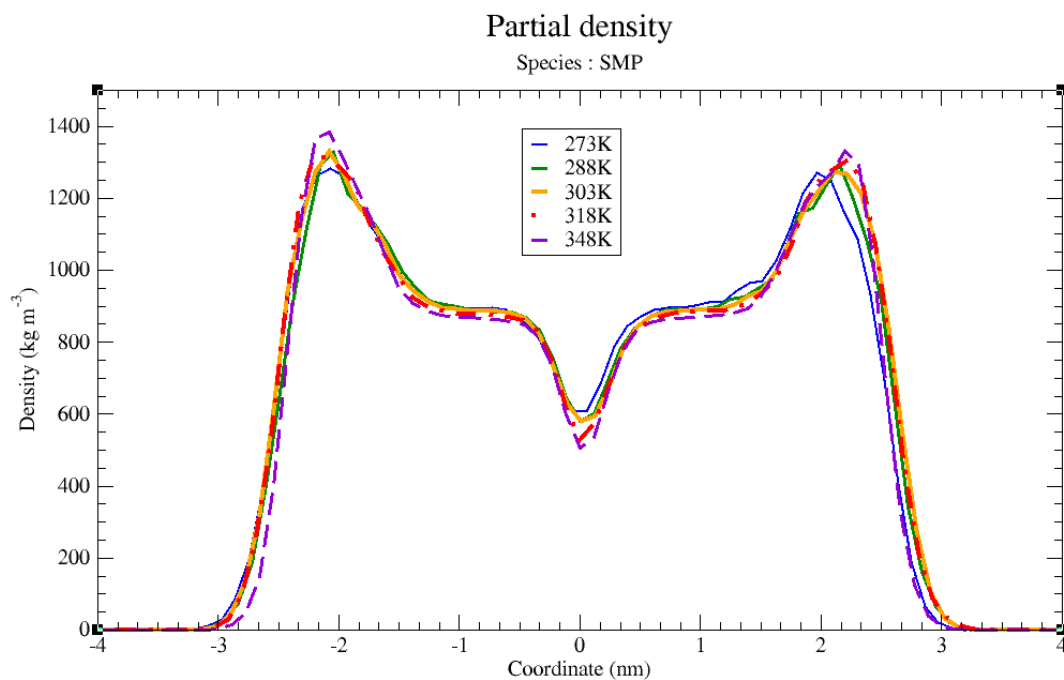


Figura 23 Densidades parciales de la molécula de esfingomielina a las distintas temperaturas de simulación.

T (K)	ancho de membrana (nm)
273	4,03
288	4,15
303	4,16
318	4,31
348	4,275

Tabla 2. Valores de ancho de membrana según la temperatura de la simulación

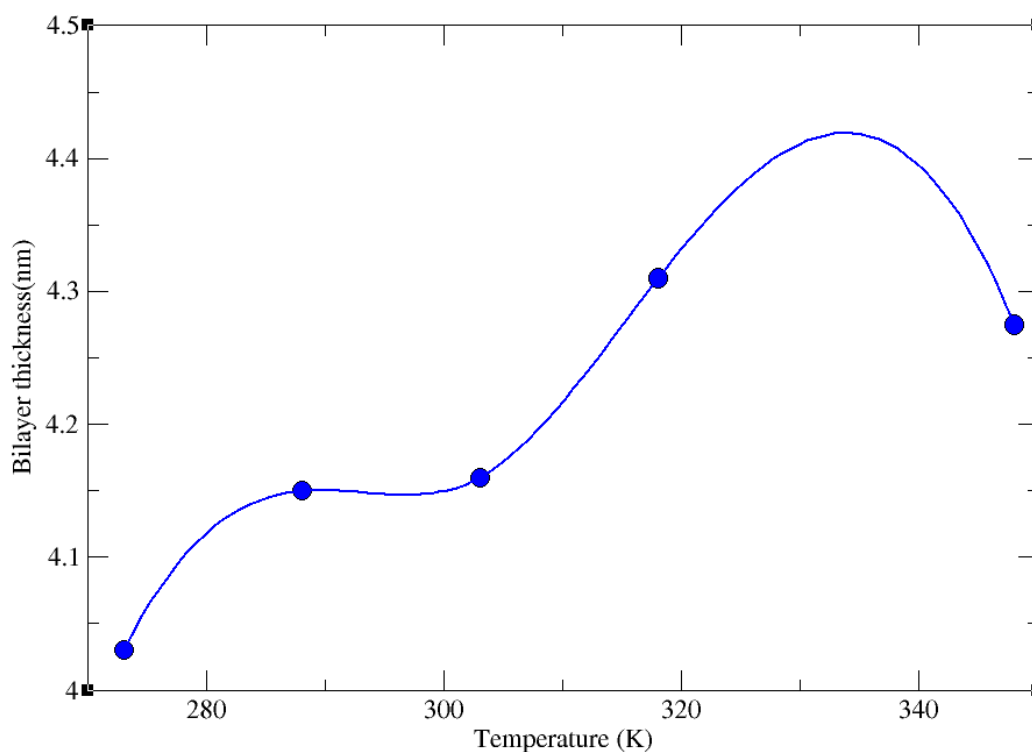


Figura 24. Evolución del ancho de membrana frente a la temperatura. Aunque hay una tendencia de aumento conforme aumenta la temperatura, hay zonas donde no se cumple, lo cual podría anunciar, estados de pretransición de fase.

También se ve una tendencia de aumento del ancho de membrana a temperaturas más altas, aunque hay zonas donde esto no se cumple, manteniéndose el ancho, debido a que durante la transición desaparecen los dominios de lípidos de una fase a la otra de forma gradual con la temperatura. Entre 288-303K(15-30°C) el ancho de membrana es relativamente estable, rango de temperaturas que coincide con el estado de pretransición mencionado en la introducción, donde la membrana se encuentra en un estado entre cristal ordenado y fluido.

Esta fluctuación en el crecimiento del ancho de membrana se observa también a 348K debido a la transición a fase fluida.

Así mismo, se puede observar como el agua que rodea a la membrana varía su densidad al aumentar la temperatura, siendo menor a temperaturas mayores(Fig. 26). Esto entra dentro de lo esperado en el agua, y en principio podría parecer que no aporta nada nuevo, pero tiene más relevancia si se compara el perfil de densidad del agua a distintas temperaturas frente al de la membrana a las mismas temperaturas.

Para no sobre cargar de líneas la gráfica y poder observar mejor la relación entre la densidad del agua y la membrana, se observan los perfiles a temperaturas mínima y máxima(Fig. 27)

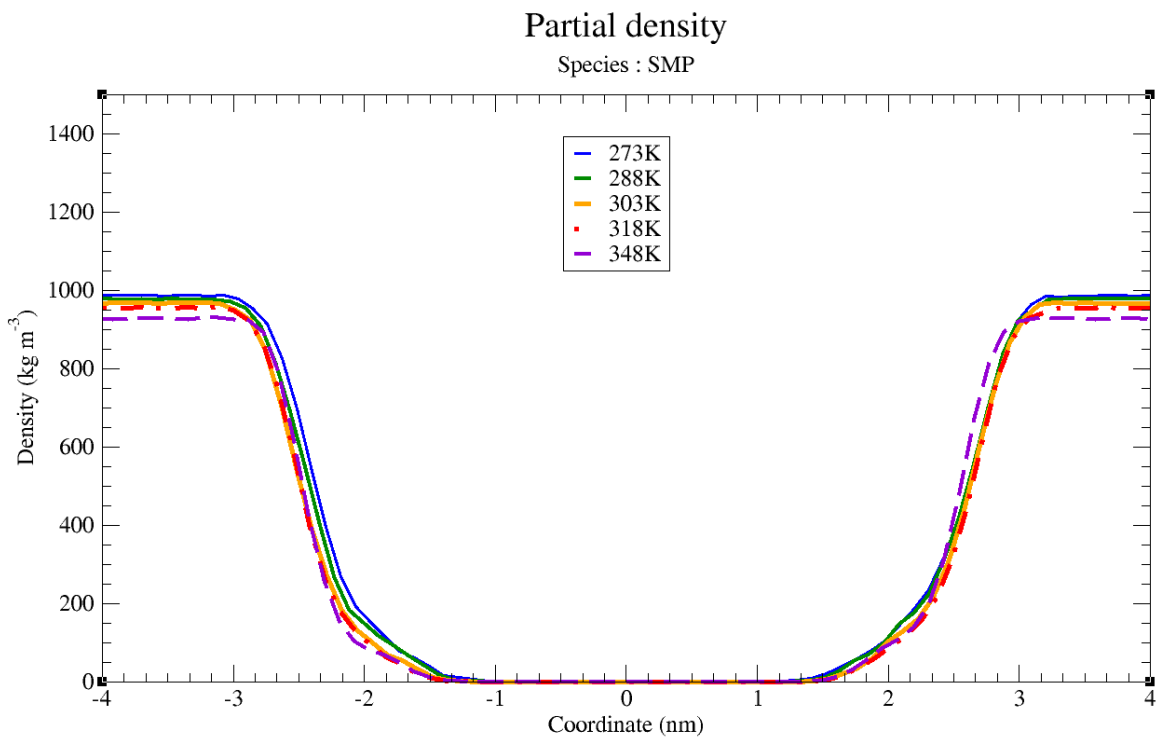


Figura 25. Variación de densidad del agua alrededor de la membrana. Conforme se avanza en las coordenadas de la caja, la densidad del agua disminuye, debido a que es el lugar que ocupa la membrana.

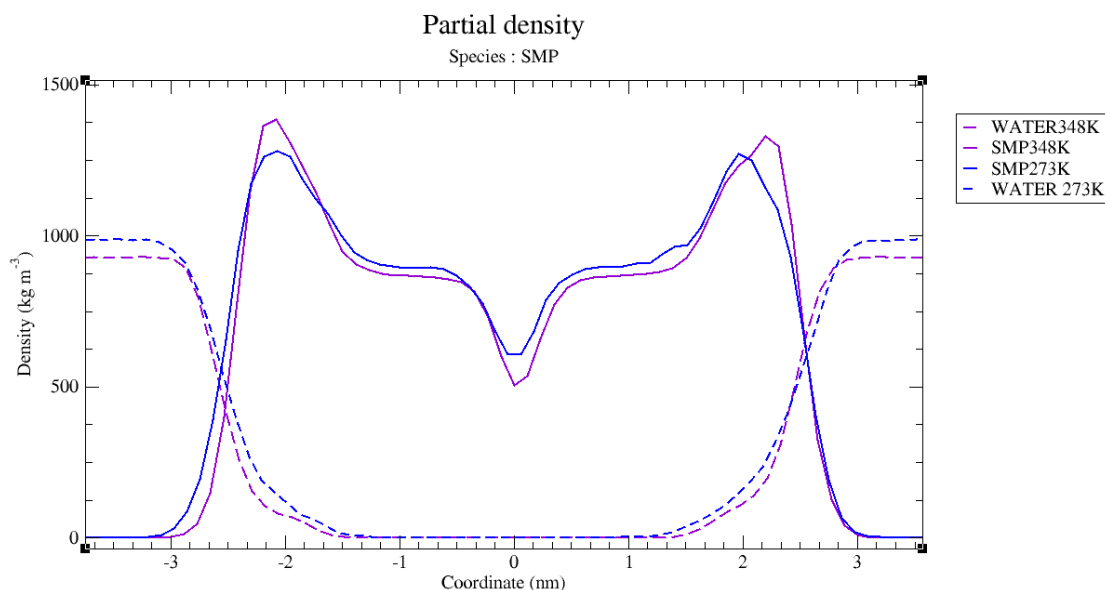


Figura 26. Perfiles de densidad de agua frente a los de membrana a mínima y máxima temperaturas. Como se observa en la figura 25, a 273K(0°C) la densidad del agua es la esperada fuera de la membrana, y va decreciendo conforme aumenta la densidad de la esfingomielina. De hecho, hay una región a 2 nm del centro de la membrana (situado en el 0) donde la SMP va alcanzando sus picos máximos pero la densidad del agua aun no es cero, donde podría considerarse que se encuentra la interfase agua-lípido.

A 348K(75°C) la densidad del agua fuera de interfase es menor, como cabe esperar, pero también es menor en las zonas de máxima densidad de membrana. Debido a las fluctuaciones estructurales, la interfase agua-lípido tiene que disminuir la tensión interfacial. A temperaturas altas, El movimiento de stretching, debido a la tensión entre las dos capas de lípidos intercaladas, es mayor que el bending, el movimiento que corresponde a la curvatura en la interfase agua-lípido. Este balance de tensiones con la temperatura parece jugar un papel importante a altas temperaturas y por ello las monocapas se intercalan menos.

4.2. Área por lípido de la membrana

Se evaluó el valor de área/lípido al tratarse de un parámetro que puede reportar información estructural y que acompaña a menudo a las simulaciones de DM a la hora de evaluar su validez.

T (K)	Área por lípido (nm ² /molécula)	Error
273	0,231	6,893E-04
288	0,232	9,429E-04
303	0,230	1,768E-03
318	0,233	1,581E-03
348	0,239	1,880E-03

Tabla 3. Datos de área/lípido con el aumento de temperatura. Hay una relación directa entre ambas variables.

Se puede observar una clara relación entre el aumento de la temperatura y el crecimiento del área por lípido de la membrana. Del mismo modo que ocurría con la densidad, hay una tendencia creciente del área conforme aumenta la temperatura, probablemente debido a cambios relacionados con la desorganización de la cadena, como la formación de isómeros debidos al doble enlace que ocupen una mayor zona del espacio, así como por la menor atracción por fuerzas de van der Waals, principales responsables de una menor área por lípido, y que disminuirían con la temperatura.

En este caso también se observa una región de disminución en la tendencia por lo general creciente, a una temperatura de 303K(30°C), misma temperatura a la que la densidad disminuía(ver Figura 29). Teniendo en cuenta el nivel de error, este hecho respaldaría la idea de la existencia de una fase de pretransición, en que la membrana se encuentra en un estado intermedio entre gel ordenado y líquido desordenado, donde la obtención de datos estructurales es más imprecisa y el nivel de error puede ser mayor.

4.3. Desplazamiento cuadrático medio (MSD) y Coeficiente de difusión de membrana

Al finalizar la simulación se generó el archivo de trayectorias `traj_comp.xtc` gracias al cual es posible obtener el desplazamiento cuadrático medio en el plano de la membrana, el plano XY, en el cual ocurren el movimiento browniano de las moléculas y a través del cual podrían observarse el comportamiento difusivo de los lípidos.

Mean Square Displacement

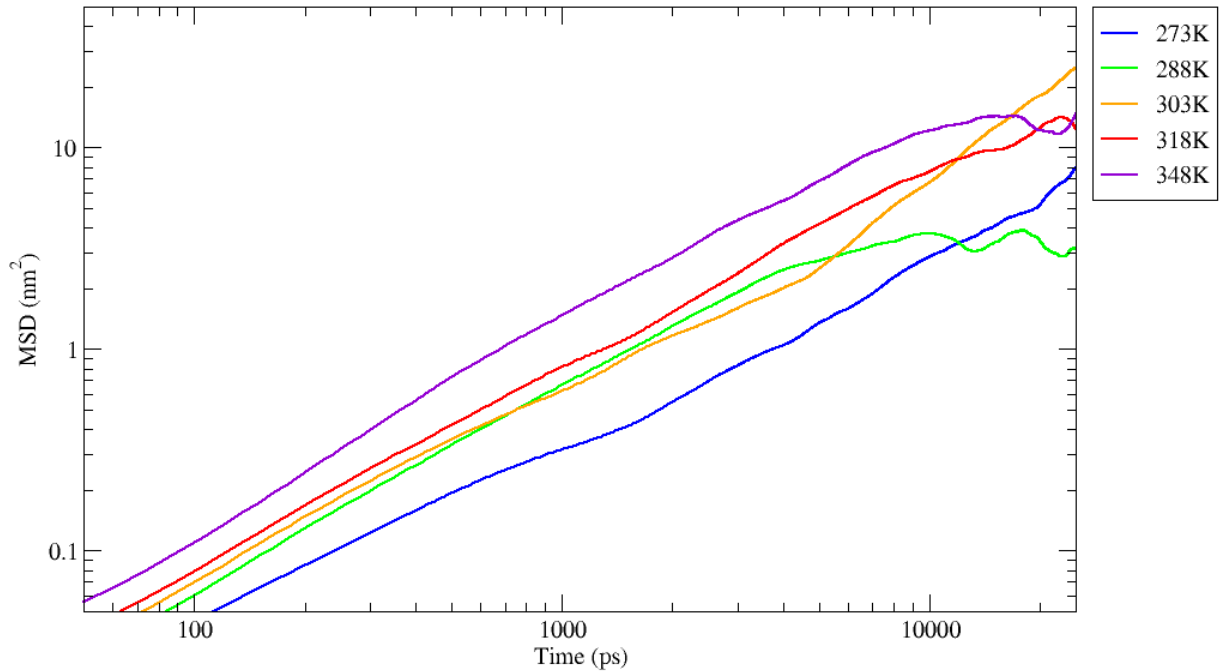


Figura 27. Evolución del MSD con el tiempo para cada temperatura. Al inicio de las simulaciones hay una cierta linealidad, que se acaba perdiendo, dando variaciones extrañas hacia el final de la simulación. Esto se debe a un error estadístico asociado al propio proceso de la simulación

Al principio se observa un tramo que no es difusivo si no balístico, en que la pendiente del logaritmo de msd es 2 y esto es debido a las colisiones del entorno del lípido. A tiempos mayores estas colisiones se vuelven aleatorias, y el sistema se vuelve difusivo, de forma que no hay preferencia en la dirección de los desplazamientos. Se conoce como random walk.

Al final de la simulación se pierde linealidad, debido a un error estadístico asociado a la propia simulación, que aparece a partir de la mitad de la misma.

Para obtener el valor del coeficiente de difusión, se definió una región del gráfico donde la linealidad era buena, y se ajustó a la curva para la simulación a 273K(Fig.24). Repitiendo el proceso para el resto de simulaciones se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 2).

Temperatura (K)	Coefficiente de difusión(nm^2/ps)	Error (nm^2/ps)
273	6,896E-05	6,80E-06
288	1,604E-04	5,25E-05
303	1,368E-04	2,32E-05
318	1,955E-04	2,32E-05
348	3,598E-04	3,73E-05

Tabla 4. Valores de coeficiente de difusión de membrana para cada una de las temperaturas de simulación llevadas a cabo.

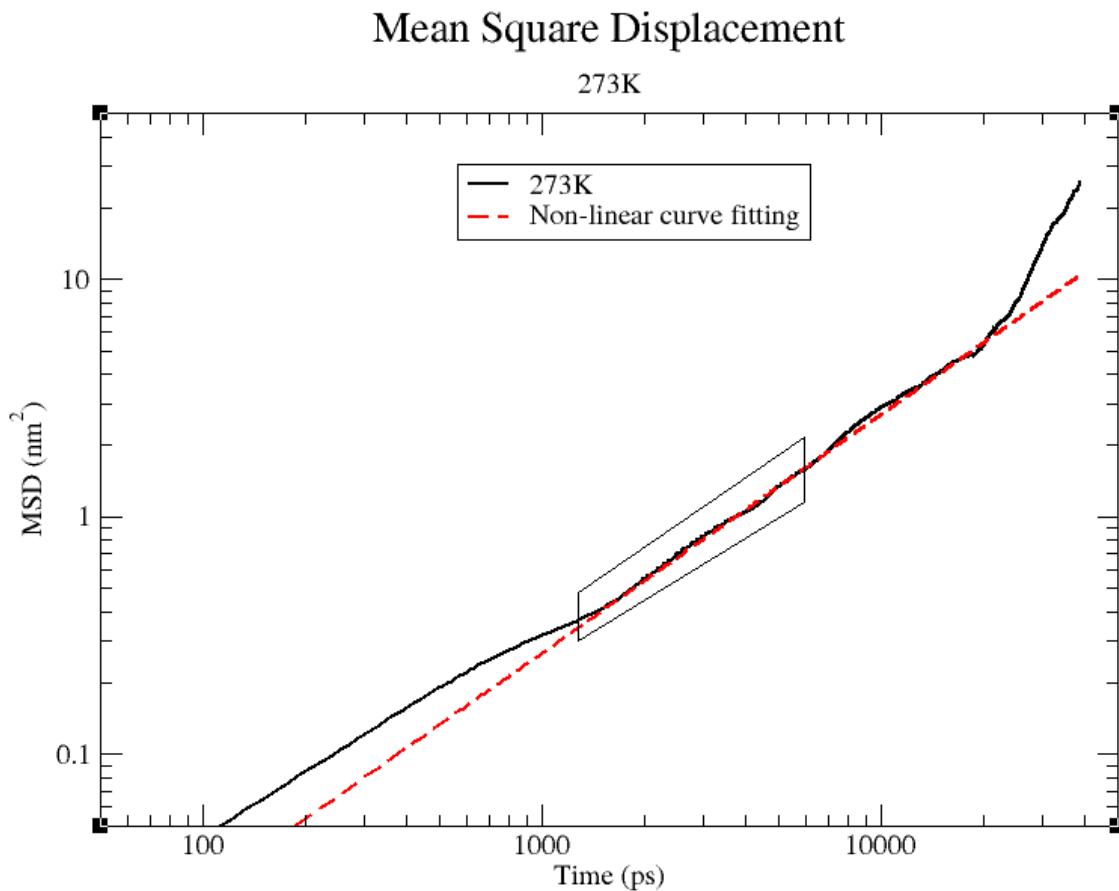


Figura 28. Ajuste a la curva de desplazamiento cuadrático medio en una región determinada. De esta forma será posible obtener el coeficiente de difusión.

La membrana confinada está sufriendo cambios de estructura. Si fuese un fluido perfecto, el coeficiente de difusión aumentaría linealmente con la temperatura, sin embargo, esto no ocurre, ya que hay un intervalo de temperatura en que pierde difusividad (Figura 29). Esto es un indicativo de que hay transiciones de fase, ya que la dinámica está cambiando y el error de cálculo es mayor, debido a que la complejidad estructural. Se podría decir que la membrana fluctúa entre dos estados de distinta difusividad.

Diffusion Coefficient - Area per lipid vs Temperature

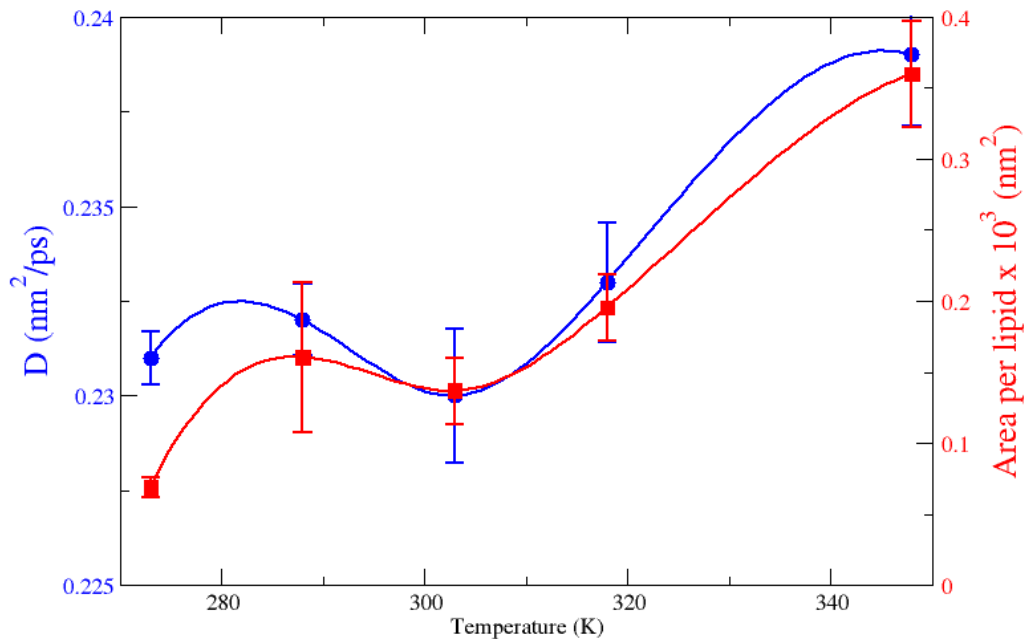


Figura 29. Comparativa de evolución del coeficiente de difusión y el área por lípido con la temperatura. Al no ser un fluido perfecto, no se observa una evolución lineal con la temperatura, sino que hay un intervalo donde se vuelve menos difusiva y el área se reduce respecto a una temperatura menor, para luego volver a aumentar.

Estos datos son coherentes respecto a los estudios mencionados al principio del trabajo, donde se habla de una fase de transición a aproximadamente 300K para PSM y 311K para ESM. En esta fase de transición se encontraría un estado intermedio entre la fase gel y la fase fluida, donde habría zonas de menor fluidez, y por tanto menor difusividad en la membrana, para luego realizar la transición total a fase fluida a temperaturas mayores en que el coeficiente de difusión es mayor

Esto tiene una gran importancia a nivel biomolecular, dado que la información generada confirma que el aumento de la temperatura afectaría directamente a la integridad y propiedades de membranas biológicas, formadas por este tipo de lípidos, como ocurre en la mielina de las células nerviosas.

5. Conclusiones

Se preparó un sistema formado por moléculas de esfingomielina en un medio de solvente agua para observar la difusión y cambios estructurales de las moléculas del lípido con diferentes valores de temperatura.

Los resultados indican que, en efecto, la membrana presenta cambios estructurales con un aumento de temperatura, al haber un comportamiento no monótono del coeficiente de difusión frente a incrementos de temperatura.

La difusión, densidad, área por molécula, y grosor de membrana aumentan con la temperatura, lo que es una prueba del cambio de fase gradual de gel ordenado a líquido, donde la difusión permanece constante cuando se está produciendo la transición de fase.

Estos resultados son afines a estudios previos con ESM y PSM que indicaban pretransiciones entre 300-310K.

La dinámica molecular es un método eficiente para observar y cuantificar cambios estructurales en biomembranas, que suponen sistemas complejos y cuyos fenómenos físico-químicos son difíciles de observar en laboratorio.

En futuros estudios se podrían realizar simulaciones en intervalos de temperatura intermedios con la finalidad de estudiar con más detalle las variaciones de las propiedades físico-químicas.

6. Referencias.

- 3.5 *Passive Transport - Concepts of Biology - OpenStax CNX*. (n.d.). Retrieved August 24, 2021, from <https://cnx.org/contents/s8Hh0oOc@18.1:-duvEJyZ@12/3-5-Passive-Transport>
- Alavi, S. (2015). Molecular Simulations. In *Methods of biochemical analysis* (Vol. 55, Issue). Wiley-VCH. <https://doi.org/10.1002/9781118859148.ch16>
- Alder, B. J., & Wainwright, T. E. (2004). Phase Transition for a Hard Sphere System. *The Journal of Chemical Physics*, 27(5), 1208. <https://doi.org/10.1063/1.1743957>
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Gunsteren, W. F. van, & Hermans, J. (1981). *Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration*. 331–342. https://doi.org/10.1007/978-94-015-7658-1_21
- Brown, D. A., & London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14(1), 111–136. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.111>
- Disalvo, E. A., & Simon, S. A. (n.d.). *Permeability and Stability*.
- Eeman, M., & Deleu, M. (2010). From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(4), 719–736.
- Frenkel, Daan, B. S. (2001). *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications*. Vol. 1. Elsevier (p. 638).
- Fuhrmans, M., Sanders, B. P., Siewert-Jan, A. E., Ae, M., & De Vries, A. H. (n.d.). *Effects of bundling on the properties of the SPC water model*. <https://doi.org/10.1007/s00214-009-0590-4>
- Goñi, F. M., & Alonso, A. (2006). Biophysics of sphingolipids I. Membrane properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(12), 1902–1921. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.09.011>
- Goñi, F. M., Alonso, A., & Contreras, F. X. (2020). Membrane Nanodomains. In eLS (pp. 1–8). American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0028879>
- Huang, W., Lin, Z., & Van Gunsteren, W. F. (2011). Validation of the GROMOS 54A7 force field with respect to β -peptide folding. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(5), 1237–1243. <https://doi.org/10.1021/CT100747Y>
- Leach, A. R. (2001). Molecular modelling _ principles and applications-Prentice Hall (2001).pdf. In *Molecular Modelling Principles and Applications* (pp. 1–744).
- Lin, Z., & Van Gunsteren, W. F. (2013). Refinement of the application of the GROMOS 54A7 force field to β -peptides. *Journal of Computational Chemistry*, 34(32), 2796–2805. <https://doi.org/10.1002/JCC.23459>
- Metropolis, N. (1987). The beginning of the Monte Carlo method. *Los Alamos Science (1987 Special Issue Dedicated to Stanis?Aw Ulam)*, 125–130.

- Morales-navarrete, H. A. (2016). *Utilización de la BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) como modelo para el desarrollo de un método para la caracterización del entorno energético de proteínas a 300 K. March.*
- Niemelä, P., Hyvönen, M. T., & Vattulainen, I. (2004). Structure and Dynamics of Sphingomyelin Bilayer: Insight Gained through Systematic Comparison to Phosphatidylcholine. *Biophysical Journal*, *87*(5), 2976–2989. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.048702>
- Poger, D., & Mark, A. E. (2012). *Lipid Bilayers: The Effect of Force Field on Ordering and Dynamics.* <https://doi.org/10.1021/ct300675z>
- Rapaport, D. C. (2004). The Art of Molecular Dynamics Simulation. *The Art of Molecular Dynamics Simulation.* <https://doi.org/10.1017/CBO9780511816581>
- Schmid, N., Eichenberger, A. P., Choutko, A., Riniker, S., Moritz, •, Mark, A. E., & Van Gunsteren, W. F. (n.d.). *Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7.* <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0700-9>
- Senior, A. W., Evans, R., Jumper, J., Kirkpatrick, J., Sifre, L., Green, T., Qin, C., Žídek, A., Nelson, A. W. R., Bridgland, A., Penedones, H., Petersen, S., Simonyan, K., Crossan, S., Kohli, P., Jones, D. T., Silver, D., Kavukcuoglu, K., & Hassabis, D. (2020). Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature*, *577*(7792), 706–710. <https://doi.org/10.1038/S41586-019-1923-7>
- Tieleman, D. P., & Berendsen, H. J. C. (1996). Molecular dynamics simulations of a fully hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with different macroscopic boundary conditions and parameters. *Journal of Chemical Physics*, *105*(11), 4871–4880. <https://doi.org/10.1063/1.472323>
- Wilson, M. A., & Pohorille, A. (1994). Molecular Dynamics of a Water-Lipid Bilayer Interface. *Journal of the American Chemical Society*, *116*(4), 1490–1501. <https://doi.org/10.1021/JA00083A038>

