



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Estudio de canales iónicos con simuladores de dinámica  
molecular**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**FÍSICO**

**P R E S E N T A:**

**Oscar Eduardo Gutiérrez Castañeda**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Marcelino Arciniega Castro  
Ciudad Universitaria, CD. MX., 2022.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno  
Gutiérrez  
Castañeda  
Oscar Eduardo  
62803188  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Física  
304205684
2. Datos del Asesor  
Dr.  
Arciniega  
Castro  
Marcelino
3. Datos del sinodal 1  
Dr.  
Espejel  
Morales  
Raúl Arturo
4. Datos del sinodal 2  
Dra.  
García  
Pelagio  
Karla Paola
5. Datos del sinodal 3  
Dr.  
Valderrama  
Zaldívar  
Alejandro
6. Datos del sinodal 4  
Dr.  
Islas  
Suárez  
León David
7. Datos del trabajo escrito  
Estudio de canales iónicos con simulaciones de dinámica molecular.  
137 p  
2022

**A mis padres.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por la formación académica, las experiencias y los amigos.

A los miembros del jurado:

Al Instituto de Fisiología Celular, al departamento de Bioquímica y Biología Celular y todos los miembros del laboratorio de bioquímica estructural computacional.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT IN213320 y LANDAC-UNAMDTIC-320.

Al Dr. Marcelino Arciniega Castro por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por su orientación y apoyo en la elaboración de este trabajo, de quien he aprendido mucho académicamente y como persona.

Agradezco inmensamente a Roberto Gutiérrez Romo, quien en su paso por esta vida además de ser mi padre, fue mi héroe y amigo, que junto a mi madre María Teresa Castañeda Martínez a quien agradezco profundamente que con cariño y comprensión me inculcaran principios y valores que me han hecho mejor.

A mis hermanas, Claudia, Erika y a mi hermano Roberto quien es mi tándem.

A Yanueh con quien he crecido y quien me ha acompañado en los mejores momentos y en los más complicados, siempre brindándome su total apoyo y compañía. Te amo.

A mis grandes amigos, Vic, Gaspi, Jon, Guz, Cris, Canelita, Cano, Alan, grandísimas personas con quienes he compartido grandes momentos.

A la familia y amigos que ya no están con nosotros.

## RESUMEN

A lo largo de los 6 capítulos que componen esta tesis se describe el proceso que existe en el estudio de proteínas de membrana mediante simulaciones de dinámica molecular, partiendo de los fundamentos de la conformación de la materia orgánica y los principios físicos que fundamentan las simulaciones de dinámica molecular (primeros 2 capítulos).

Posteriormente se muestra el procedimiento para realizar la simulación de dinámica molecular para el combinado con el péptido transmembrana KALP (secuencia: GKK(LA)<sub>4</sub>LKKA) en la bicapa fosfolipídica DPPC (1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), el cual trata un modelo sencillo que consta de una sección proteica transmembrana insertada en la estructura lipídica. Este estudio se diversifica en el análisis de campos de fuerza y membranas de mayor dimensión, con lo cual se abre paso al estudio de estructuras de mayor complejidad como son el canal bacteriano PorB *Neisseria meningitidis* y el canal TRPV4 (Receptor de Vaniloides de Potencial Transitorio 4, por siglas en inglés).

Inmersos en el estudio de proteínas de membrana, el nivel de dificultad asciende no solo en las dimensiones de las estructuras, sino en la complejidad de los modelos y su funcionamiento. La simulación de electrofisiología celular, es un proceso que consta en llevar un modelo Proteína/Membrana, a un modelo donde es posible crear y controlar un gradiente electroquímico y con ello flujo de iones a través de las estructuras en cuestión y con ello, comparar el comportamiento en la conductancia de las estructuras PorB mutada y en su conformación silvestre.

En el último capítulo de esta tesis se realiza un modelo que a diferencia de los anteriores, no es un modelo que se haya realizado con anterioridad, este modelo parte del posible vínculo entre el residuo 742 de la estructura TRPV4, la estructura lipídica PIP2 (Fosfatidilinositol-4-5-bifosfatol) y la activación del canal, con lo cual se realiza una serie de simulaciones con modelos presentan diversas diferencias, como mutaciones en el residuo 742 o la presencia y ausencia del lípido PIP2, con lo cual se busca la existencia de dicho vínculo.

## INDICE GENERAL

RESUMEN .....	5
INDICE GENERAL .....	6
Lista de figuras.....	9
Lista de tablas .....	13
INTRODUCCIÓN .....	15
Capítulo 1 ESTRUCTURAS DE PROTEÍNAS Y CANALES IÓNICOS .....	20
1.1 ESTRUCTURAS BIOLÓGICAS .....	20
1.1.1 Aminoácidos.....	21
1.1.2 Proteínas .....	23
1.1.3 Célula.....	24
1.1.4 Membrana plasmática.....	25
1.2 CANALES IÓNICOS .....	29
1.2.1 Gradiente Electroquímico.....	31
1.3 ECUACIÓN DE NERNST Y GOLDMAN-HODGKIN-KATS .....	31
Capítulo 2 TERMODINÁMICA Y MECÁNICA ESTADÍSTICA .....	33
2.1 ENSAMBLE MICROCANÓNICO .....	36
2.2 ENSAMBLE CANÓNICO.....	38
Capítulo 3.....	43
SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR.....	43
3.1 CAMPO DE FUERZA.....	46
3.1.1 Potencial intermolecular .....	46
3.1.2 Potencial intramolecular .....	48
3.2 MINIMIZACIÓN DE ENERGÍA.....	50
3.3 ALGORITMOS DE INTEGRACIÓN .....	52
3.3.1 Algoritmo de Verlet.....	53
3.3.2 Algoritmo de salto de rana (Leap-frog).....	54
3.3.3 Algoritmo velocidad-Verlet.....	55
3.4 ACOPLAMIENTO TEMPERATURA Y PRESIÓN .....	56
3.5 CONDICIONES PERIÓDICAS .....	56

Capítulo 4 DINÁMICA MOLECULAR DE PÉPTIDO EMBEBIDO EN UNA MEMBRANA LIPÍDICA .....	58
4.1 Simulación de sistema Proteína-Membrana.....	59
4.1.1 Preparación de la estructura para la simulación .....	59
4.1.2 Solvatación e ionización.....	61
4.1.3 Ajuste de temperatura y presión .....	62
4.2 Resultados .....	64
4.2.1 Comparación de campos fuerza GROMOS69 y AMBER99SB-ILDN.....	64
4.2.2 Diseño de membrana constituidas por 104, 195 y 295 lípidos. ....	73
4.2.2.1 Área por lípido y grosor de membrana.....	75
4.2.2.2 Parámetros de orden de deuterio de las cadenas de acilo .....	78
4.2.2.3 Densidades del sistema.....	80
4.3. Discusión.....	80
Capítulo 5 DINÁMICA MOLECULAR DEL PORO PorB y ANÁLISIS MEDIANTE ELECTROFISIOLOGÍA COMPUTACIONAL .....	83
5.1 Método Sistema Simple .....	85
5.1.2 Solvatación e ionización.....	85
5.1.3 Equilibrado del sistema .....	85
5.1.3 Producción y análisis .....	86
5.2 Resultados .....	88
5.2.1 Densidades del sistema.....	89
5.2.2 MDanalysis.....	90
5.2.3 Discusión .....	92
5.3 Método electrofisiología computacional.....	93
5.3.2 <i>Producción y análisis</i> .....	96
5.4 Resultados electrofisiología .....	97
5.4.1 Conductancia .....	98
5.4.2 Discusión .....	100
Capítulo 6 DINÁMICA MOLECULAR DEL CANAL IÓNICO TRPV4, INTERACCIÓN CON EL LÍPIDO PIP2 y EFECTOS POR MUTACIÓN .....	101
6.1 Establecimiento de los sistemas a simular .....	103
6.1.1 Canal TRPV4 silvestre libre de ligando .....	103



6.1.2 Canal TRPV4 silvestre en complejo con moléculas de PIP2 .....	104
6.1.2 Canal TRPV4 mutado en complejo con moléculas de PIP2 .....	105
6.2 Parámetros de simulación.....	106
6.3 Resultados .....	107
6.3.1 Selección y sustitución de moléculas DPPC .....	107
6.3.2 Mutaciones puntuales en canal TRPV4.....	110
6.4 Resultados de la interacción con PIP2 y mutaciones .....	110
6.4.1 Distancia entre el residuo 742 y los fosfatos de PIP2.....	111
6.4.2 Variación del tamaño del poro.....	114
6.4.3 <i>Correlación de variables</i> .....	116
6.4.4 <i>Discusión</i> .....	123
Conclusiones .....	124
Lista de referencias .....	126
Apéndice A .....	129
A1 Ecuación de Nernst y de Goldman-Hodgkin-Katz.....	129
A1.1 Ecuación de Nernst-Planck.....	130
A1.2 Potencial de Nernst.....	130
A1.3 Ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz.....	131
A2 Acoplamiento de Temperatura y presión .....	133
A2.1 Acoplamiento de temperatura Berendsen.....	133
A2.2 Acoplamiento de temperatura reescalamiento de velocidad (V-rescaling) .....	134
A2.3 Acoplamiento de presión Berendsen .....	136
A2.4 Acoplamiento de presión Parrinello-Rahman.....	136

## Lista de figuras

Figura 1.1: Estructura básica de un aminoácido. ....	21
Figura 1.2 Estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. ....	23
Figura 1.3: Esquema general de una célula eucariota, constituida por tres elementos. ....	25
Figura 1.4: Composición de la membrana plasmática ..... 25	25
Figura 1.5: Movimientos en los lípidos de membrana..... 26	26
Figura 1.6: Estructura de un fosfolípido dividida por regiones o grupos y composición. .... 27	27
Figura 1.7: Estructura de un fosfolípido DPPE (1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) Formula molecular: C <sub>37</sub> H <sub>74</sub> N <sub>0</sub> 8P..... 27	27
Figura 1.8: Estructura de un fosfolípido DPPS (1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoserine) Formula molecular: C <sub>38</sub> H <sub>74</sub> N <sub>0</sub> 10P..... 28	28
Figura 1.9: Estructura de un fosfolípido DPPC (1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) Formula molecular: C <sub>40</sub> H <sub>80</sub> N <sub>0</sub> 8P..... 28	28
Figura 1.10: Esquema general de proteínas integrantes y periféricas..... 29	29
Figura 1.11: Estructura general de un canal iónico..... 31	31
Figura 2.1: Réplicas de un sistema macroscópico representando un ensamble..... 34	34
Figura 2.2: Sistema A en contacto con un baño térmico A' a temperatura T..... 39	39
Figura 3.1: Diagrama de pasos y acciones en una simulación de dinámica molecular. .... 45	45
Figura 3.2: Potencial de Lennard-Jones entre un par de átomos en función de su distancia..... 47	47
Figura 3.3: Interacción atómica y gráfica asociadas al potencial eléctrico..... 47	47
Figura 3.4: Interacción atómica y gráfica asociadas al potencial de enlaces..... 48	48
Figura 3.5: Interacción atómica y gráfica asociada al potencial de ángulos de enlace..... 49	49
Figura 3.6: Interacción atómica y gráfica asociadas al potencial de torsión. .... 49	49
Figura 3.7: Esquema de superficie de energía relacionado a una conformación..... 50	50
Figura 3.8: Representación de simetría en el algoritmo de Verlet..... 54	54
Figura 3.9: Muestra de cómo el método de salto de rana calcula la velocidad y posición de forma alternada..... 55	55
Figura 3.10: Esquema bidimensional que muestra las condiciones periódicas, con el volumen primario al centro..... 57	57
Figura 4.1: Superposición de estructuras DPPC y KALP. En color azul la estructura DPPC y en color verde KALP..... 60	60

	10
Figura 4.2: Disminución del área por lípido dada la reducción por pasos.....	61
Figura 4.3: Reducción del sistema, pasando de un tamaño de 10.42Å <sup>2</sup> a 0.64Å <sup>2</sup> .....	61
Figura 4.4: Vista lateral del sistema solvatado, previo al ajuste de temperatura y presión. ....	62
Figura 4.5: Estructuras DPPC empleadas bajo el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN y GROMOS96 .....	65
Figura 4.6: Variación del área por lípido empleando los campos de fuerza GROMOS96 y AMBER99SB-ILDN.....	66
Figura 4.8: Evolución temporal del comportamiento KALP-DPPC bajo el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN, en la parte superior mediante un mapa de calor y en la parte inferior vista lateral que muestra péptido(verde), fosforo en DPPC (naranja) y agua (azul) AMBER99SB-ILDN.....	68
Figura 4.9: Medición del ángulo en el enlace C-H y la normal a la membrana. ....	69
Figura 4.10: Parámetros de orden de deuterio bajo los campos de fuerza GROMOS96 y AMBER99SB-ILDN.....	69
Figura 4.11: Densidad del sistema “KALP en DPPC” en donde se muestra el comportamiento de densidad de los grupos seleccionados a través del eje Z. ....	71
Figura 4.12: Comparación entre las densidades de grupos de cabeza, glicerol ester, adenas de acilo y agua, bajo el campo de fuerza GROMOS69 y AMBER99SB-ILDN.....	72
Figura 4.13: Vista superior de la unión de membranas. ....	73
Figura 4.14: Vista superior de membranas con 104, 195 y 295 lípidos.....	74
Figura 4.15: Variación del área por lípido en membranas con 104, 195 y 295 lípidos. ....	75
Figura 4.16: Variación de grosor en membranas con 104, 195 y 295 lípidos. A) Variación del grosor para 104 .....	76
Figura 4.17: Evolución temporal del comportamiento KALP-DPPC en una membrana de 104 lípidos.....	77
Figura 4.18: Evolución temporal del comportamiento KALP-DPPC en una membrana de 195 lípidos.....	77
Figura 4.19: Evolución temporal del comportamiento KALP-DPPC en una membrana de 295 lípidos.....	78
Figura 4.20: Orden de parámetro de deuterio en las cadenas Sn-1 y Sn-2 de sistemas con 104, 195, 295 y 128 lípidos.....	79
Figura 4.21: Comparación entre las densidades de grupos de cabeza, glicerol ester, adenas de acilo y agua de sistemas con 104, 195, 295 y 128 lípidos. ....	80
Figura 5.1: Vista superior y lateral de la estructura PorB.....	83
Figura 5.2: Esquemas del potencial asociado a un sistema de doble membrana.....	84

Figura 5.4: Sistema PorB finalizado. ....	87
Figura 5.5: Visualización del poro en PorB. ....	88
Figura 5.6: Densidad del agua, cloro y sodio en el sistema con PorB silvestre y mutado. ....	89
Figura 5.7: Radio del poro respecto a la coordenada Z. ....	90
Figura 5.8: Radio mínimo del poro del sistema con PorB silvestre y mutado, calculado para trayectorias individuales. ....	91
Figura 5.9: Esquemas de orientación del sistema de doble membrana. ....	93
Figura 5.10: Parámetros correspondientes al estudio de electrofisiología computacional. ....	94
Figura 5.11: Esquema del mecanismo de intercambio ion-agua. ....	95
Figura 5.12: Sistema de doble membrana. ....	96
Figura 5.13: Flujo de iones a través de los canales PorB silvestre (línea sin puntos) y mutado (línea con puntos). ....	97
Figura 5.14: Cantidad de aniones y cationes que cruzan el canal PorB entre nano segundo (ns). ....	98
Figura 5.15: Corriente iónica en función de $\Delta U$ para intervalos de 30ns. ....	99
Figura 5.16: Corriente iónica en función de $\Delta U$ para intervalos de 30ns. ....	99
Figura 6.1: Vista superior y lateral de la estructura PorB. ....	102
Figura 6.2: Superposición correcta e incorrecta del sistema TRPV4-DPPC. ....	103
Figura 6.3: Progreso de compactación y eliminación de lípidos debido al método de “expansión y reducción”. ....	104
Figura 6.4: Sistema TRPV4-DPPC, solvatado y ionizado, previo a ser equilibrado. ....	104
Figura 6.5: Ubicación de la cavidad entre los dominios TRP, S1 y S2. ....	105
Figura 6.6: Distancia en angstroms entre los residuos 742 y los fosfatos en DPPC. ....	105
Figura 6.7: Mutaciones realizadas sobre el residuo 742. ....	106
Figura 6.8: Variación de la distancia entre los residuos E741, R742 y S743 de cada monómero (fila superior a la inferior) respecto a los lípidos DPPC cercanos (se muestran en cada gráfica), mostrado para cada monómero (columna izquierda a derecha). ....	109
Figura 6.9: Lípido DPPC embebido en la cavidad que se encuentra entre los dominios S1, S2 y TRP. ....	109
Figura 6.10: A) Estructuras DPPC y PIP2. B) Visualización lateral del sistema, dando énfasis a los dominios S1, S2 y TRP, además del lípido PIP2. ....	110
Figura 6.11: Variación de la distancia entre el residuo R742 de cada monómero (fila superior a la inferior) respecto a los fosfatos en la cabeza de PIP2 (se muestran en cada gráfica), mostrado para cada monómero (columna izquierda a derecha). ....	112

Figura 6.12: Histogramas (50 bins) de la variación temporal de la distancia en nanómetros(nm) entre los fosfatos en la cabeza de PIP2 y el residuo 742. ....	113
Figura 6.14: Radio de la compuerta inferior y filtro de selectividad. ....	115
Figura 6.15: Valor del radio mínimo en la zona de la compuerta inferior (eje y) vs RMSD en S2 de cada monómero (columna 1 a 4) y como tetrámero (columna 5), realizado para cada sistema mutado (fila).....	120
Figura 6.16: Valor del radio mínimo en la zona del filtro de selectividad (eje y) vs RMSD en S2 de cada monómero (columna 1 a 4) y como tetrámero (columna 5), realizado para cada sistema mutado (fila).....	120
Figura 6.17: Valor de RMSD de los lípidos PIP2 (eje y) vs RMSD en S2 de cada monómero (columna 1 a 4) y como tetrámero (columna 5), realizado para cada sistema mutado (fila).....	122
Figura 6.18: Valor de RMSD de los dominios S2 (eje y) vs RMSD del lipido PIP2 correspondiente a cada monómero (columna 1 a 4) y como tetrámero (columna 5), realizado para cada sistema mutado (fila). ....	122

## Lista de tablas

Tabla 1.1: Estructura de aminoácidos (código de tres y una letra).....	21
Tabla 3.1: Ensamblajes empleados en la simulación de dinámica molecular. ....	56
Tabla 4.1: Parámetros para equilibrar temperatura NVT.....	63
Tabla 4.2: Parámetros para equilibrar presión NPT.....	63
Tabla 4.3: Área por lípido, temperatura de transición de fase y referencia. ....	63
Tabla 4.4: Parámetros para la simulación de producción. ....	64
Tabla 4.5: Características moleculares y átomos totales de cada sistema de simulación. ....	64
Tabla 4.6: Características esenciales del equipo de cómputo empleado y tiempo de simulación, para cada sistema. ....	65
Tabla 4.7: Área por lípido y grosor de membrana promedio bajo el campo de fuerza GROMOS69 y AMBER99SB-ILDN. ....	67
Tabla 4.8: Orden de parámetro de deuterio en la cadena Sn-1 y Sn-2 para simulaciones bajo los campos de fuerza GROMOS96 y AMBER99SB-ILDN. ....	70
Tabla 4.9: Máximos de densidad calculados con los campos de fuerza GROMOS96 y AMBER99SB-ILDN, para cadenas de acilo, grupos de cabeza, glicerol ester y el porcentaje de diferencia.....	72
Tabla 4.10: Características moleculares y átomos totales de cada sistema de simulación. ....	74
Tabla 4.11: Características esenciales del equipo de cómputo empleado y tiempo de simulación, para cada sistema. ....	74
Tabla 4.12: Área por lípido y grosor promedio. ....	75
Tabla 4.13: Orden de parámetro de deuterio en la cadena Sn-1, de los sistemas con 104, 195, 295 y 128 (original) lípidos.....	79
Tabla 4.14: Orden de parámetro de deuterio en la cadena Sn-2, de los sistemas con 104, 195, 295 y 128 (original) lípidos.....	79
Tabla 5.1: Parámetros para la simulación NVT.....	86
Tabla 5.2: Parámetros para la simulación NPT. ....	86
Tabla 5.3: Parámetros para la simulación de producción. ....	86
Tabla 5.4: Características moleculares y átomos totales en cada sistema. ....	88
Tabla 5.5: Características computacionales de cada simulación. ....	89
Tabla 5.6: Radio promedio de cada monómero de PorB silvestre y mutado.....	92
Tabla 5.7: Características moleculares y átomos totales en cada sistema. ....	96

Tabla 5.8: Características moleculares y átomos totales en cada sistema. ....	97
Tabla 5.9: Características computacionales de cada simulación. ....	97
Tabla 5.10: Conductancia de aniones y cationes para la polarización negativa y positiva con la estructura PorB mutada y silvestre. ....	99
Tabla 5.11: Conductancia de aniones y cationes para la polarización negativa y positiva con la estructura PorB mutada y silvestre ....	99
Tabla 6.1: Características de ionización y presencia de lípidos para cada sistema. ....	102
Tabla 6.2: Características moleculares y átomos totales de cada sistema de simulación. ....	103
Tabla 6.3: Parámetros para la simulación NVT.....	107
Tabla 6.4: Parámetros para la simulación NPT. ....	107
Tabla 6.5: Parámetros para la simulación de producción. ....	107
Tabla 6.6: Características moleculares y átomos totales de cada sistema de simulación. ....	111
Tabla 6.7: Características moleculares y átomos totales de cada sistema de simulación. ....	111
Tabla 6.8: Variables Primarias y características. ....	116
Tabla 6.9: Tablas de correlación para “variables primarias”. ....	117
Tabla 6.10: Variables secundarias y características.....	119

## INTRODUCCIÓN

La organización tridimensional de los átomos que conforman a las proteínas es esencial para desarrollar su función [1]. Cada proteína tiene acceso a un conjunto finito de conformaciones, o espacio de estados, sobre el cual es posible establecer la relación entre estructura y la función biológica. Por tanto, la actividad biológica de las proteínas se encuentra asociada a las propiedades de transición conformacional de cada sistema. Dichas transiciones conformacionales son específicas de cada proteína y varían en magnitud, tiempo de transición y complejidad. De esta situación deviene la alta complejidad intrínseca en el estudio de las propiedades dinámicas de estos sistemas biológicos, tanto de perspectivas experimentales como teóricas.

En un enfoque teórico, las simulaciones de dinámica molecular se han posicionado como una de las herramientas más comúnmente empleadas para la evaluación de las propiedades de transición de las macromoléculas biológicas [2]. El muestreo de estados accesibles al sistema se realiza a través de resolver las ecuaciones de movimiento de Newton. Para ello se emplean potenciales clásicos de interacción interatómica e integradores simplécticos de las ecuaciones diferenciales. En principio, y bajo la observación de la conservación de variables termodinámicas apropiadas, la simulación de dinámica molecular sobre un periodo infinito llevaría, invocando a la hipótesis ergódica, a muestrear en su totalidad el espacio fase. A pesar de que no es posible determinar por completo el espacio fase empleando simulaciones moleculares, estas representan en muchos casos la mejor herramienta para el estudio de procesos con limitada evidencia experimental.

En el estudio de canales iónicos, sus medios de activación e inactivación, selectividad de iones, variación de transporte por mutación y duración del mismo, la biofísica ha encontrado



respuestas en ecuaciones como la de Nernst y la ecuación de Goldman-Hodgkin-Kats, que se ven limitadas por la sensibilidad de los instrumentos de medición.

A lo largo de los 6 capítulos que componen esta tesis, observamos en la primera mitad los fundamentos de las simulaciones de dinámica molecular, para mostrar en la segunda mitad un proceso de evolución en la complejidad de las simulaciones de dinámica molecular. Esta evolución se encuentra ligada al creciente interés por elucidar los mecanismos moleculares que rigen el funcionamiento de los canales iónicos.

Si bien las simulaciones de dinámica molecular son procesos de aproximación, estos procesos han mostrado un gran acercamiento a la descripción de comportamientos biomoleculares que no pueden ser estudiados mediante otros procesos. Tal es el caso del análisis de los canales iónicos, que aun cuando los estudios mediante electrofisiología otorgan gran información del flujo de iones, estos estudios no describen, a nivel molecular, el acontecer en los mecanismos que intervienen en dicho flujo.

# Organización de la tesis

Con la finalidad de guiar la lectura de esta tesis se dará un breve resumen del contenido en cada capítulo.

## 1 Estructura de proteínas y canales iónicos

Dado que las simulaciones de dinámica molecular que se desarrollan en este trabajo son ejecutadas a partir de modelos estructurales de proteínas, en este primer capítulo se describen brevemente los conceptos fundamentales de la biología estructural. El objetivo es establecer las bases necesarias para, de manera general, fundamentar las relaciones función-estructura y así conceptualizar la relevancia de los canales iónicos en el contexto celular. En la parte final del capítulo se discuten brevemente las limitaciones de los modelos de Nernst y Goldman-Hodgkin-Kats, que justifican el estudio de los canales iónicos a partir de simulaciones de dinámica molecular.

## 2 Mecánica estadística

El sustento teórico de mayor peso en la dinámica molecular lo brinda la mecánica estadística. De particular importancia resultan el concepto de ensamble termodinámico y la formulación de la hipótesis ergódica. El objetivo de este capítulo es brindar un fundamento teórico que permita ligar a la simulación de dinámica molecular con la medición experimental realizada *in-vitro* sobre un sistema biológico.

## 3 Simulación de dinámica molecular

La simulación de dinámica molecular es una técnica computacional en la que se representa la evolución temporal que presenta un sistema molecular bajo la influencia de una serie de potenciales de interacción atómicos. Dicha evolución temporal del sistema se lleva a cabo mediante la integración de ecuaciones de movimiento clásicas, definidas sobre las partículas que componen el sistema, y la inclusión de restricciones termodinámicas que mantienen constantes la temperatura y/o presión a lo largo de la simulación. El objetivo del capítulo es describir los aspectos más relevantes de la simulación de dinámica molecular.

## 4 Dinámica molecular de una estructura transmembrana (KALP en DPPC) y diseño de membrana

Mediante el protocolo establecido por el Ph.D. Justin A. Lemkul de Virginia Tech Department of Biochemistry [20], se describe la simulación de dinámica molecular del péptido KALP de membrana (*secuencia: GKK(LA)<sub>n</sub>LKKA*) en una bicapa fosfolipídica (DPPC) empleando el campo de fuerza GROMOS69 [23]. Posteriormente se repite el protocolo utilizando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN [24]. El objetivo es validar la implementación del protocolo y discutir sobre la influencia del campo de fuerza en los resultados. Adicionalmente, se presenta el protocolo empleado para el diseño membranas lipídicas de mayor tamaño.

## 5 Dinámica molecular del poro PorB en DPPC y técnica de electrofisiología computacional

En este capítulo se introduce el método de electrofisiología computacional planteado en Computational Electrophysiology: The Molecular Dynamics of Ion Channel Permeation and Selectivity in Atomistic Detail [21]. Esta metodología busca simular directamente el flujo de iones a través de canales de membrana haciendo uso de gradientes electroquímicos. Esta técnica ha logrado reproducir procesos moleculares a escalas de tiempo fisiológicos y experimentalmente relevantes [21]. Para validar su correcta implementación, el método es empleado en el canal bacteriano PorB de la bacteria *Neisseria meningitidis* patógena, insertado en la membrana DPPC, lo que lleva a predecir la conductancia y selectividad de iones.

## 6 Dinámica molecular del canal iónico TRPV4, interacción con el lípido PIP2 y efectos de mutación.

El canal TRPV4 (Receptor de Vaniloides de Potencial Transitorio 4, por siglas en inglés) es un canal de cationes no selectivo que responde a estímulos mecánicos, térmicos y osmóticos. De acuerdo con datos presentados por O. F. Harraz et al.[31], PIP2 (Fosfatidilinositol-4-5-bifosfatol) actúa como un inhibidor de la actividad del canal TRPV4. Sin embargo, el mecanismo molecular de dicha inhibición es aún desconocido. En este capítulo se estudia un posible sitio de unión de la molécula PIP2 al receptor TRPV4.

# Capítulo 1

## ESTRUCTURAS DE PROTEÍNAS Y CANALES IÓNICOS

En este capítulo introductorio se da un breve repaso sobre la organización estructural y relevancia de las proteínas en el contexto celular. Posteriormente se aborda, de manera general, la estructura y función de los canales iónicos. Finalmente, se brinda una descripción de las ecuaciones de Nernst y Goldman-Hodgkin-Kats, con la finalidad de dar un acercamiento a como la biofísica ha abordado el estudio de canales iónicos y plantear la necesidad del uso de las simulaciones de dinámica molecular.

### 1.1 ESTRUCTURAS BIOLÓGICAS

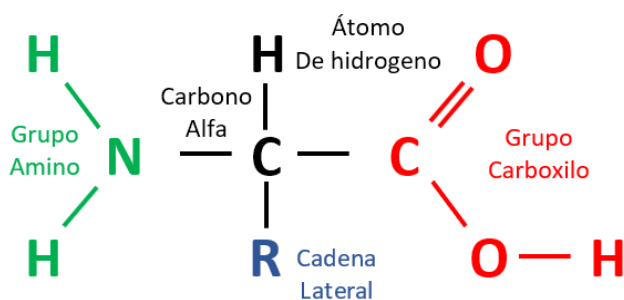
La conformación de la materia tiene dos vertientes a partir de su estructura molecular, dichas vertientes son la materia orgánica e inorgánica.

La materia orgánica está compuesta en su mayor parte de moléculas con una estructura basada en carbono. Estas moléculas además de ser grandes y complejas; como los aminoácidos, las proteínas o los carbohidratos, pueden ser fabricadas por un ser vivo. Por otro lado, se encuentra la materia inorgánica, que con algunas excepciones, no está conformada por carbono, además que las estructuras moleculares suelen ser simples y pequeñas como los minerales o sales. Sin embargo, la mezcla de la materia orgánica e inorgánica es fundamental para la vida.

### 1.1.1 Aminoácidos

El nombre aminoácido corresponde a una estructura, compuesta por un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) y otro grupo ácido o carboxilo (-COOH), estos elementos están unidos a través de un carbono (-C), denominado carbono alfa (C $\alpha$ ). Las valencias restantes del carbono quedan ocupadas por un grupo variable denominado grupo de cadena lateral o radical (-R) y con un átomo de hidrógeno (-H) (Figura 1.1) [3].

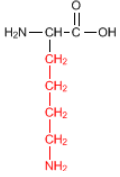
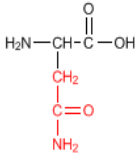
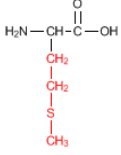
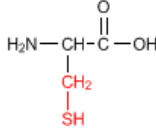
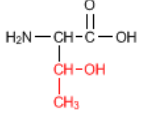
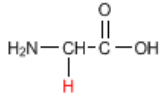
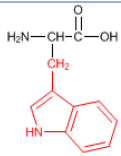
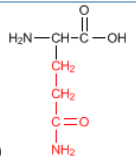
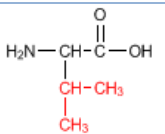
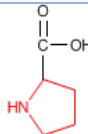
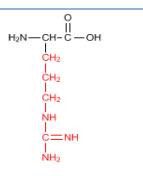
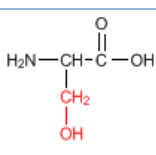
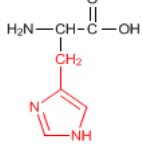
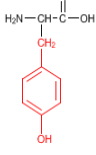
Existen 20 distintos aminoácidos, los cuales son caracterizados por su radical R y clasificados de la siguiente manera (Tabla 1.1):



**Figura 1.1:** Estructura básica de un aminoácido.

**Tabla 1.1:** Estructura de aminoácidos (código de tres y una letra).

Aminoácidos esenciales	Aminoácidos no esenciales
Fenilalanina (Phe - F) $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	Acido aspártico (Asp - D) $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}(=\text{O}) \\   \\ \text{OH} \end{array}$
Isoleucina (Ile - I) $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\   \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Acido glutámico (Glu - E) $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}(=\text{O}) \\   \\ \text{OH} \end{array}$
Leucina (Leu - L) $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Alanina (Ala - A) $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$

<p>Lisina (Lys - K)</p> 	<p>Asparagina (Asn - N)</p> 
<p>Metionina (Met - M)</p> 	<p>Cisteína (Cys - C)</p> 
<p>Treonina (Thr - T)</p> 	<p>Glicina (Gly - G)</p> 
<p>Triptofano (Trp - W)</p> 	<p>Glutamina (Gln - Q)</p> 
<p>Valina (Val - V)</p> 	<p>Prolina (Pro - P)</p> 
<p>Arginina (Arg - R)</p> 	<p>Serina (Ser - S)</p> 
<p>Histidina (His - H)</p> 	<p>Tirosina (Tyr - Y)</p> 

Clasificación según las propiedades de la cadena lateral:

Aminoácidos con cadenas laterales no polares: Glicina (Gly), Valina (Val), Alanina (Ala),

Leucina (Leu), Isoleucina (Ile), Triptofano (Trp), Fenilalanina (Phe), Metionina (Met) y Prolina

(Pro).

Aminoácidos con cadenas laterales polares, pero no cargadas: Asparagina o asparragina (Asn), Glutamina (Gln), Cisteína (Cys), Serina (Ser), Treonina (Thr), Tirosina (Tyr).

Aminoácidos con cadenas laterales ácidas: Acido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu).

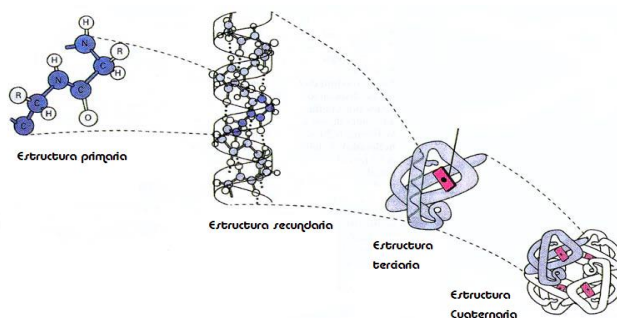
Aminoácidos con cadenas laterales básicas: Lisina (Lys), Arginina (Arg), Histidina (His).

Clasificación según su obtención:

Aminoácidos esenciales: son aquellos que no son producidos por el organismo, siendo necesaria su ingesta (Valina, Leucina, Treonina, Lisina, Triptófano, Histidina, Fenilalanina, Isoleucina, Arginina y Metionina). Por otra parte, los aminoácidos que pueden ser sintetizados por el organismo se conocen como no esenciales: Alanina, Prolina, Glicina, Serina, Cisteína, Asparagina, Glutamina, Tirosina, Ácido aspártico y Ácido glutámico.

### 1.1.2 Proteínas

Las proteínas son moléculas conformadas por cadenas de aminoácidos, las cuales se pliegan, formando así estructuras específicas, capaces de desempeñar una gran cantidad de funciones, entre ellas funciones enzimáticas, estructurales y transportadoras [3]. La complejidad estructural de las proteínas se constituye de cuatro niveles (estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria), con cada nivel dependiente del anterior (Figura 1.2):



**Figura 1.2** Estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

Recuperado de: <http://quimicasbiologas-churniaz.blogspot.com/2010/06/estructura-primaria-secundaria.html> (Junio-2020)



*Estructura primaria:* Está determinada por la secuencia de aminoácidos en la cadena proteica, caracterizada por el número de aminoácidos presentes y el orden en que están enlazados.

*Estructura secundaria:* Es el plegamiento que la cadena polipeptídica presenta por la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico.

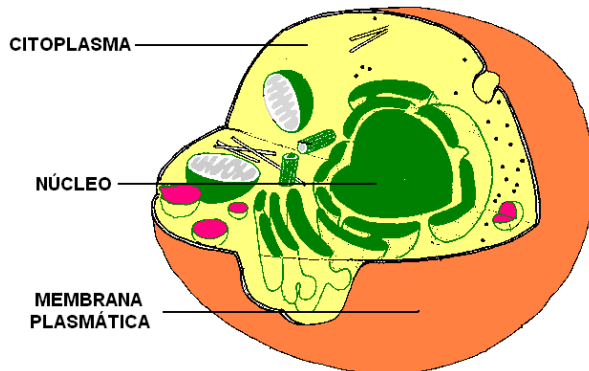
*Estructura terciaria:* Es la disposición tridimensional de todos los átomos integrantes de la proteína a partir del plegamiento de una cadena polipeptídica, de manera que los aminoácidos polares se sitúan en el exterior y los apolares en el interior.

*Estructura cuaternaria:* Está presente en aquellas proteínas con más de una cadena peptídica.

### **1.1.3 Célula**

Una célula es la unidad morfológica y funcional más pequeña que constituye a los seres vivos. Esto quiere decir que es la pieza más pequeña en que se puede dividir un ser vivo sin que dicha pieza pierda su individualidad como ser vivo. Las células son divididas en dos tipos, procariotas que son células sin núcleo y eucariotas, que cuentan con núcleo y son de mayor complejidad, siendo capaces de formar organismos como los animales o plantas [4].

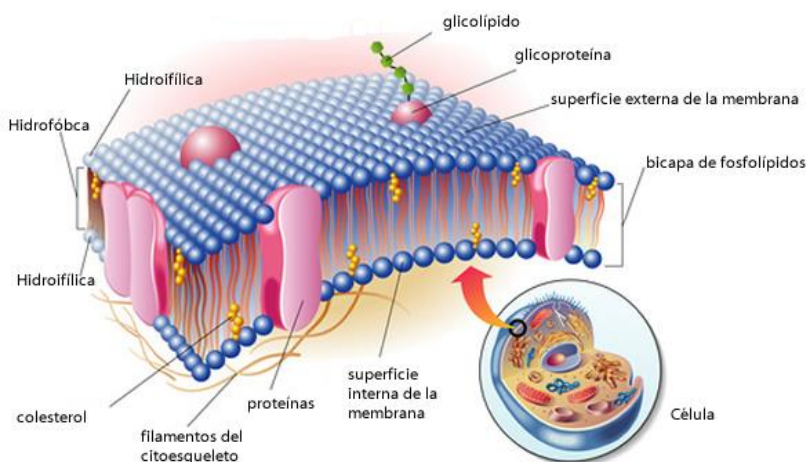
De manera general una célula eucariota siempre está constituida de una membrana plasmática que separa el medio interno del externo, el citoplasma que es el medio en el que se encuentra el interior de la célula y el núcleo que contiene el material genético heredado por la célula predecesora (Figura 1.3)



**Figura 1.3:** Esquema general de una célula eucariota, constituida por tres elementos.  
Recuperado de: <http://hnnbiol.blogspot.com/2008/01/celulas-eucariotas.html> (Noviembre-2021)

#### 1.1.4 Membrana plasmática

De forma general, la membrana plasmática es una barrera física, encargada de aislar el citoplasma del líquido extracelular, el cual tiene una composición distinta y también permite la entrada de iones, nutrientes o moléculas específicas que requiere la célula. Es una estructura semifluida, compuesta por distintas moléculas, conformada principalmente por fosfolípidos (50%), proteínas (40%) y azúcares (10%), su grosor no es mayor a 5nm [4].



**Figura 1.4:** Composición de la membrana plasmática  
Recuperado de: <https://www.portaleducativo.net/primer-medio/40/membrana-plasmatica>.(Junio-2020)

### 1.1.4.1 Lípidos

La membrana plasmática de las células eucarióticas está formada por tres tipos de lípidos: *fosfolípidos*, *glucolípidos* y *esteroles* (como el *colesterol*). Todos con naturaleza anfipática, por tanto, en un medio acuoso se orientan espacialmente formando micelas esféricas o bicapas lipídicas. La estructura en bicapa permite que los grupos del extremo hidrofílico se asocien libremente con el medio acuoso, y las cadenas hidrófobas de ácidos grasos permanezcan en el interior de la estructura.

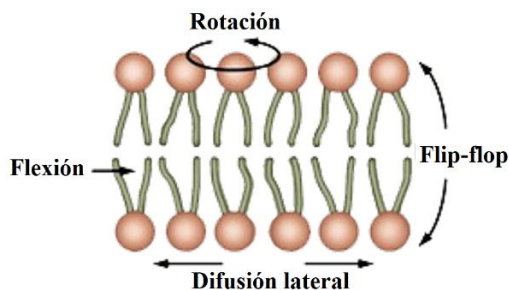
La distribución lipídica a lo largo de la membrana es irregular y asimétrica, pudiendo existir zonas de naturaleza fluida debido al movimiento de sus componentes, describiendo los siguientes movimientos. (Figura 1.5)

*Rotación*: supone el giro de la molécula lipídica en torno a su eje mayor.

*Difusión lateral o flexión*: Las moléculas lipídicas pueden difundirse libremente de manera lateral dentro de la bicapa.

*Flip-flop*: Es el movimiento de un lípido de una monocapa a su paralela debido a unas enzimas denominadas flipasas.

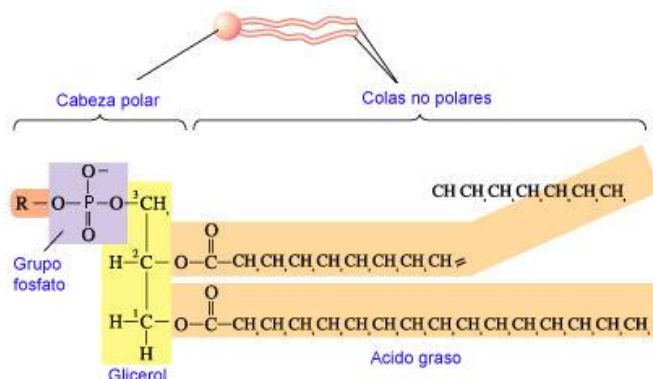
La fluidez de las moléculas que componen las membranas depende de la temperatura, naturaleza de los lípidos y de la presencia de colesterol. Cuando aumenta la temperatura aumenta la fluidez, además, la presencia de colesterol aumenta la rigidez de la membrana.



**Figura 1.5:** Movimientos en los lípidos de membrana.

## Fosfolípido

Se trata de una molécula anfipática, conformada por una región hidrofóbica la cual está compuesta por dos cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos que constituyen una región apolar, y otra región hidrofílica compuesta por una cabeza polar. (Figura 1.6)

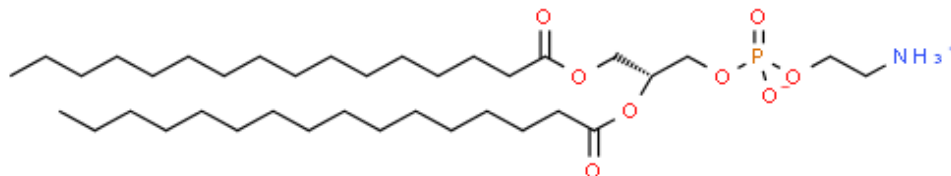


**Figura 1.6:** Estructura de un fosfolípido dividida por regiones o grupos y composición.  
Recuperado de: <http://biologiencienciasnaturales2016.blogspot.com/2016/06/lipidos.html> (Enero-2020)

Algunos fosfolípidos que están implicados en el anclaje de proteínas a la membrana plasmática son:

### Fosfatidiletanolamina.

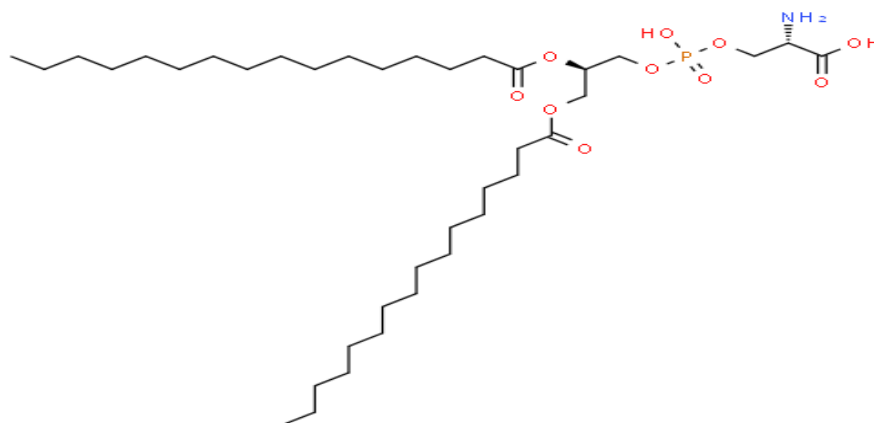
La fosfatidiletanolamina (PE) es un componente básico de la cara interna de las membranas en animales y plantas, puede auxiliar durante el ensamblaje de las proteínas de membrana guiando su plegamiento y facilitando su transición desde el entorno del citoplasma a la membrana plasmática. (Figura 1.7)



**Figura 1.7:** Estructura de un fosfolípido DPPE (1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) Fórmula molecular:  $C_{37}H_{74}NO_8P$ .

### Fosfatidilserina

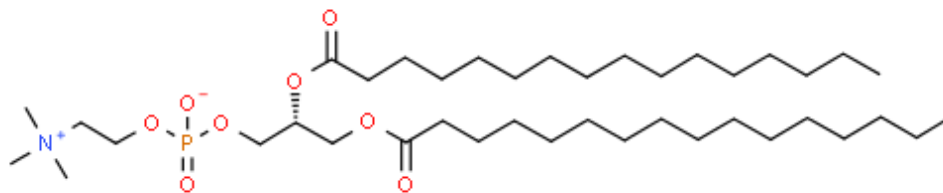
La fosfatidilserina (PS) contribuye a las interacciones electrostáticas no específicas de la cara interna de las membranas, aunque esta localización se puede ver alterada durante la activación de plaquetas o en la apoptosis, cuando se transfiere a la cara externa de la membrana y actúa como una señal para otras células. (Figura 1.8)



**Figura 1.8:** Estructura de un fosfolípido DPPS (1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoserine) Fórmula molecular:  $C_{38}H_{74}NO_{10}P$ .

### Fosfatidilcolina

Las fosfatidilcolinas (PC) son los fosfolípidos más abundantes en las membranas de células tanto animales como vegetales donde se encuentra en la cara externa de la membrana. También forma parte de las lipoproteínas plasmáticas. (Figura 1.9)



**Figura 1.9:** Estructura de un fosfolípido DPPC (1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocolina) Fórmula molecular:  $C_{40}H_{80}NO_8P$ .

### 1.1.4.2 Proteínas de membrana

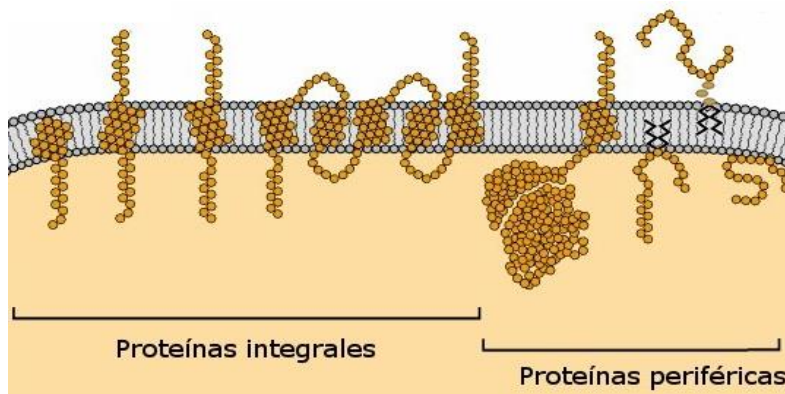
Las proteínas de membrana son proteínas que están embebidas en la membrana celular y están divididas en dos tipos. (Figura 1.10)

#### *Proteínas integrales:*

Conocidas también como proteínas transmembrana debido a que suelen atravesar la membrana una o varias veces. En consecuencia, estas proteínas están fuertemente ligadas a los lípidos en la bicapa.

#### *Proteínas periféricas:*

Estas proteínas se pueden encontrar en ambos lados de la bicapa lipídica, unidas débilmente a las cabezas polares.



**Figura 1.10:** Esquema general de proteínas integrales y periféricas.

Recuperado de: <http://www.bionova.org.es/biocast/documentos/figura/figtem1011/imagenes11/paginasimagenes>  
(Enero -2020)

## 1.2 CANALES IÓNICOS

Son estructuras proteicas embebidas en la membrana celular, con una configuración en forma de canal. Esta conformación no solo es un poro acuoso que permite el paso de iones, sino que presenta funciones características como [22]:

a) Permiten el flujo de iones a su través, el cual puede medirse como una corriente eléctrica, que puede producir cambios en el potencial de membrana.

b) Son capaces de discriminar que iones pasan a su través; es decir, presentan selectividad iónica.

c) Las proteínas del canal son capaces de adoptar diversos estados conformacionales en respuesta a un estímulo. Dichos estados son el estado conductor (estado abierto, que permite el paso de iones) y el no-conductor (estado cerrado).

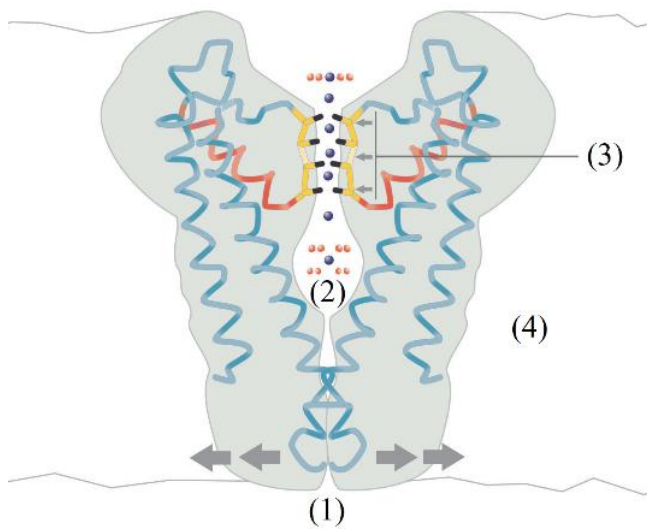
d) Los estímulos que influyen en el estado de canal pueden ser de naturaleza variada.

1) Canales regulados por ligandos: Abren en respuesta a la unión de determinados transmisores u otras moléculas.

2) Canales regulados por voltaje: Abren en respuesta a cambios en el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática.

3) Canales regulados por un impulso mecánico: Abren en respuesta a una acción mecánica.

Un elemento esencial de los canales iónicos es el llamado “filtro de selectividad” (Figura 1.11), que determina que ion se mueve a través del canal. El mecanismo de selectividad se basa tanto en el tamaño del ion como en su carga, de modo que ciertos residuos del canal se alinean en el poro e interaccionan con los iones, formando mínimos en el paisaje de energía que favorecen el paso de un determinado ion. En general, el poro de los canales voltaje-dependientes es altamente selectivo para un determinado ion, mientras que los activados por receptores presentan menor selectividad y pueden, en muchos casos, conducir aniones o cationes a su través.



**Figura 1.11:** Estructura general de un canal iónico: 1) Compuerta del poro. 2) Poro. 3) Filtro de selectividad. 4) Bicapa lipídica. Recuperado de: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2003/popular-information/> (Noviembre-2021).

### 1.2.1 Gradiente Electroquímico

El fenómeno llamado “gradiente electroquímico” se debe a que número de iones en el citoplasma y en el medio extracelular es muy distinto y con ello la diferencia de cargas, lo que produce una diferencia de potencial (potencial de membrana). Por tanto, la resultante de la suma del potencial químico y el potencial electrostático se denomina “gradiente electroquímico”, este fenómeno causa permeabilidad en la membrana.

### 1.3 ECUACIÓN DE NERNST Y GOLDMAN-HODGKIN-KATS

La acumulación de iones en las superficies tanto interna como externa de la membrana, produce un campo eléctrico dentro de ella que ejerce fuerza sobre los iones que la cruzan, por lo cual, la tendencia de movimiento de un ion es resultado de la fuerza química y eléctrica. Sin embargo, la posibilidad que tiene un ion de cruzar la membrana depende de la existencia de canales iónicos.



El comportamiento cuando la membrana es permeable a solo un tipo de ion está descrito por la ecuación de Nernst-Planck.

$$\underline{J}_k = \underline{j}_{kd} + \underline{j}_{ke} = -D_k z_k \vec{F} \left( \vec{\nabla} c_k + \frac{c_k z_k \vec{F}}{RT} \vec{\nabla} V \right) \quad (1.1)$$

Mientras que al considerar distintos tipos de iones este comportamiento se describe con la ecuación de Goldman–Hodgkin–Katz.

$$V_m = -\frac{RT}{\vec{F}} \ln \frac{P_K c_{i,K} + P_{Na} c_{i,Na} + P_{CL} c_{0,CL}}{P_K c_{0,K} + P_{Na} c_{0,Na} + P_{CL} c_{i,CL}} \quad (1.2)$$

Donde  $c$  corresponde a la concentración del ion y  $P$  la permeabilidad de la membrana al ion.

Las ecuaciones anteriores, cuya deducción se encuentra en el [Apéndice A](#), se limitan a brindar información equilibrio termodinámico del flujo de iones y con ello sobre la permitividad de la membrana. A pesar de su utilidad, estas ecuaciones no permiten evaluar los cambios asociados a modificaciones estructurales en el canal; por ejemplo, debido a la mutación de un aminoácido en el canal. Las simulaciones de dinámica molecular ofrecen una posibilidad para evaluar los efectos asociados a modificaciones en la estructura molecular. En el siguiente capítulo se hace un breve repaso de los conceptos de Termodinámica y Mecánica Estadística que dan sustento a las simulaciones de dinámica molecular.

# Capítulo 2

## TERMODINÁMICA Y MECÁNICA ESTADÍSTICA

La termodinámica brinda una descripción macroscópica del comportamiento de sistemas compuestos por un número gigantesco de  $N$  partículas interactuantes (del orden del número de Avogadro  $\approx 10^{23}$ ), Dichas partículas (átomos, moléculas, etc.) obedecen las leyes de la mecánica clásica o cuántica (leyes de Newton o la ecuación de Schrödinger, respectivamente). La mecánica estadística establece la conexión entre estos dos niveles de descripción [7].

Un sistema compuesto por  $N$  partículas clásicas se rige bajo las ecuaciones de Hamilton, lo que implica que los estados del sistema están definidos por  $3N$  coordenadas “ $\vec{q}_1, \vec{q}_2, \vec{q}_3, \dots, \vec{q}_{3N}$ ” y  $3N$  momentos “ $\vec{p}_1, \vec{p}_2, \vec{p}_3 \dots \vec{p}_{3N}$ ” por lo cual en un sistema tridimensional se tienen  $6N$  variables independientes, con ello el conjunto  $(\vec{p}, \vec{q})$  puede entenderse como un punto en el espacio  $6N$ -dimensional también llamado *espacio fase*.

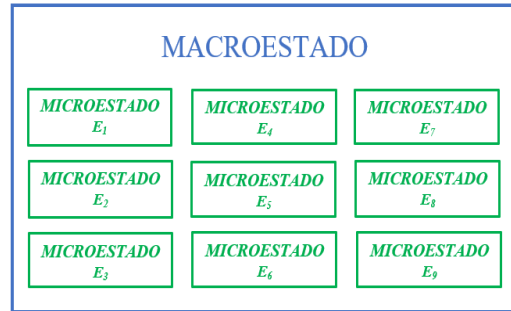
$$\frac{d\vec{q}_i}{dt} = \frac{\partial H(\vec{p}, \vec{q})}{\partial p_i}, \quad \frac{d\vec{p}_i}{dt} = -\frac{\partial H(\vec{p}, \vec{q})}{\partial q_i} \quad (2.1)$$

Todos los puntos en el espacio que cumplan la condición  $H(\vec{p}, \vec{q}) = E$  describen una superficie en el espacio fase, estos puntos representan los microestados accesibles del macroestado definido por la energía  $E$  [3].

Para un sistema macroscópico no es posible determinar los estados en cada instante, sin embargo, a partir de propiedades macroscópicas como el número de partículas  $N$ , el volumen  $V$  y una energía entre  $E$  y  $\Delta E$  es posible tener un gran número de posibles estados que satisfacen estas

condiciones [13]. A la gran cantidad de estados compatibles con los valores  $N$ ,  $V$ ,  $E$  pertenecientes a un *macroestado*, se les denomina *microestados compatibles*, mientras que la conjunción de los microestados y macroestado es llamado *ensemble*. (Figura 2.1)

La colección de sistemas que comparten energía  $E$  con igual número de partículas  $N$  en un volumen  $V$  es llamado ensemble microcanónico. Dicha colección puede estar en contacto térmico con un depósito de calor u otros sistemas con lo cual recibe el nombre de ensemble canónico.



**Figura 2.1:** Réplicas de un sistema macroscópico representando un ensemble. Cada sistema representa un estado microscópico diferente, compatible en energía.

La distribución de los puntos en el espacio fase está caracterizada por la función de densidad de probabilidad  $\rho(\vec{p}, \vec{q}, t)$  que toma como valores el infinito número de microestados. La densidad de probabilidad asociada a encontrar un sistema en un elemento de volumen  $d^{3N}p d^{3N}q$  del espacio fase a un tiempo  $t$  debe estar normalizada para todo tiempo:

$$\int \rho(\vec{p}, \vec{q}, t) d^{3N}p d^{3N}q = 1 \quad (2.2)$$

donde la integral se extiende a todo el espacio fase. La probabilidad  $P(R, t)$  de encontrar el sistema en un volumen finito  $R$  del espacio fase al tiempo  $t$  está dada por:

$$P(R, t) = \int_R \rho(\vec{p}, \vec{q}, t) d^{3N}p d^{3N}q \quad (2.3)$$

La mecánica estadística se sustenta en tres postulados:

*Postulado de probabilidad a priori:* En un sistema aislado todos los microestados compatibles con el macroestado son igualmente probables:

$$\rho(\vec{p}, \vec{q}) = f(x) = \begin{cases} \frac{1}{\Gamma(E)} & \text{para } E \leq H(\vec{p}, \vec{q}) \leq E + \Delta \\ 0 & \text{si no cumple la condición} \end{cases} \quad (2.4)$$

donde,

$$\Gamma(E) = \int_{E \leq H(\vec{p}, \vec{q}) \leq E + \Delta} H(\vec{p}, \vec{q}) d^{3N}p d^{3N}q \quad (2.5)$$

*Postulado de Gibbs:* El promedio de una variable microscópica corresponde a propiedades macroscópica del sistema.

$$E = \langle E \rangle_{ensemble} = \sum_j E_j P_j = \frac{1}{Q} \sum_j E_j e^{-\beta E_j} \quad (2.6)$$

$$p = \langle p \rangle_{ensemble} = -\frac{1}{Q} \sum_j \left( \frac{\partial E_j}{\partial V} \right)_N e^{-\beta E_j} \quad (2.7)$$

*Hipotesis ergódica:* El promedio de una variable  $f$  microscópica es igual al promedio temporal de esa variable  $f$ . Bajo el formalismo Hamiltoniano se define el flujo en el espacio de las fases  $(p(t), q(t))$ . Sea una función arbitraria  $f(\vec{p}, \vec{q})$ . Se define el promedio temporal de la función  $f$  como:

$$\langle f \rangle_T = \frac{1}{T} \int_{t_0}^{t_0+T} f(p(t), q(t)) dt \quad (2.8)$$

Esto es, el promedio a lo largo de una trayectoria. Por otra parte, el promedio del ensamble de la función  $f$  viene dado por:

$$\langle f \rangle = \int f(\vec{p}, \vec{q}) \rho(\vec{p}, \vec{q}) dp dq = \frac{1}{\Gamma(E)} \int_{E \leq H(\vec{p}, \vec{q}) \leq E + \Delta} f(\vec{p}, \vec{q}) dp dq \quad (2.9)$$

Es decir, un sistema es ergódico si para casi toda trayectoria  $(p(t), q(t))$  se cumple que el promedio temporal es igual al promedio estadístico:

$$\langle f \rangle_{ensemble} = \langle f \rangle_T \quad (2.10)$$

## 2.1 ENSAMBLE MICROCANÓNICO

La cantidad fundamental que proporciona la conexión entre el conjunto microcanónico y la termodinámica es la entropía.

Considerando un sistema aislado con  $N$  partículas y energía  $E$  en un volumen  $V$ , con una cubierta pequeña pero finita  $[E, E + \Delta E]$  cerca de la superficie de energía, el conjunto microcanónico se define entonces por:

$$\Gamma(E, V, N) = \int_{E \leq H(\vec{p}, \vec{q}) \leq E + \Delta} d^{3N} p d^{3N} q \rho(\vec{p}, \vec{q}) \equiv \Gamma(E) \quad (2.11)$$

Se entiende la dependencia de  $\Gamma(E)$  en  $N$ ,  $V$  y  $\Delta$ . Si  $\Phi(E)$  denota el volumen del espacio fase encerrado por la superficie de energía  $E$ .

$$\Phi(E) = \int_{H(\vec{p}, \vec{q}) \leq E} d^{3N} p d^{3N} q \quad (2.12)$$

Donde

$$\Gamma(E) = \Phi(E + \Delta) - \Phi(E) \quad (2.13)$$

Si  $\Delta \ll E$

$$\Gamma(E) = \frac{\partial \Phi(E)}{\partial E} \Delta \equiv \Omega(E) \Delta \quad (2.14)$$

Donde  $\Omega(E)$  es la densidad de estados del sistema con energía  $E$  y está definido por:

$$\Omega(E) = \frac{\partial \Phi(E)}{\partial E} = \int d^{3N}q \int d^{3N}p \delta(E - H(\vec{q}, \vec{p})) \quad (2.15)$$

### 2.1.1 Interacción térmica

Considerando dos sistemas en contacto térmico,

$$\Omega(E_A, E_B) = \Omega_A(E_A)\Omega_B(E_B) \quad (2.16)$$

la configuración con mayor probabilidad es:

$$\frac{\partial}{\partial E_A} \Omega(E_A, E_B) = 0 \quad (2.17)$$

que implica,

$$\frac{\frac{\partial}{\partial E_A} \Omega_A(E_A)}{\Omega_A(E_A)} = \frac{\frac{\partial}{\partial E_B} \Omega_B(E_B)}{\Omega_B(E_B)} \quad (2.18)$$

definimos una cantidad a la que llamaremos  $\beta$ ,

$$\beta_A \equiv \frac{\frac{\partial}{\partial E_A} \Omega_A(E_A)}{\Omega_A(E_A)} = \frac{\partial}{\partial E_A} \ln[\Omega_A(E_A)] \quad (2.19)$$

por lo cual:

$$\beta = \frac{\partial}{\partial E} \ln \Omega(E) \quad (2.20)$$

### 2.1.2 La entropía de Boltzmann

En un sistema aislado en equilibrio, todos los estados conjuntos accesibles tienen la misma probabilidad de ser ocupado.

$$P_i = \frac{1}{\Omega(E)} \quad (2.21)$$

La colectividad microcanónica queda determinada al conocer  $\Omega(E)$ , que es proporcional al número de microestados compatibles con una energía dada, Boltzmann relacionó  $\Omega(E)$  con la entropía termodinámica a través de la ecuación.

$$\begin{aligned} S &= -k_B \sum_i P_i \ln P_i = -k_B \sum_i \frac{1}{\Omega(E)} \ln \frac{1}{\Omega(E)} \\ &= -k_B \Omega(E) \left[ \frac{1}{\Omega(E)} \ln \frac{1}{\Omega(E)} \right] = -k_B \ln \frac{1}{\Omega(E)} \\ &= k_B \ln \Omega(E) \end{aligned} \quad (2.22)$$

La entropía de Boltzmann muestra consistencia en la definición de temperatura, la segunda ley de la termodinámica.

De la termodinámica sabemos que la temperatura se encuentra dada por:

$$\frac{1}{T} = \left( \frac{\partial S}{\partial E} \right)_{N,V} = k_B \left( \frac{\partial \Omega(E)}{\Omega E} \right)_{N,V} \quad (2.23)$$

Que sustituyendo (2.22) en (2.23) tenemos:

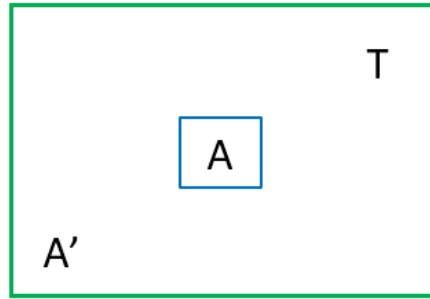
$$\beta = \frac{1}{k_B T} \quad (2.24)$$

Y de manera similar

$$P = -\frac{\partial E}{\partial V} = \frac{1}{\beta} \frac{\partial \Omega(E)}{\partial V} \quad , \quad \mu = \frac{\partial E}{\partial N} = \frac{1}{\beta} \frac{\partial \Omega(E)}{\partial N} \quad (2.25)$$

## 2.2 ENSAMBLE CANÓNICO

En un ensamble canónico, se considera un sistema pequeño A, que se encuentra en contacto con un baño térmico A', donde el volumen V, el número de partículas N y la temperatura T permanecen constantes, con el que intercambia energía. (Figura 2.2)



**Figura 2.2:** Sistema A en contacto con un baño térmico A' a temperatura T.

El formalismo canónico se fundamenta en la determinación de la distribución de probabilidad de los estados A, lo cual se logra basándose en que la conjunción de los sistemas  $A + A' = A_T$  es también un sistema aislado, de estados accesibles  $\Omega(E)$  y  $\Omega'(E')$ , por lo que el sistema conjunto tendría  $\Omega^0(E + E') = \Omega(E)\Omega(E')$ . Por lo tanto, la probabilidad de que A tenga energía E.

$$P(E) = C\Omega(E)\Omega'(E - E_T) \quad (2.26)$$

donde C es una constante de normalización sobre todos los estados posibles

Ahora suponemos que A' es un reservorio de energía, en el sentido que si  $A \ll A'$  entonces  $E \ll E'$ , por lo cual la probabilidad de que el sistema A este en un estado r, es de la forma:

$$P_r = C\Omega'(E^0 - E_r) \quad (2.27)$$

con C como constante de normalización, tal que  $\sum P(E) = 1$ , desarrollando  $\ln\Omega'(E')$  alrededor de  $E^0$ .

$$\ln P_r = \ln C + \ln\Omega'(E^0 - E_r) \quad (2.28)$$

$$\ln P_r \approx \ln C + \ln\Omega'(E^0) - \left[ \frac{\partial \ln\Omega'}{\partial E'} \right]_0 E_r + \dots$$



el equilibrio termodinámico entre A y A' se cumple cuando:

$$\frac{\partial \ln \Omega}{\partial E} = \frac{\partial \ln \Omega'}{\partial E'} \quad \rightarrow \quad \beta = \beta' \quad (2.29)$$

en cuanto al sistema A,  $\ln \Omega'(E^0)$  es constante, por lo tanto

$$P_r = C e^{-\beta E_r} \quad (2.30)$$

que permite escribir la probabilidad del estado  $E$  como:

$$P_r = \frac{e^{-\beta E_r}}{\sum_{r'} e^{-\beta E_{r'}}} \quad (2.31)$$

definimos aquí la función de partición del ensamble canónico como:

$$Z \equiv \sum_r e^{-\beta E_r} \quad (2.32)$$

Esta cantidad  $Z$  que depende explícitamente de la temperatura  $T$  y que contiene la dependencia en el número de partículas  $N$  y el volumen  $V$  a través de  $E_r(N, V)$ .

### 2.2.1 Variables termodinámicas

La función de partición permite calcular variables termodinámicas intensivas directamente de  $Z = Z(\beta, x)$ .

$$\frac{\partial \ln Z}{\partial \beta} = \frac{1}{Z} \sum_r -E_r e^{-\beta E_r} \quad , \quad \frac{\partial \ln Z}{\partial x} = \frac{1}{Z} \sum_r \left( -\beta \frac{\partial E_r}{\partial x} \right) e^{-\beta E_r} = -\beta X$$

de donde la suma se relaciona con la derivada de la función de partición, obteniendo:

$$\langle E \rangle = -\frac{1}{Z} \frac{\partial \ln Z}{\partial \beta} \quad , \quad X = \frac{1}{\beta} \frac{\partial \ln Z}{\partial x} \quad \rightarrow \quad P = \frac{1}{\beta} \frac{\partial \ln Z}{\partial V} \quad , \quad \mu = -\frac{1}{\beta} \frac{\partial \ln Z}{\partial N} \quad (2.33)$$

tomando en cuenta que  $Xdx$  se refiere a  $\sum Xdx = -PdX - \mu dV + \dots$ , una relación útil entre la función de partición u la entropía se obtiene de:

$$d \ln Z = \frac{\partial \ln Z}{\partial \beta} d\beta + \frac{\partial \ln Z}{\partial x} dx = -Ed\beta - \beta Xdx \quad (2.34)$$

resultando en:

$$S = k(\ln Z + \beta E) \rightarrow F = E - TS = -\ln Z \quad (2.35)$$

donde F es la energía libre de Helmholtz.

La energía libre de Helmholtz,  $F(N, V, T)$  es un potencial adecuado para un sistema en equilibrio con un baño térmico, relacionándolo con la función de partición canónica Z.

### 2.2.2 Energía libre de Helmholtz

La energía libre es una función termodinámica que determina el equilibrio de un sistema cerrado, en condiciones de volumen y temperatura constantes. Está relacionado con propiedades físicas en las que un químico o un bioquímico puede encontrar interés, como constantes de unión o preferencias conformacionales [10].

Usando la mecánica estadística, la energía libre de Helmholtz se puede expresar en términos de la función de partición canónica Z:

$$F = -k_B T \ln Z(N, V, T) = -NkT \left( 1 + \ln \left\{ \frac{V}{N} \left( \frac{2\pi m k T}{h^2} \right)^{3/2} \right\} \right) \quad (2.36)$$

Empleando la fórmula de Stirling para  $\ln N!$  Es posible calcular otras propiedades termodinámicas a partir de la ecuación de energía libre.

$$p = - \left( \frac{\partial F}{\partial V} \right)_{T, N} = \frac{NkT}{V} \quad (2.37)$$

$$S = -\left(\frac{\partial F}{\partial T}\right)_{V,N} = Nk \left( \frac{5}{2} + \ln \left\{ \frac{V}{N} \left( \frac{2\pi mkT}{h^2} \right)^{3/2} \right\} \right) \quad (2.38)$$

$$\mu = \left(\frac{\partial F}{\partial N}\right)_{T,V} = -kT \ln \left\{ \frac{V}{N} \left( \frac{2\pi mkT}{h^2} \right)^{3/2} \right\} \quad (2.39)$$

Obtenidas todas las cantidades como funciones de  $N, V, T$ , es posible utilizarlas para calcular  $U = F + TS = \frac{3}{2}NkT$  y ser empleado en la sustitución de la energía interna para obtener:

$$S(U, V, N) = Nk \left( \frac{5}{2} + \ln \left\{ \frac{V}{N} \left( \frac{4\pi mU}{3h^2 N} \right)^{3/2} \right\} \right) \quad (2.40)$$

# Capítulo 3

## SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR

La simulación de dinámica molecular es una técnica que permite realizar experimentos numéricos en un “laboratorio virtual”, empleando un modelo que, hasta cierto punto, se aproxima a un sistema físico o químico real, teniendo ventajas como poder ajustar parámetros (temperatura o presión) de manera directa [19].

La mecánica cuántica otorga la descripción más rigurosa de un sistema, pues toma en cuenta a los electrones en sus cálculos, haciendo posible el estudio de la estructura, las propiedades que dependen de la distribución electrónica además de la formación y estructura de enlaces. Sin embargo, su aplicabilidad se limita a estudios de unos cientos de átomos. Por otro lado, la Mecánica Clásica ignora los movimientos electrónicos, calculando la energía molecular en función de la posición de los núcleos atómicos.

Los cálculos de mecánica molecular se fundamentan en la aproximación de Born-Oppenheimer que permite desacoplar los movimientos electrónicos y nucleares, al ser la masa del núcleo mucho mayor que la de los electrones. De esta forma los electrones perciben al núcleo como estático, quien a su vez los percibe como “una nube de electrones”, así se considera que se adaptan rápidamente la posición del núcleo, es por ello que la energía de una molécula en estado basal puede tomarse como una función de las coordenadas de los núcleos atómicos. Esta función es denominada campo de fuerza.

El conjunto microcanónico consta de todos los estados microscópicos en la hipersuperficie de energía constante  $H(x) = E$ . Si se establece una conexión entre el conjunto microcanónico y la mecánica hamiltoniana clásica, tendemos entonces un sistema que evoluciona según las ecuaciones de Hamilton:

$$\dot{q}_i = \frac{\partial H}{\partial p_i}, \quad \dot{p}_i = -\frac{\partial H}{\partial q_i} \quad (3.1)$$

Como las ecuaciones de movimiento conservan el Hamiltoniano  $H(x)$ , una trayectoria calculada a través de las ecuaciones 3.1 generará configuraciones microscópicas pertenecientes a un conjunto microcanónico con energía  $E$ . Supongamos, además, que, dado un tiempo infinito, el sistema con energía  $E$  puede visitar todas las configuraciones en la hipersuperficie de energía constante. Un sistema con esta propiedad se dice que es ergódico y se puede utilizar para generar un conjunto microcanónico.

Dada una trayectoria ergódica generada por un Hamiltoniano  $H(x)$ , los promedios de espacio fase microcanónicos se pueden reemplazar por promedios de tiempo sobre la trayectoria de acuerdo con la ecuación 3.2 [19].

$$\langle a \rangle = \frac{\int dpdq f(\vec{p}, \vec{q}) \delta[E - H(\vec{p}, \vec{q})]}{\int dpdq \delta[E - H(\vec{p}, \vec{q})]} = \frac{1}{T} \int_0^T dt f(p_t, q_t) \equiv \bar{a} \quad (3.2)$$

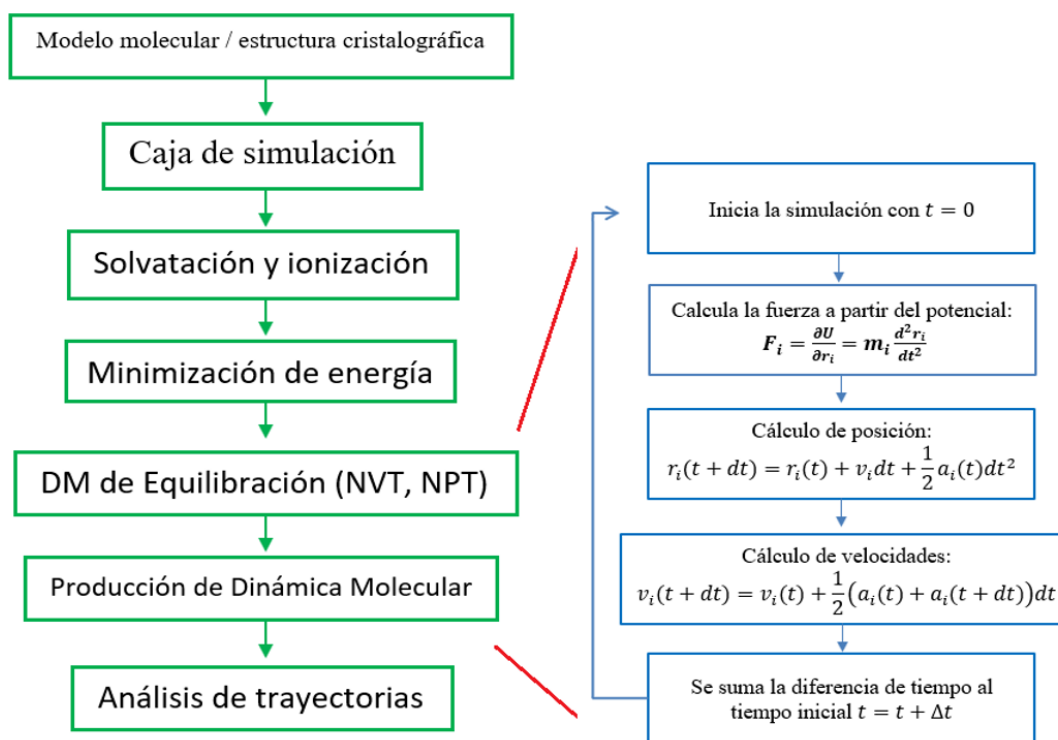
En un cálculo de dinámica molecular, se resuelven numéricamente las ecuaciones (3.1) con un conjunto de condiciones iniciales. Hacerlo requiere el uso de un integrador numérico de las ecuaciones de movimiento.

Un integrador para generar un vector de espacio de fase en momentos discretos que son múltiplos de un parámetro fundamental de discretización de tiempo  $\Delta t$ , conocido como paso de tiempo. A partir de la condición inicial  $X_0$ , los vectores de espacio de fase  $X_n \Delta t$ , aunque  $n =$

$0, \dots, M$  se generan al aplicar iterativamente el integrador o el solucionador [19]. El promedio de conjunto de una propiedad  $a(x)$  se relaciona con el promedio discretizado por:

$$A = \langle a \rangle = \frac{1}{M} \sum_{n=1}^M a(X_n \Delta t) \quad (3.3)$$

Por tanto, una simulación de dinámica molecular es una evaluación de la fuerza resultante sobre cada átomo de una molécula a lo largo de un tiempo finito. Durante la simulación la molécula adquiere distintas conformaciones de acuerdo el ensamble estadístico simulado. (figura 3.1)



**Figura 3.1:** Diagrama de pasos y acciones en una simulación de dinámica molecular.

Las simulaciones de dinámica molecular en este trabajo se realizaron con el software de licencia libre llamado GROMACS – Groningen machine for chemical simulations (máquina de Groningen para simulaciones químicas), bajo los campos de fuerza GROMOS96 [23] y

AMBRE99SB-ILDN [24], cuyo comportamiento se rige bajo las ecuaciones descritas en la sección 3.1.

### 3.1 CAMPO DE FUERZA

Un campo de fuerza en simulaciones de dinámica molecular se define como un conjunto de funciones utilizadas para calcular la energía potencial ( $U$ ) del sistema a partir de sus interacciones. La energía potencial se descompone en dos grupos, potenciales intermoleculares y potenciales intramoleculares.

$$U = U_{inter} + U_{intra} \quad (3.4)$$

#### 3.1.1 Potencial intermolecular

Los átomos que no están enlazados mediante enlaces covalentes entre ellos tienen interacciones de tipo intermolecular. En dicho caso la energía potencial en función de sus posiciones puede separarse en interacciones individuales, pares, tripletes, etc.:

$$U_{inter} = \sum_i v(r_i) + \sum_i \sum_{j>i} v(r_i, r_j) + \sum_i \sum_{j>i} \sum_{k>j>i} v(r_i, r_j, r_k) + \dots \quad (3.5)$$

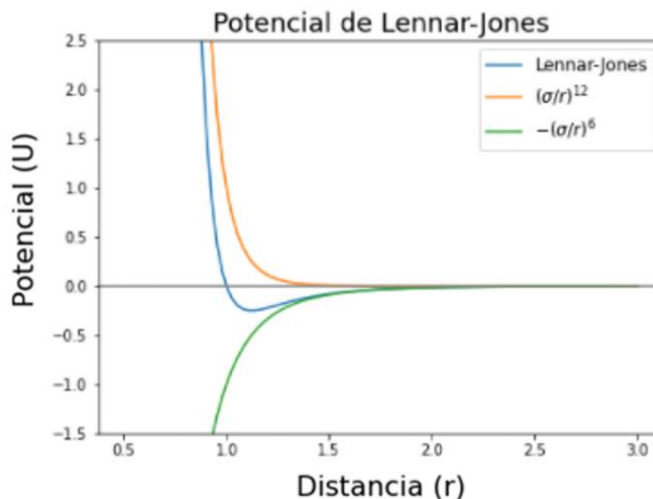
El término  $v(r_i)$  representa una fuerza externa aplicada al sistema, por ejemplo, los efectos de superficie. El cálculo de los potenciales para interacciones de tres o más cuerpos resulta complicado, por lo cual se hace una aproximación por pares,

$$U_{inter} = \sum_i v(r_i) + \sum_i \sum_{j>i} v(r_i, r_j) \quad (3.6)$$

El potencial efectivo de Lennard-Jones representa la interacción de dos partículas, donde  $\epsilon$  es una escala de energías (el mínimo de potencial) y  $\sigma$  una escala de distancias (la distancia a la que el potencial vale cero).

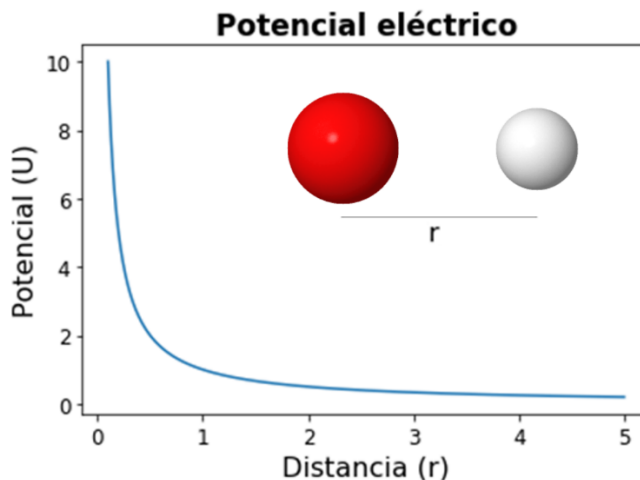
$$U^{LJ} = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (3.7)$$

El primer término  $\left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12}$  representa repulsión y el segundo  $-\left(\frac{\sigma}{r}\right)^6$  representa la atracción de Van Der Waals.



**Figura 3.2:** Potencial de Lennard-Jones entre un par de átomos en función de su distancia.

Considerando que las partículas tienen carga electrostática, la interacción debida al potencial eléctrico también es un potencial intermolecular cuya contribución forma parte del potencial intermolecular total.



**Figura 3.3:** Interacción atómica y grafica asociadas al potencial eléctrico.



$$U_{inter} = \sum_{\text{pares de átomos}} 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{\text{pares de átomos}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (3.8)$$

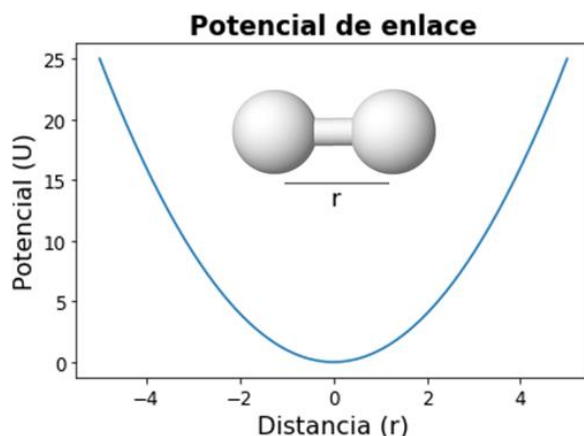
### 3.1.2 Potencial intramolecular

Una interacción intramolecular es aquella que sucede entre los átomos conformantes de la molécula. Para el cálculo del potencial intramolecular son tomados en cuenta los enlaces, ángulos de enlace y ángulos de torsión que se forman entre los átomos de cada molécula.

$$U_{intra} = U_{enlaces} + U_{\text{ángulos de enlace}} + U_{\text{ángulos de torsión}} \quad (3.9)$$

El primer término es la energía de enlaces, la cual está asociada a la energía potencial entre los átomos  $i$  y  $j$  separados por una distancia  $r$ :

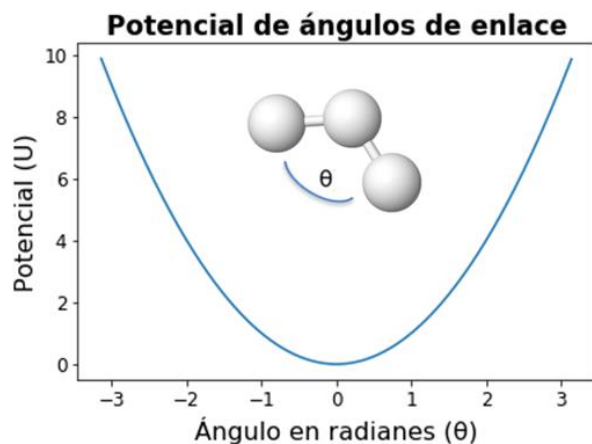
$$U_{enlaces} = \sum_{\text{enlaces}} k_{ij}^r (r_{ij} - r_0)^2 \quad (3.10)$$



**Figura 3.4:** Interacción atómica y gráfica asociadas al potencial de enlaces.

El segundo término es la representación de la energía de enlace que está asociada a la modificación del ángulo entre tres átomos  $i$ ,  $j$ ,  $k$ , la cual es descrita por el ángulo de flexión formado entre tres átomos, en donde  $k_{ijk}^r$  variara de acuerdo al movimiento de estos tres átomos:

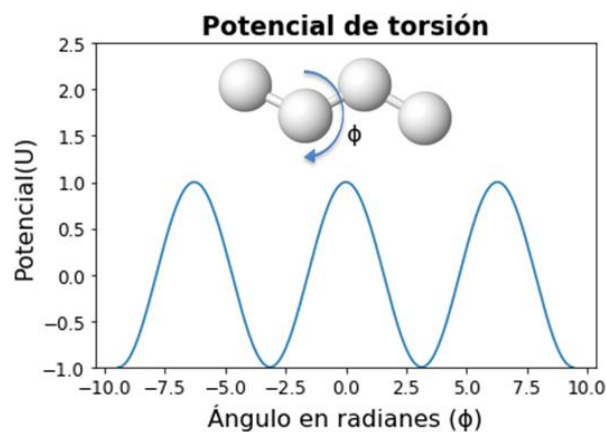
$$U_{\text{ángulos de enlace}} = \sum_{\text{ángulos de enlace}} k_{ijk}^{\theta} (\theta_{ijk} - \theta_0)^2 \quad (3.11)$$



**Figura 3.5:** Interacción atómica y gráfica asociada al potencial de ángulos de enlace.

La energía debida al ángulo de torsión se calcula tomando un conjunto de 4 átomos (i-j-k-l), y el ángulo formado por los planos definidos por i-j-l y j-k-l.

$$U_{\text{ángulos de torsión}} = \sum_{\text{ángulo de torsión}} \sum_m k_{ijkl}^{\phi, m} [1 + \cos(m\phi_{ijkl} - \gamma_m)] \quad (3.12)$$



**Figura 3.6:** Interacción atómica y gráficas asociadas al potencial de torsión.

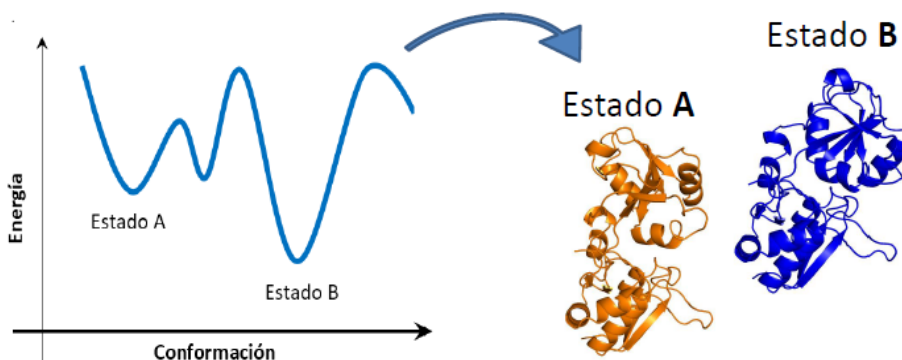
### 3.2 MINIMIZACIÓN DE ENERGÍA

La superficie de energía potencial de un sistema está definida por la variación de la energía en las moléculas que lo conforman, la cual depende directamente de su conformación estructural. (Figura 3.7)

La minimización de energía busca los puntos mínimos en la superficie de energía potencial, que corresponden a los estados más estables del sistema. El punto con el mínimo energético más bajo es conocido como mínimo global, mientras los demás son mínimos locales. La identificación de las conformaciones del sistema que corresponden a puntos de mínima energía potencial se denomina algoritmo de minimización.

Los métodos más empleados para la minimización de energía con descenso más pronunciado (steepest descent) y gradiente conjugado (conjugate gradient). Ambos métodos modifican las coordenadas en los átomos del sistema, mientras el sistema se desplaza al punto mínimo de energía.

La aproximación por descenso más rápido, busca el mínimo de energía siguiendo la máxima pendiente, lo cual funciona muy bien si la conformación del sistema se encuentra muy lejos del mínimo, mientras que la aproximación por gradiente conjugado busca la conformación de mínima energía con oscilaciones pequeñas.



**Figura 3.7:** Esquema de superficie de energía relacionado a una conformación.

### 3.2.1 Descenso Más Rápido

Dada una función  $f: R_n \rightarrow R$  que es diferenciable en  $x_0$ , la dirección del descenso más pronunciado es el vector  $-\vec{\nabla}f(x_0)$ . Considere la función:

$$\varphi(t) = f(x_0 + t\vec{u}) \quad (3.13)$$

donde  $\vec{u}$  es un vector unitario; es decir,  $\|\vec{u}\| = 1$ . Luego, por la regla de la cadena,

$$\varphi'(t) = \frac{\partial f}{\partial x_1} \frac{\partial x_1}{\partial t} + \dots + \frac{\partial f}{\partial x_n} \frac{\partial x_n}{\partial t} = \vec{\nabla}f(x_0 + t\vec{u}) \cdot \vec{u} \quad (3.14)$$

por lo tanto.

$$\vec{u} = -\frac{\vec{\nabla}f(x_0)}{\|\vec{\nabla}f(x_0)\|}, \quad \varphi'(0) = -\|\vec{\nabla}f(x_0)\| \quad (3.15)$$

Es posible reducir el problema de minimizar una función de varias variables a un problema de minimización de una sola variable, encontrando el mínimo de  $\varphi(t)$  para esta elección de  $\vec{u}$ . Es decir, encontramos el valor de  $t$ , para  $t > 0$ , que minimiza.

$$\varphi_0(t) = f(x_0 - t\vec{\nabla}f(x_0)) \quad (3.16)$$

Después de encontrar el minimizador  $t_0$  se tiene que:

$$x_1 = x_0 - t_0\vec{\nabla}f(x_0) \quad (3.17)$$

El proceso continúa buscando desde  $x_1$  en la dirección de  $-\vec{\nabla}f(x_1)$  para obtener  $x_2$  minimizando  $\varphi_1(t) = f(x_1 - t\vec{\nabla}f(x_1))$  y así sucesivamente,

$$x_{k+1} = x_k - t_k\vec{\nabla}f(x_k), \quad k = 0,1,2,3, \dots, \quad (3.18)$$

donde  $t_k > 0$  minimiza la función:

$$\varphi_k(t) = f(x_k - t\vec{\nabla}f(x_k)) \quad (3.19)$$

### 3.2.2 Gradiente Conjugado

Este método tiene una propiedad, la de generar un nuevo vector  $\vec{p}_k$  usando solamente la dirección anterior  $\vec{p}_{k-1}$ . Por lo que este método no necesita conocer  $\vec{p}_0, \dots, \vec{p}_{k-2}$  del conjunto de direcciones conjugadas, automáticamente el vector  $p_k$  es conjugado a estos.

Cada dirección se escoge para que sea una combinación lineal de la dirección de máximo descenso  $-\vec{\nabla}f(x_k)$ , que es lo mismo que el negativo del residuo  $-r_k$  y la dirección previa  $\vec{p}_{k-1}$ , de este modo tenemos:

$$\vec{p}_k = -r_k + \beta_k \vec{p}_{k-1} \quad (3.20)$$

donde el escalar  $\beta_k$  se determina por la necesidad de que  $\vec{p}_k$  y  $\vec{p}_{k-1}$  sean conjugados respecto a  $A$ . Entonces si se multiplica por  $\vec{p}_{k-1}^T A$  e imponiendo la condición  $\vec{p}_{k-1}^T A \vec{p}_k = 0$ , encontramos que:

$$\beta_k = \frac{r_k^T A \vec{p}_{k-1}}{p_k^T A \vec{p}_{k-1}} \quad (3.21)$$

### 3.3 ALGORITMOS DE INTEGRACIÓN

Para describir el movimiento atómico, hay varios métodos de diferencias finitas desarrollados para la integración numérica de la ecuación de movimiento de Newton. Estos métodos numéricos para aproximar las soluciones a ecuaciones diferenciales mediante derivadas aproximantes con ecuaciones de diferencias finitas. A continuación, se presentan 3 algoritmos de integración comúnmente usados.

### 3.3.1 Algoritmo de Verlet

Para integrar las ecuaciones de movimiento de Newton en cada paso de tiempo  $dt$ , suponga que el tiempo actual es  $t$ , estos pasos de tiempo ( $dt$ ) se pueden representar mediante la expansión de Taylor:

$$r_i(t + dt) = r_i(t) + \frac{dr_i(t)}{dt} dt + \frac{1}{2} \frac{dt^2 \vec{F}_i(t)}{m} + \frac{dt^3}{3!} \frac{\partial^3 r_i(t)}{\partial t^3} + O(dt^4), \quad (3.22)$$

El más común de los algoritmos para realizar la integración se llama “Algoritmo de Verlet”.

Comienza expandiendo  $r_i(t - dt)$ ,

$$r_i(t - dt) = r_i(t) - \frac{dr_i(t)}{dt} dt + \frac{1}{2} \frac{dt^2 \vec{F}_i(t)}{m} - \frac{dt^3}{3!} \frac{\partial^3 r_i(t)}{\partial t^3} + O(dt^4) \quad (3.23)$$

sumando las ecuaciones (2.3) y (2.4), lo que proporciona la ecuación para actualizar la configuración desde la posición actual, la aceleración, y la posición anterior en el Algoritmo de Verlet:

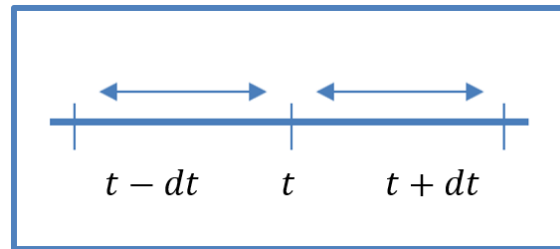
$$r_i(t - dt) = 2r_i(t) - r_i(t + dt) + \frac{\vec{F}_i(t)}{m} dt^2 + O(dt^4) \quad (3.24)$$

Como se ve en las expansiones de Taylor, el error en las posiciones atómicas es del orden de  $O(dt^4)$ . Además, las nuevas posiciones se obtienen sumando un número pequeño de  $\frac{\vec{F}_i(t)}{m} dt^2$  a una diferencia entre dos números grandes  $2r_i(t) - r_i(t + dt)$  [11].

Una desventaja del Algoritmo de Verlet es que las velocidades no aparecen explícitamente. Sin embargo, las velocidades se pueden obtener al restar las ecuaciones (3.23) y (3.22), con un error del orden de  $O(dt^3)$ .

$$v_i(t) = \frac{r_i(t + dt) - r_i(t - dt)}{2dt} + O(dt^3) \quad (3.25)$$

El Algoritmo de Verlet debido a su simetría es un algoritmo centrado, por lo cual es posible que sea reversible en el tiempo. Contiene 9N variables y debido a que las fuerzas son conservativas, el momento lineal también se conserva [9].



**Figura 3.8:** Representación de simetría en el algoritmo de Verlet.

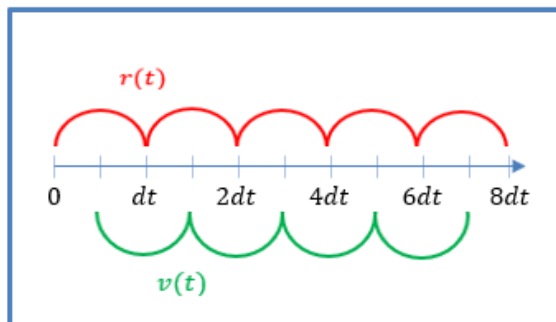
### 3.3.2 Algoritmo de salto de rana (Leap-frog)

El algoritmo de salto de rana mejoró el Algoritmo de Verlet con respecto al aspecto numérico y la velocidad explícita [11]. Las ecuaciones para la propagación de los átomos en el algoritmo de salto de rana están dadas por:

$$r_i(t + dt) = r_i(t) + v_i\left(t + \frac{dt}{2}\right) dt \quad (3.26)$$

$$v_i\left(t + \frac{dt}{2}\right) = v_i\left(t - \frac{dt}{2}\right) + a_i(t) dt \quad (3.27)$$

Debido a que la actualización de la posición y velocidad están desfasadas por medio paso de tiempo, la contribución de la energía cinética a la energía total no es exacta, pues no se puede calcular al mismo tiempo que se definen las posiciones.



**Figura 3.9:** Muestra de cómo el método de salto de rana calcula la velocidad y posición de forma alternada.

Las velocidades en el tiempo  $t$  se pueden calcular a partir de:

$$v_i(t) = \frac{1}{2} \left( v_i \left( t + \frac{1}{2} dt \right) + v_i \left( t - \frac{1}{2} dt \right) \right) \quad (3.28)$$

### 3.3.3 Algoritmo velocidad-Verlet

La desventaja del algoritmo de salto de rana se corrige en el algoritmo de velocidad-Verlet, donde la posición y la velocidad se actualizan mediante:

$$r_i(t + dt) = r_i(t) + v_i dt + \frac{1}{2} a_i(t) dt^2 \quad (3.29)$$

$$v_i(t + dt) = v_i(t) + \frac{1}{2} (a_i(t) + a_i(t + dt)) dt \quad (3.30)$$

El algoritmo de salto de rana se utiliza en el programa GROMACS – Groningen machine for chemical simulations (maquina de groningen para simulaciones químicas). El algoritmo de velocidad-Verlet está disponible en el programa GROMACS desde la versión 4.5 [11].



### 3.4 ACOPLAMIENTO TEMPERATURA Y PRESIÓN

Tomando sistemas aislados independientes del tiempo, el hamiltoniano de estos sistemas es invariante ante la rotación y la traslación. La trayectoria de dichos sistemas puede ser descrita mediante la integración de las ecuaciones de movimiento, dicha trayectoria mapea un conjunto microcanónico (NVE).

Las condiciones en que se realizan los experimentos en su mayoría no corresponden a las condiciones del conjunto NVE, sin embargo, un conjunto canónico NVT o un conjunto isobárico e isotérmico (NPT) representan de mejor forma un sistema real. En ambos casos las ecuaciones de movimiento deben modificarse con el acoplamiento de temperatura y presión [[Apéndice A2](#)].

**Tabla 3.1:** Ensamblados empleados en la simulación de dinámica molecular.

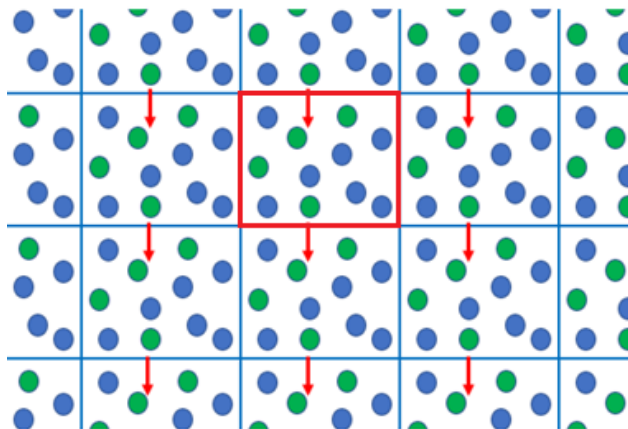
Ensamble	Parámetros constantes
Ensamble microcanónico	N, V, E - número de partículas (N), volumen (V), energía (E)
Ensamble canónico	N, V, T - número de partículas (N), volumen (V), temperatura (T)
Ensamble Isobárico – isotérmico	N, P, T - número de partículas (N), presión (P), temperatura (P)
Ensamble gran canónico	$\mu$ , V, T - potencial químico ( $\mu$ ), volumen (V), temperatura (T)

### 3.5 CONDICIONES PERIÓDICAS

Las condiciones de frontera (libres, rígidas o periódicas) tienen un efecto no despreciable en la exploración de las propiedades termodinámicas y estructurales del sistema. Por ejemplo, un cristal de estructura cúbica con 1000 átomos concentra el 49% de sus átomos en la superficie, mientras que para  $10^6$  átomos solo el 6% de ellos están en la superficie, debido a que la fracción de átomos en la superficie para un sistema tridimensional con  $N$  partículas es proporcional a  $N^{\frac{1}{3}}$  [[12](#)].

Con la implementación de condiciones periódicas de contorno es posible superar el problema de los efectos de superficie pues las condiciones periódicas pretenden imitar un volumen

infinito alrededor de la muestra. Esta acción se lleva a cabo considerando el volumen que contiene la muestra como un volumen primario del cual se desprende una red periódica infinita de volúmenes idénticos. (Figura 3.9)



**Figura 3.10:** Esquema bidimensional que muestra las condiciones periódicas, con el volumen primario al centro.

Cuando una molécula se mueva en el volumen primario, su imagen periódica infinita se moverá exactamente igual. Así, cuando una partícula deje el volumen primario, una imagen de esta partícula entrará al volumen primario por la cara opuesta. De esta forma no existen paredes en los límites del volumen y tampoco partículas en la superficie.

# Capítulo 4

## DINÁMICA MOLECULAR DE PÉPTIDO EMBEBIDO EN UNA MEMBRANA LIPÍDICA

Las simulaciones de dinámica molecular (DM) para estudio de proteínas de membrana presentan una mayor dificultad que una simulación de proteínas solubles. Esto debido a requieren de la unión de la estructura proteica y una membrana de fosfolípidos con dimensiones apropiadas. Si bien el montar un sistema adecuado no garantiza resultados satisfactorios, el montar un sistema deficiente si garantiza la existencia de errores. Por ello, el establecimiento del sistema proteína-lípidos requiere detalle en la posición de la sección transmembrana y la distancia entre proteína y lípidos, dejando la proteína libre de alguna falsa interacción con lípidos.

Para establacer un sistema proteína-membrana, se tomó como referencia el protocolo establecido en el artículo de referencia [25], donde se describe la simulación de DM del péptido de membrana KALP (*secuencia: GKK(LA)<sub>n</sub>LKKA*) en una bicapa de fosfolípidos (*DPPC*) empleando el campo de fuerza GROMOS96 [23]. El protocolo es replicado empleando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN [24], esto con la finalidad de validar la implementación de este y discutir la influencia del campo de fuerza en los resultados. En concreto se compara la influencia del campo de fuerza en la estimación de: i) Parámetros de orden de deuterio de las cadenas de acilo, ii) Densidad del sistema y iii) Área por lípido y grosor de membrana. Por último, debido a que las estructuras de membrana se encuentran en conformaciones de 64 y 128 lípidos, esto representa una limitación para el estudio de proteínas de mayor tamaño, por lo cual, se implementa un método para tener estructuras de membrana de la dimensión que se desee. Dichas estructuras

de membrana son llevadas al estudio KALP en DPPC bajo el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN, los resultados son comparados con la finalidad de validar el método para la obtención de membranas.

#### **4.1 Simulación de sistema Proteína-Membrana**

En la DM de proteínas de membrana existen complicaciones atribuidas a problemas potencialmente recurrentes, los cuales se manifiestan cuando la energía del sistema no converge.

Estos son:

- Superposición entre cadenas del grupo acilo.
- Superposición entre proteínas y lípidos.
- Superposición entre moléculas de agua e iones.

En esta sección se describen los pasos seguidos para evitar estos problemas. En breve, estos consisten en:

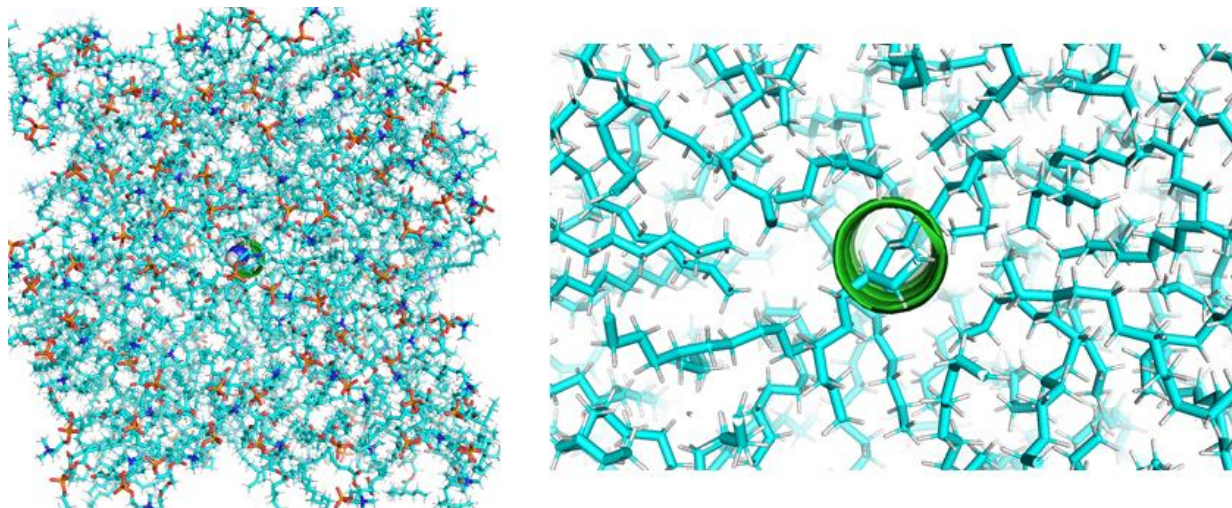
- 1) Preparación de la estructura para la simulación.
- 2) Adición de solvente y iones.
- 3) Ajuste de temperatura y presión

Una vez que el sistema ha sido tratado por los pasos anteriores el sistema está listo para producir datos y ser analizados.

##### **4.1.1 Preparación de la estructura para la simulación**

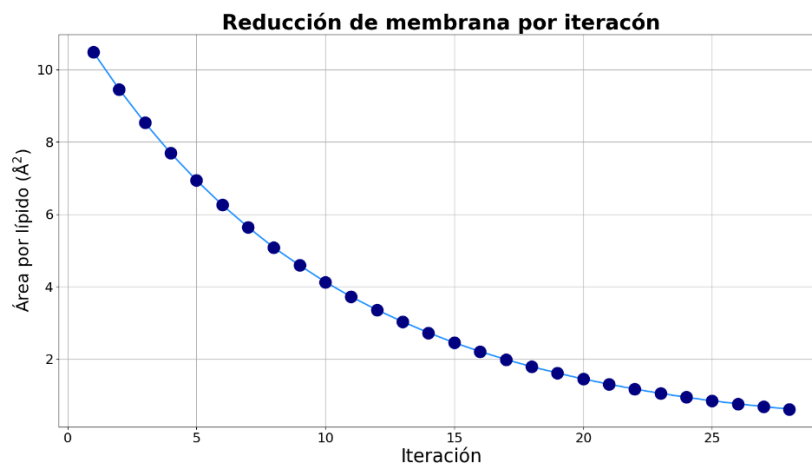
El sistema está conformado por lípidos pertenecientes a la membrana y aminoácidos del péptido, estas estructuras se encuentran por separado y para llevar a cabo la simulación de dinámica molecular es necesario poner en contacto ambas estructuras. La superposición trivial de las

coordenadas del péptido y la membrana otorgan un sistema incongruente, debido a que las cadenas de carbono invaden el espacio correspondiente al péptido (figura 4.1).

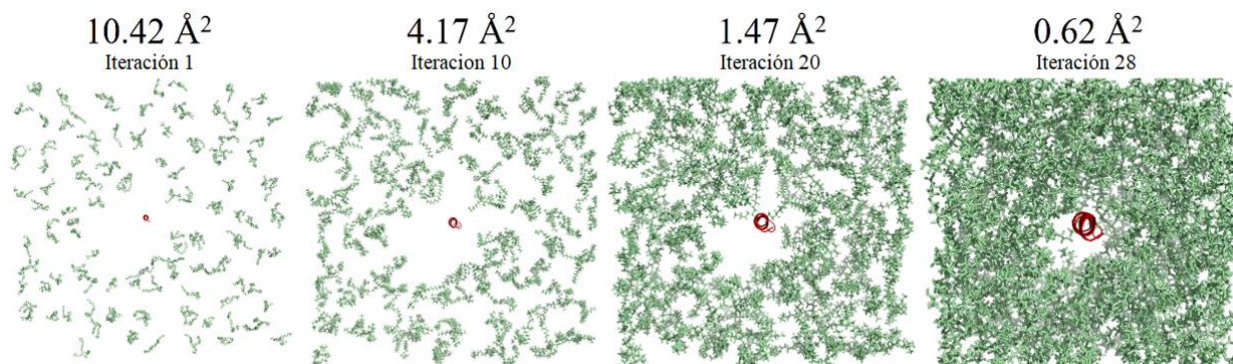


**Figura 4.1:** Superposición de estructuras DPPC y KALP. En color azul la estructura DPPC y en color verde KALP. (vista superior)

El problema de superposición es resuelto mediante el script en bash “inflateGRO.sh” [25], cuyo funcionamiento consiste en expandir la membrana, y eliminar los lípidos que se encuentran cercanos a la estructura del péptido, empleando un radio de corte, para posteriormente regresar el sistema a sus dimensiones originales. Para el caso particular del péptido KALP en membrana de DPPC, esto se logra mediante 28 iteraciones de reducción a 95% del tamaño original de la membrana, realizando una minimización de energía y eliminando lípidos en un radio de corte de 14 Å entre cada iteración (Gráfica 4.1). Este proceso otorga un sistema libre de superposiciones y energía minimizada, preparado para ser solvatado e ionizado (Figura 4.3).



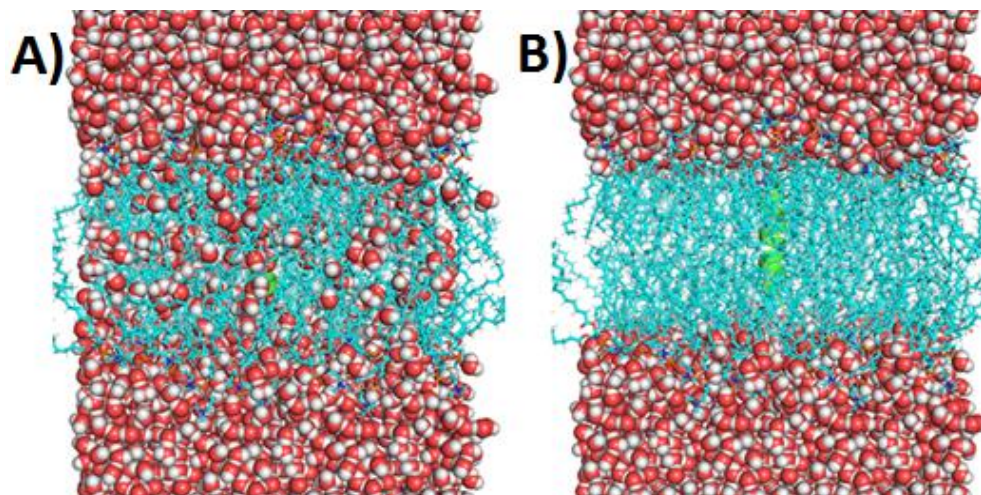
**Figura 4.2:** Disminución del área por lípido dada la reducción por pasos.



**Figura 4.3:** Reducción del sistema, pasando de un tamaño de 10.42Å<sup>2</sup> a 0.64Å<sup>2</sup>. Se muestra en color verde los lípidos DPPC y en color rojo el péptido KALP.

### 4.1.2 Solvatación e ionización

El proceso de solvatación GROMACS lo realiza rellenando el espacio intermolecular con “pequeños cubos de agua” previamente equilibrados. Adicionalmente, se busca eliminar las moléculas de agua que en este proceso se hayan colocado dentro de la membrana (Figura 4.4). Una vez que está limpia la membrana, el sistema es adicionado con iones cuya finalidad es la de generar un sistema eléctricamente neutro. Por último, se realiza una minimización de energía, lo que reduce el estrés molecular.



**Figura 4.4:** Vista lateral del sistema solvatado, previo al ajuste de temperatura y presión. A) Sin eliminar moléculas de agua en la membrana. B) Posterior a eliminar moléculas de agua en la membrana.

### 4.1.3 Ajuste de temperatura y presión

El proceso de simulación comienza por asegurar que el sistema bajo estudio se encuentre bajo las condiciones de temperatura y presión deseadas. Esto se logra mediante la realización de dos simulaciones de corta duración en los ensambles NVT (número de partículas, volumen y temperatura constantes) y NPT (número de partículas, presión y temperatura constantes). Durante este procedimiento se emplean acopladores de presión y temperatura (baróstatos y termostatos) que aseguran una rápida convergencia hacia la presión y temperatura deseadas (Tabla 4.1 y Tabla 4.2). Cuando la temperatura y/o presión alcanza los valores deseados, es necesario realizar un cambio en los termostatos y/o baróstatos para garantizar un muestreo correcto. La elección de la temperatura para un sistema membranar es particularmente importante pues ésta debe seleccionarse con base a las propiedades físicas de los lípidos que lo conforman. En concreto, debe tenerse en cuenta la temperatura de transición de fase (gelificación) (Tabla 4.3). Con el sistema equilibrado a la temperatura y presión deseada, se recopilan los datos que serán analizados y expuestos en la sección de resultados.

**Tabla 4.1:** Parámetros para equilibrar temperatura NVT.

NVT – GROMOS	
<b>Integrador</b>	md
<b>Número de pasos</b>	1,000,000
<b>Paso de tiempo</b>	0.001 ps
<b>Tiempo total</b>	1ns
<b>Acoplador de temperatura</b>	Berendsen
<b>Grupos sometidos al acoplamiento de temperatura</b>	Protein_DPPC, Sol_Ion
<b>Temperatura de referencia (K°)</b>	323

**Tabla 4.2:** Parámetros para equilibrar presión NPT.

NPT – GROMOS	
<b>Integrador</b>	md
<b>Número de pasos</b>	1,000,000
<b>Paso de tiempo</b>	0.001 ps
<b>Tiempo total</b>	1ns
<b>Acoplador de temperatura</b>	Nose-Hoover
<b>Grupos sometidos al acoplamiento de temperatura</b>	Protein_DPPC, Sol_Ion
<b>Temperatura de referencia (K°)</b>	323
<b>Acoplador de presión</b>	Berendsen

**Tabla 4.3:** Área por lípido, temperatura de transición de fase y referencia.

Rescatada de: [http://www.mdtutorials.com/gmx/membrane\\_protein/06\\_equil.html](http://www.mdtutorials.com/gmx/membrane_protein/06_equil.html) (Enero-2020).

Nombre de lípidos	Área por lípido (Å <sup>2</sup> )	Temperatura de Transición de fase (K)	Referencia
DPPC	62 – 64	315	J. Nagle (1993) Biophys. J. 64 : 1476
DMPC	60.6	297	Wohlert y Edholm (2006) J. Chem. Phys. 125: 204703
POPG	53	269	Dickey y Faller (2008) Biophys. J. 95: 2636
POPA	51-52	301	Dickey y Faller (2008) Biophys. J. 95 : 2636
POPC	65.8	271	Tieleman y col. (1998) Biochem. 37 : 17554
PAPA	56	298	Tieleman y col. (1998) Biochem. 37 : 17554
DMTAP	71	310	Gurtovenko y col. (2004) Biophys. J. 86 : 3461
POPS	55	300	Mukhopadhyay y col. (2004) Biophys. J. 86 : 1601

El tiempo de simulación para la “producción” es mucho mayor que durante el proceso de “ajuste de parámetros termodinámicos”, como se puede observar en las tablas 4.1, 4.2 y 4.4.



**Tabla 4.4:** Parámetros para la simulación de producción.

<b>PRODUCCION – GROMOS</b>	
<b>Integrador</b>	md
<b>Número de pasos</b>	100,000,000
<b>Paso de tiempo</b>	0.001 ps
<b>Tiempo total</b>	100ns
<b>Acoplador de temperatura</b>	Nose-Hoover
<b>Grupos sometidos al acoplamiento de temperatura</b>	Protein_DPPC, Sol_Ion
<b>Temperatura de referencia (K°)</b>	323
<b>Acoplador de presión</b>	Parrinello-Rahman

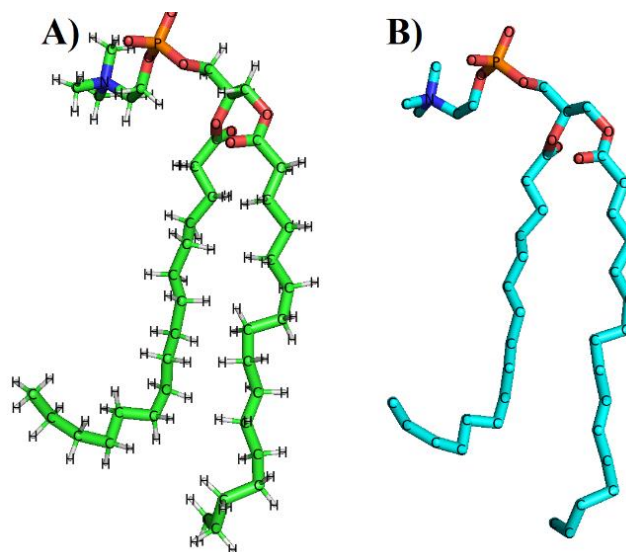
## 4.2 Resultados

### 4.2.1 Comparación de campos fuerza GROMOS69 y AMBER99SB-ILDN

Ambos sistemas se realizaron cajas de simulación de dimensiones x,y,z muy parecidas, siendo 6.418 Å, 6.443 Å, 6.596 Å para el sistema en GROMOS y 6.303 Å, 6.418 Å, 6.680 Å para Amber99sb-ildn. La Tabla 4.5 resume las características de cada sistema. Es importante notar que existe una diferencia considerable respecto al número de átomos que constituyen cada sistema. Esto se debe a que el campo de fuerza GROMOS96 considera a los átomos de hidrógeno de manera implícita (Figura 4.4). Ambos sistemas fueron simulados bajo el protocolo descrito en la Sección 4.1.

**Tabla 4.5:** Características moleculares y átomos totales de cada sistema de simulación.

<b>Campo de fuerza</b>	<b>Péptido</b>	<b>Lípidos</b>	<b>Solvente</b>	<b>Cl -</b>	<b>Átomos</b>
<b>GROMOS96</b>	1	128	3314	4	16481
<b>AMBER99SB-ILDN</b>	1	128	3466	4	38475



**Figura 4.5:** Estructuras DPPC empleadas bajo el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN y GROMOS96. A) Estructura hidrogenada empleada con en campo de fuerza AMBER99SB-ILDN, B) Estructura no hidrogenada empleada con el campo de fuerza GROMOS96.

Ambos sistemas fueron simulados bajo características computacionales idénticas, no obstante, existe una diferencia del triple de tiempo de simulación entre el sistema bajo el campo de fuerza GROMOS96 y el sistema simulado con AMBER99SB-ILDN. (Tabla 4.6)

**Tabla 4.6:** Características esenciales del equipo de cómputo empleado y tiempo de simulación, para cada sistema.

Campo de fuerza	Núcleos	Procesador	ns/día	Tiempo (hora)	Simulaciones
<b>GROMOS96</b>	64	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	50.7	47.3	1
<b>AMBER99SB-ILDN</b>	64	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	17.9	133.3	1

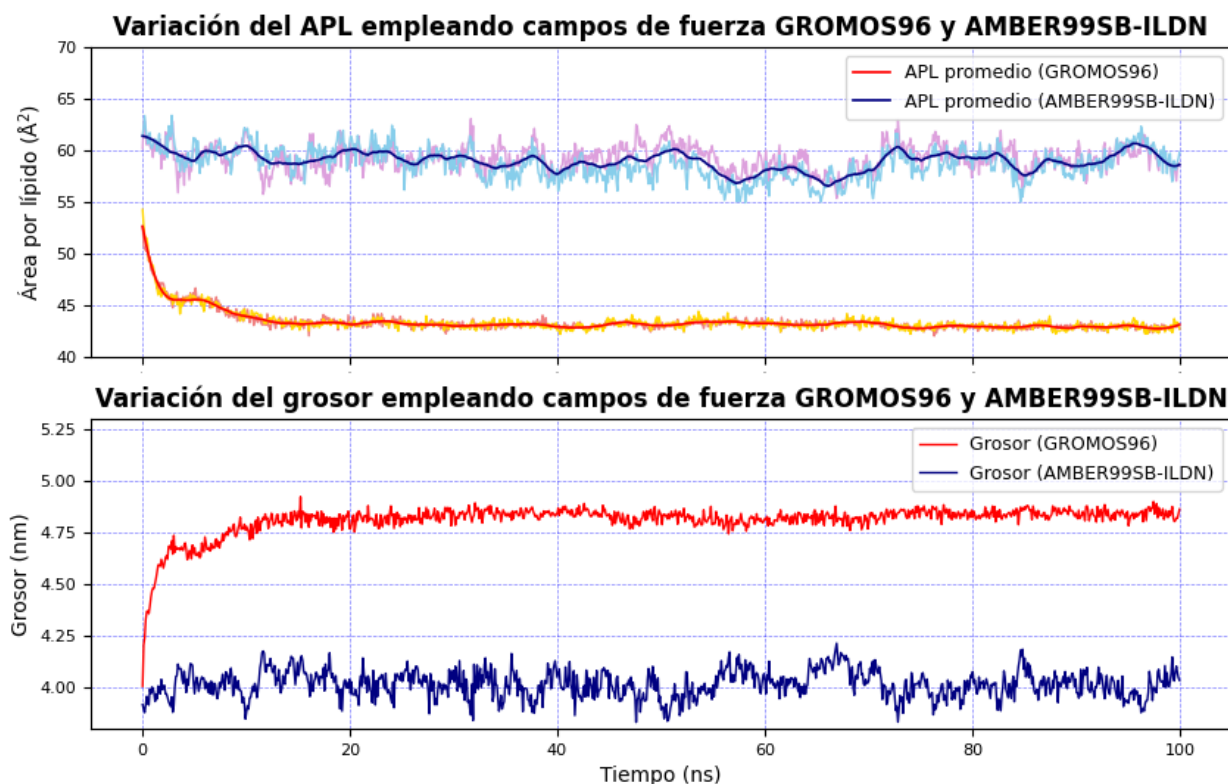
#### 4.2.1.1 Área por lípido y grosor de la membrana

El área por lípido que corresponde a la distribución de lípidos por unidad de área y el grosor de la membrana son empleados en la cuantificación de efectos de las proteínas asociadas, pues cuando existe interacción entre la proteína y la membrana, esta modifica su espesor [26]. La Tabla 4.3 muestra los valores área por lípido y la temperatura de gelificación, para distintos fosfolípidos.

Los valores del área por lípido y grosor de membrana son calculados con el método que se muestra en GridMAT-MD [27], el cual plantea, que, para calcular el área por lípido, se analiza el

comportamiento de la membrana a través de una malla cuadrada y midiendo la cantidad de lípidos existentes por cuadrante, obteniendo un promedio de lípidos existentes en cada uno de los cuadrantes. Al tratarse de una membrana bilipídica, se analizan los lípidos superiores e inferiores y los resultados se promedian. Para el análisis de grosor de membrana se considera el promedio de la posición con respecto al eje Z de todos los grupos fosfato en los lípidos superiores e inferiores y se obtiene la diferencia.

La variación del área por lípido, así como del grosor de membrana se mantiene consistente a lo largo del tiempo para ambos sistemas y la diferencia de estos valores entre ambas simulaciones es considerable. (Figura 4.6 y Tabla 4.7).

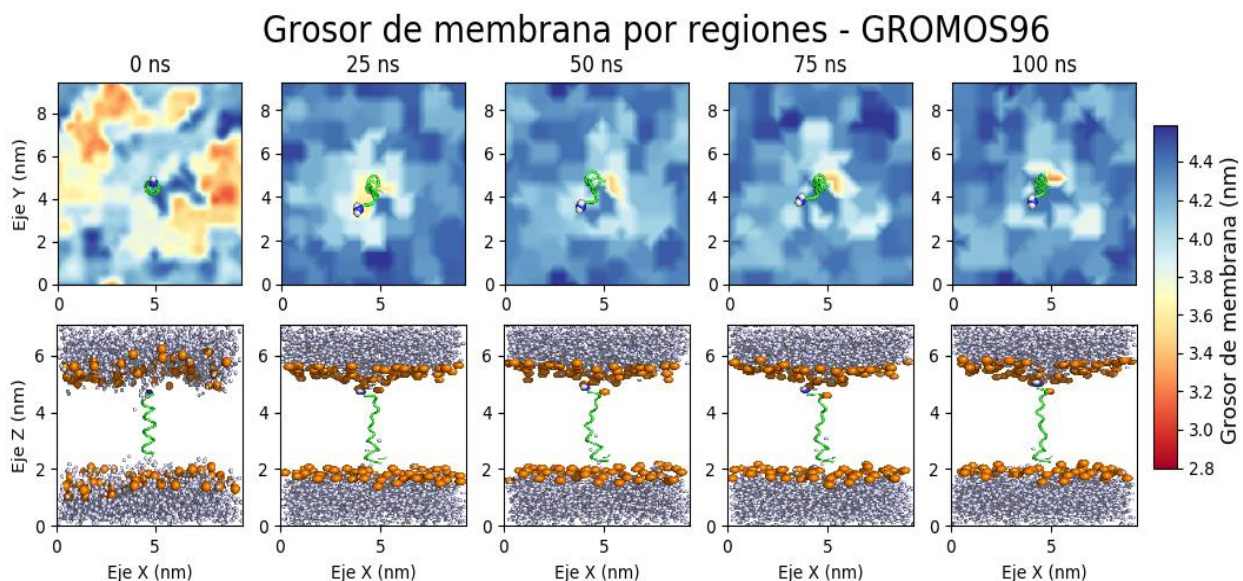


**Figura 4.6:** Variación del área por lípido empleando los campos de fuerza GROMOS96 y AMBER99SB-ILDN. A) Comportamiento del área por lípido en función del tiempo empleando, campos de fuerza GROMOS96 y AMBER99SB-ILDN. B) Comportamiento del grosor de membrana en función del tiempo, empleando campos de fuerza GROMOS96 y AMBER99SB-ILDN.

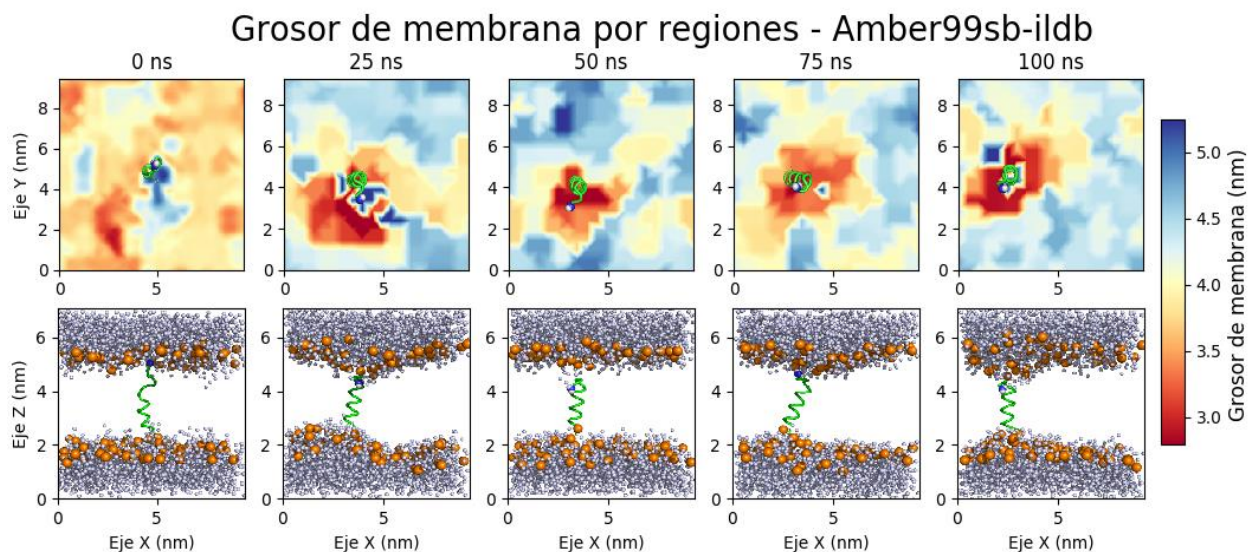
**Tabla 4.7:** Área por lípido y grosor de membrana promedio bajo el campo de fuerza GROMOS69 y AMBER99SB-ILDN.

	APL – GROMOS96 ( $\text{\AA}^2$ )	APL - AMBER99SB- ILDN ( $\text{\AA}^2$ )	Diferencia ( $\text{\AA}^2$ )	Grosor – GROMOS96 (nm)	Grosor - AMBER99SB- ILDN (nm)	Diferencia (nm)
<b>Promedio</b>	43.389	58.994	15.604	4.809	4.015	0.794

Analizar el grosor de la membrana, se consigue al dividirla con una malla en 400 cuadrantes y calcular en cada uno el grosor de forma “local”, asignándole a cada cuadrante un valor correspondiente al promedio de la distancia entre los fosfatos en los lípidos superiores e inferiores, permitiendo observar el comportamiento de la membrana en interacción con el péptido (Figuras 4.7 y 4.8).



**Figura 4.7:** Evolución temporal del comportamiento KALP-DPPC bajo el campo de fuerza GROMOS96, en la parte superior mediante un mapa de calor y en la parte inferior vista lateral que muestra péptido(verde), fosforo en DPPC (naranja) y agua (azul) GROMOS96.



**Figura 4.8:** Evolución temporal del comportamiento KALP-DPPC bajo el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN, en la parte superior mediante un mapa de calor y en la parte inferior vista lateral que muestra péptido(verde), fosforo en DPPC (naranja) y agua (azul) AMBER99SB-ILDN.

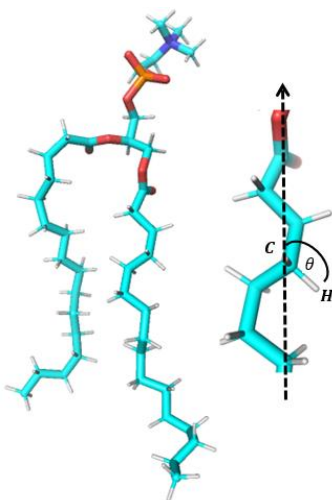
#### 4.2.1.2 Parámetros de orden de deuterio de las cadenas del grupo acilo.

Los lípidos de una bicapa fluida son altamente dinámicos, pues en ella se producen muchos movimientos como la difusión lateral, rotación y flexión lo cual influye en los parámetros de orden de las cadenas del grupo acilo [28].

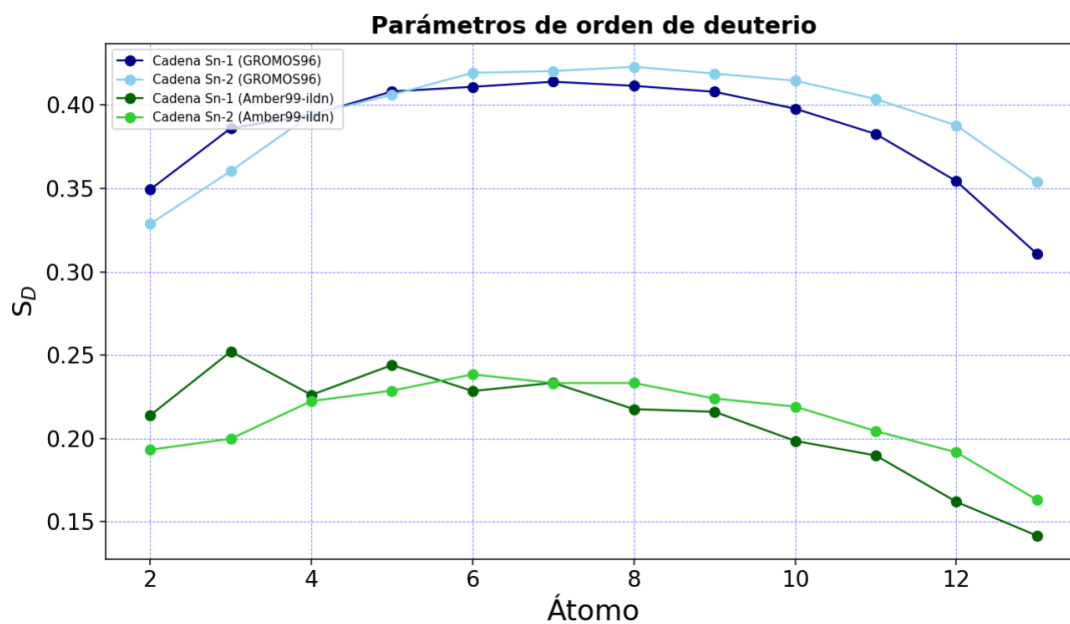
El parámetro de orden de deuterio ( $S_D$ ) mide los cambios de orientación de los enlaces C-H, para cada carbono en las cadenas de acilo de los lípidos, cuyo valor indica su movilidad. Experimentalmente estos parámetros son obtenidos de estudios por resonancia magnética y cuantifican que tan ordenados están los lípidos y su orientación promedio con respecto a la recta normal a la membrana [27][29]. Está definido por:

$$S_D = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle \quad (3.1)$$

Donde  $\theta$  es el ángulo entre el enlace C-H y el eje de referencia, los corchetes denotan el promedio temporal (Figura 4.9). Para campos de fuerza con hidrógenos implícitos la orientación de estos es inferida a partir de orientación relativa de los átomos de carbono vecinos.



**Figura 4.9:** Medición del ángulo en el enlace C-H y la normal a la membrana.



**Figura 4.10:** Parámetros de orden de deuterio bajo los campos de fuerza GROMOS96 y AMBER99SB-ILDN. En colores azul claro y fuerte se distinguen los parámetros de orden de deuterio bajo el campo de fuerza GROMOS69 y en colores verde claro y fuerte los parámetros de orden de deuterio bajo el campo fuerza AMBER99SB-ILDN.

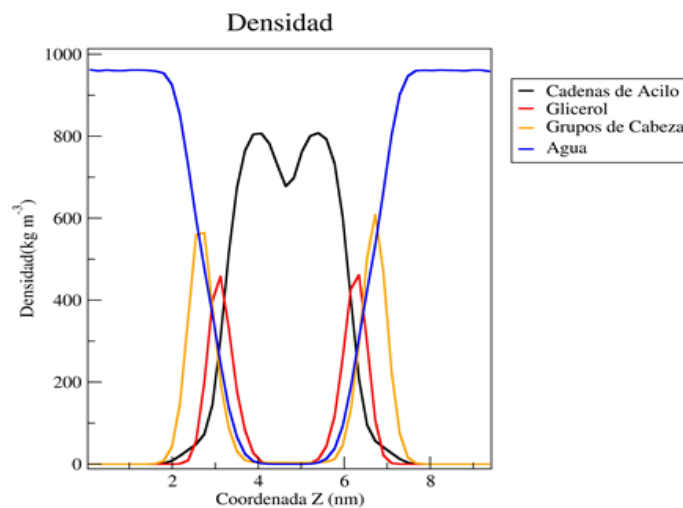
**Tabla 4.8:** Orden de parámetro de deuterio en la cadena Sn-1 y Sn-2 para simulaciones bajo los campos de fuerza GROMOS96 y AMBER99SB-ILDN. Diferencia en porcentaje entre los valores calculados con GROMOS96 y AMBER99SB-ILDN.

ATOMO	Sn-1 (GROMOS)	Sn-2 (GROMOS)	Sn-1 (AMBER)	Sn-2 (AMBER)	Diferencia Sn-1	Diferencia Sn-2
2	0.35	0.33	0.21	0.19	0,14	0,14
3	0.39	0.36	0.25	0.20	0,14	0,16
4	0.39	0.39	0.23	0.22	0,16	0,17
5	0.41	0.41	0.24	0.23	0,17	0,18
6	0.41	0.42	0.23	0.24	0,18	0,18
7	0.41	0.42	0.23	0.23	0,18	0,19
8	0.41	0.42	0.22	0.23	0,19	0,19
9	0.41	0.42	0.22	0.22	0,19	0,20
10	0.40	0.41	0.20	0.22	0,20	0,19
11	0.38	0.40	0.19	0.20	0,19	0,20
12	0.35	0.39	0.16	0.19	0,19	0,20
13	0.31	0.35	0.14	0.16	0,17	0,19

En las gráficas mostradas en la figura 4.10 se observa la diferencia en los resultados empleando los campos de fuerza GROMOS96 y AMBER99SB-ILDN, estos resultados se analizan a partir de comparar del valor de  $S_D$  en cada cadena y su equivalente en el otro campo de fuerza. De manera general, en la tabla 4.8 muestra que el valor  $S_D$  obtenido con GROMOS96, es mayor al calculado bajo AMBER99SB-ILDN, manteniendo una diferencia constante.

#### 4.2.1.3 Densidades del sistema.

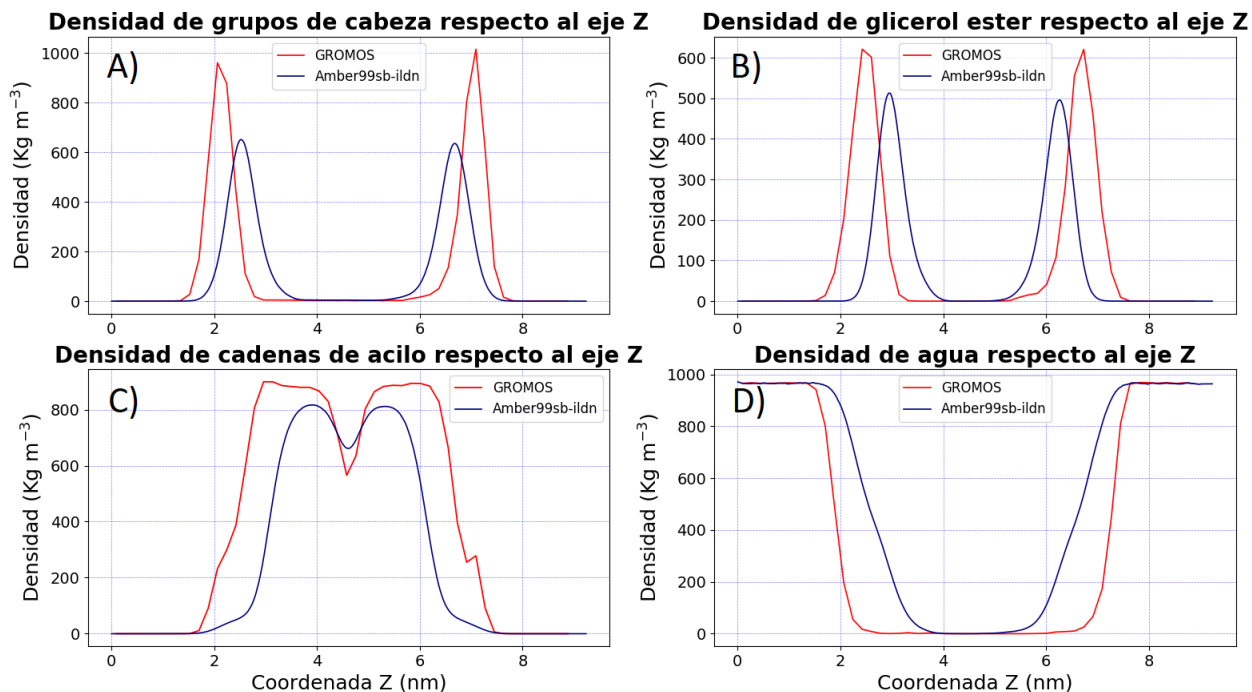
Las unidades de densidad son  $kg/m^3$ , y también se pueden calcular densidades electrónicas. Uno de los escenarios de uso más común es calcular la densidad de varios grupos a través de una bicapa lipídica, generalmente con el eje z en la dirección normal.



**Figura 4.11:** Densidad del sistema “KALP en DPPC” en donde se muestra el comportamiento de densidad de los grupos seleccionados a través del eje Z.

El análisis de densidad se realiza sobre 3 grupos en los fosfolípidos (grupo de cabeza, glicerol ester y cadena de acilo), además de la densidad del agua (Figura 4.11). Al comparar los sistemas bajo GROMOS69 y AMBER99SB-ILDN, resulta evidente la diferencia entre los valores en sus densidades (Figura 4.12), situación que encuentra respuesta en la manera en que el campo de fuerza GROMOS69 supe la ausencia de hidrógeno en las estructuras, aumentando el radio de los átomos aproximando el valor del potencial teórico al experimental.





**Figura 4.12:** Comparación entre las densidades de grupos de cabeza, glicerol ester, adenas de acilo y agua, bajo el campo de fuerza GROMOS69 y AMBER99SB-ILDN. A) Densidad de grupos de cabeza calculado bajo el campo de fuerza GROMOS69 y AMBER99SB-ILDN B) Densidad de glicerol ester bajo el campo de fuerza GROMOS69 y AMBER99SB-ILDN, C) Densidad de cadenas de acilo bajo el campo de fuerza GROMOS69 y AMBER99SB-ILDN, D) Densidad del agua bajo el campo de fuerza GROMOS69 y AMBER99SB-ILDN.

**Tabla 4.9:** Máximos de densidad calculados con los campos de fuerza GROMOS96 y AMBER99SB-ILDN, para cadenas de acilo, grupos de cabeza, glicerol ester y el porcentaje de diferencia.

Densidad	GROMOS96 kg m <sup>-3</sup>	AMBER99SB-ILDN kg m <sup>-3</sup>	DIFERENCIA
<b>Cadenas de grupo acilo</b>	1277	664	48%
<b>Grupos de cabeza</b>	621	526	15%
<b>Glicerol ester</b>	900	827	8%

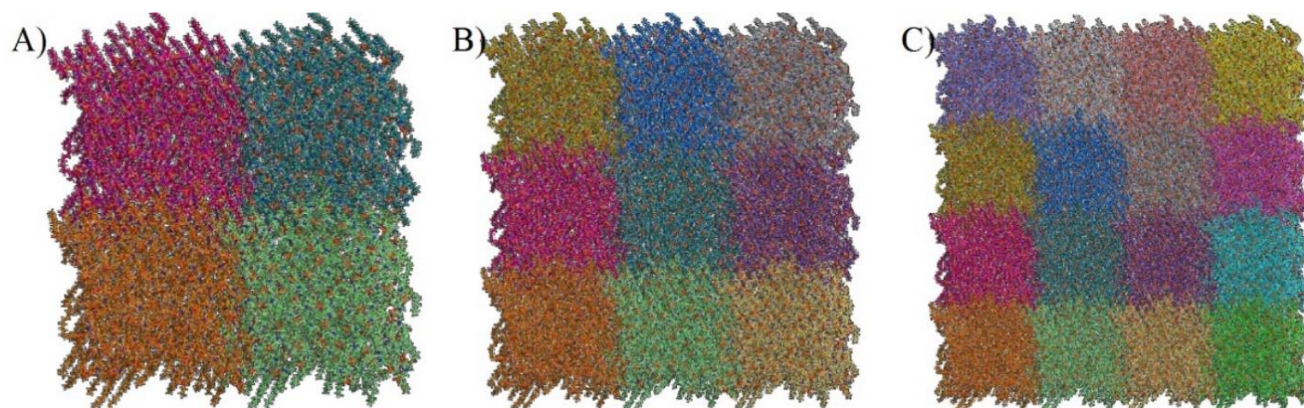
Dicha aproximación se ve reflejada en la densidad del sistema, pues sabemos que,  $densidad = masa/volumen$ , por lo cual, al aumentar el radio y suplir la ausencia de hidrógeno también aumenta la masa, este efecto se ve reflejado en las gráficas en la figura 4.12 y tabla 4.9, donde se observan valores más altos en la densidad del sistema simulado bajo GROMOS69, en comparación con la simulación realizada con AMBER99SB-ILDN, a excepción del agua, donde

se considera GROMOS69 tiene su mejor aproximación para suplir la ausencia de hidrógeno en la estructura.

#### 4.2.2 Diseño de membrana constituidas por 104, 195 y 295 lípidos.

Las dimensiones de la membrana con 128 lípidos limitan el estudio a estructuras proteicas pequeñas, este problema encuentra solución con el método para obtener membranas con dimensiones X-Y deseadas que se plantea a continuación.

Tomando del comportamiento de las condiciones a frontera la idea de “replicas virtuales”, en el diseño de membrana se reemplaza la “replica virtual” por una “replica real” pues al tratarse del mismo sistema, este puede empalmar con sí mismo en cualquier dirección. Este proceso podría ser equivalente al de solvatación de un sistema, en donde el espacio es rellenado con cubos pequeños de  $H_2O$ , en este caso será rellenado con replicas de la membrana. La única limitante reside en que se obtienen membranas con dimensiones múltiplos de la membrana primaria (Figura 4.13).

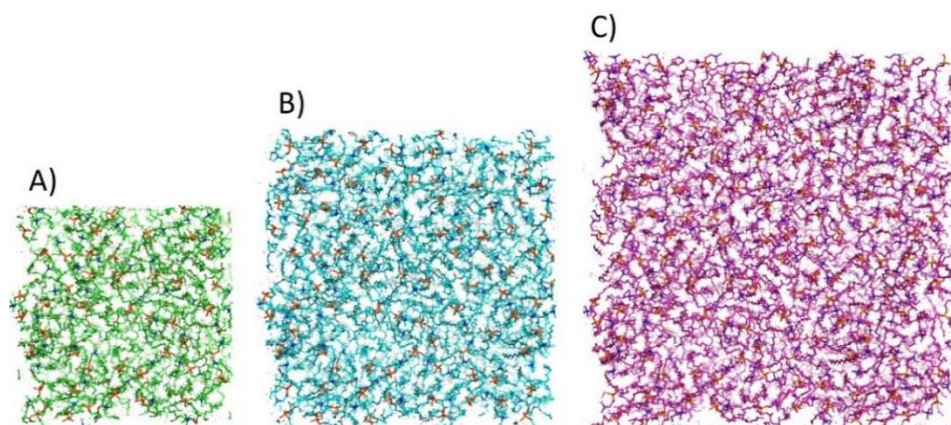


**Figura 4.13:** Vista superior de la unión de membranas. A) Membrana de 2x2, B) Membrana de 3x3, C) Membrana de 4x4.

Para obtener membranas de dimensiones X - Y deseadas, en primera instancia se crea un sistema con replicas que exceda las dimensiones objetivo y a este sistema le son eliminados los

lípidos cuyo fosfato se encuentre fuera de límites deseados. Posteriormente, se realiza una serie de 3 minimizaciones de energía sobre la estructura, disminuyendo las dimensiones de la caja de simulación entre cada una de ellas, con la finalidad reducir el estrés en las regiones correspondientes al sistema replicado y mejorar su empaquetamiento.

Con el fin de evaluar el funcionamiento de este proceso, se generaron réplicas de la simulación KALP en DPPC con membranas de 109, 195 y 295 lípidos, cuyas dimensiones son 5.7 nm x 5.7 nm, 7.8 nm x 7.8 nm y 9.8 nm x 9.8 nm respectivamente (Figura 4.13). Los sistemas fueron simulados bajo el protocolo descrito en la Sección 4.1 y su constitución esta resumida en la tabla 4.10 y las características del equipo de cómputo en la tabla 4.11.



**Figura 4.14:** Vista superior de membranas con 104, 195 y 295 lípidos. A) Membrana con 104 lípidos, B) Membrana con 195 lípidos, C) Membrana con 295 lípidos.

**Tabla 4.10:** Características moleculares y átomos totales de cada sistema de simulación.

Lípidos	Péptido	Solvente	Cl -	Átomos	Campo de fuerza
<b>104</b>	1	3219	4	23430	AMBER99SB-ILD
<b>195</b>	1	5701	4	42706	AMBER99SB-ILD
<b>295</b>	1	8184	4	63155	AMBER99SB-ILD

**Tabla 4.11:** Características esenciales del equipo de cómputo empleado y tiempo de simulación, para cada sistema.

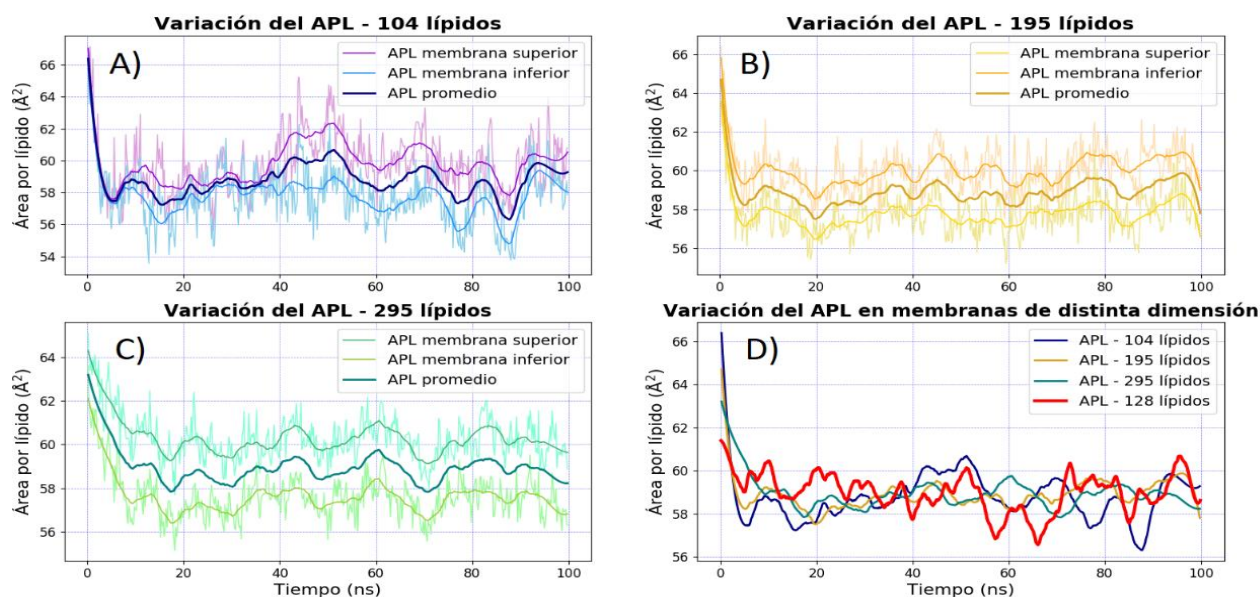
Sistema	Núcleos	Procesador	ns/día	Tiempo (hora)
<b>Membrana -104 lípidos</b>	8	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	55.6	43.1
<b>Membrana -195 lípidos</b>	8	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	32.1	74.6
<b>Membrana -295 lípidos</b>	8	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	8.6	279

#### 4.2.2.1 Área por lípido y grosor de membrana.

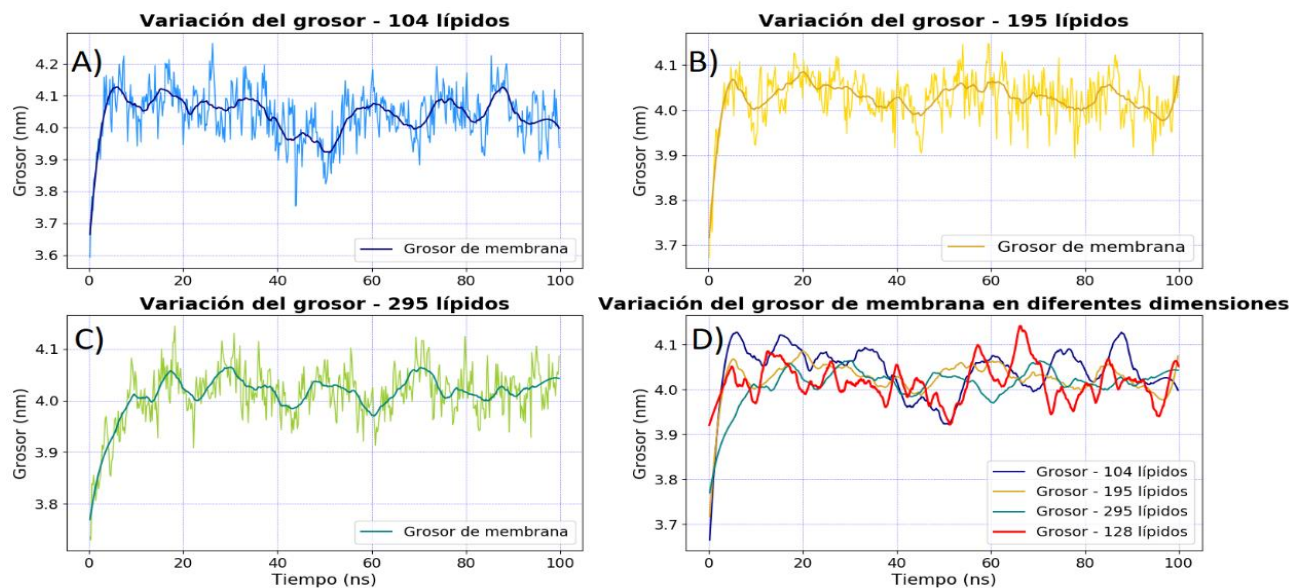
Se consideró la variación promedio del área por lípido de cada sistema (104, 195 y 295 lípidos), comparando así el comportamiento entre el sistema con 128 lípidos u original y los diseñados bajo el protocolo planteado en la sección 4.2.1.1 (Figura 4.14). Una comparación similar es realizada para el grosor de la membrana (Figura 4.15). Los resultados muestran que el protocolo planteado para restablecer membranas de tamaño deseado genera resultados equivalentes al sistema de referencia (Tabla 4.12).

**Tabla 4.12:** Área por lípido y grosor promedio.

Sistema	APL ( $\text{\AA}^2$ )	Grosor (nm)
104 lípidos	$58.77 \pm 1.59$	$4.04 \pm 0.08$
195 lípidos	$58.90 \pm 1.05$	$4.02 \pm 0.05$
295 lípidos	$58.94 \pm 1.00$	$4.01 \pm 0.05$
128 lípidos	$58.99 \pm 1.22$	$4.01 \pm 0.06$

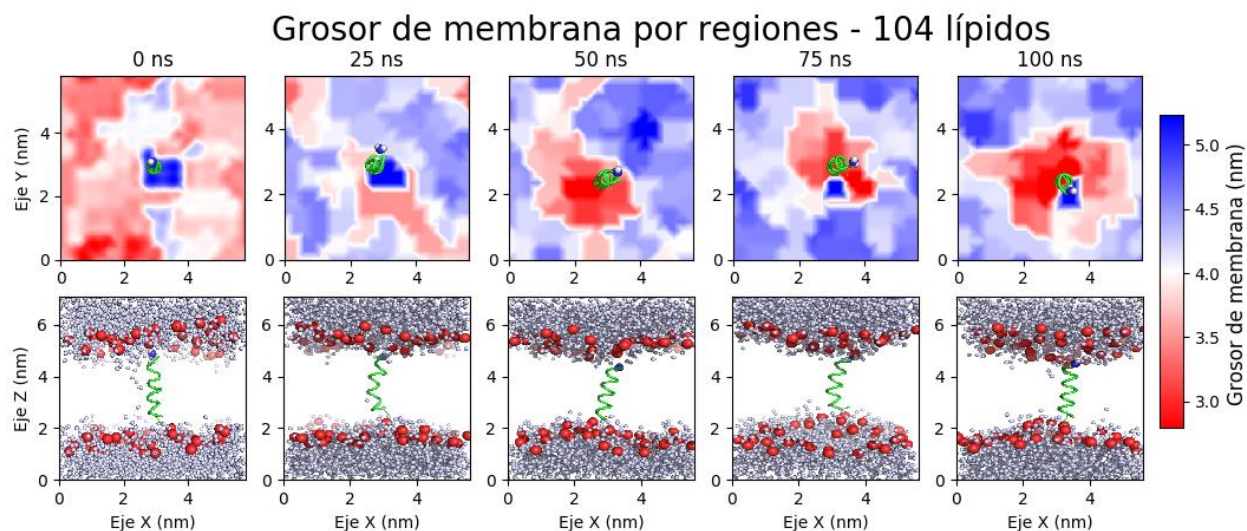


**Figura 4.15:** Variación del área por lípido en membranas con 104, 195 y 295 lípidos. A) Variación del área por lípido para 104 lípidos. B) Variación del área por lípido para 195 lípidos, C) variación del área por lípido para 295 lípidos. D) Comparación de la variación del área por lípido considerando los sistemas con 104, 195, 295 y 128 (original) lípidos.

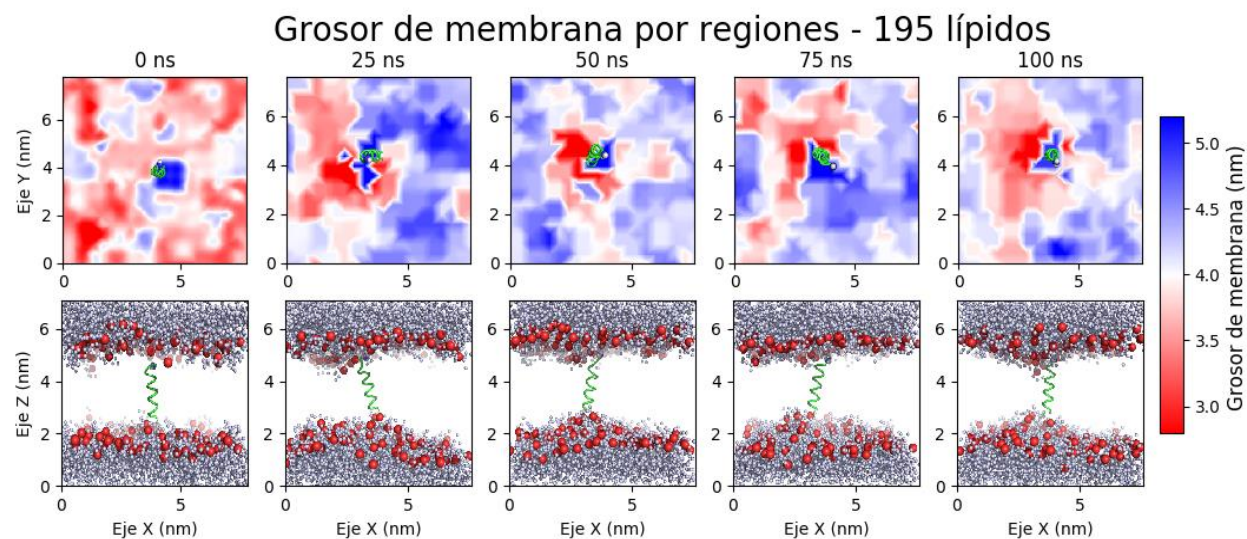


**Figura 4.16:** Variación de grosor en membranas con 104, 195 y 295 lípidos. A) Variación del grosor para 104 lípidos. B) Variación del grosor para 195 lípidos, C) variación del grosor para 295 lípidos. D) Comparación de la variación del grosor considerando los sistemas con 104, 195, 295 y 128 (original) lípidos.

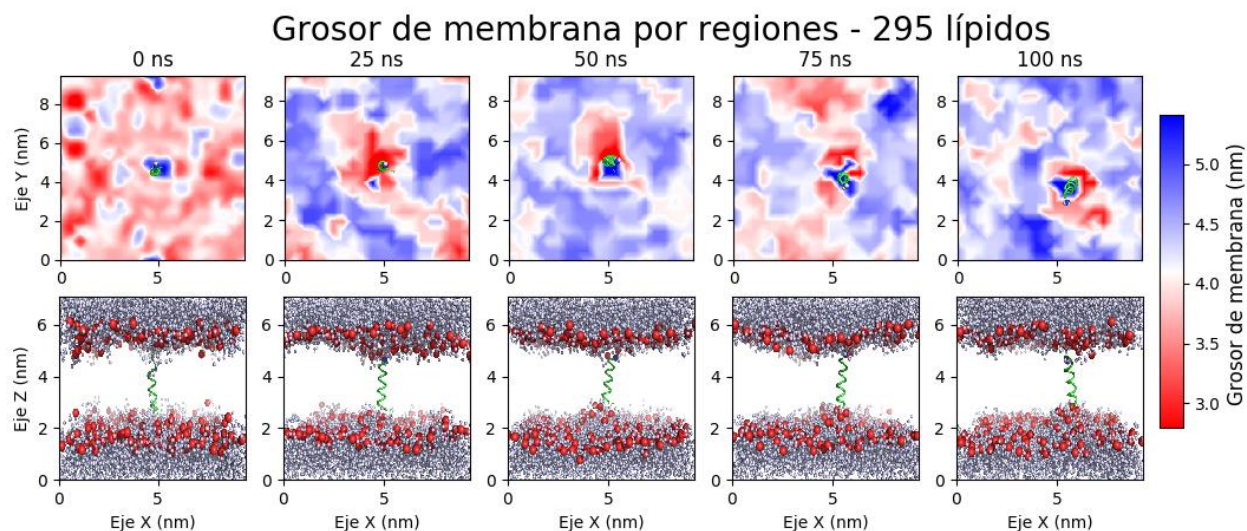
Para cada sistema se realizó un mapa de calor que muestra la variación del grosor de membrana a lo largo del tiempo (Figura 4.17 - 4.19), este procedimiento facilita la interpretación de la interacción entre el péptido y la membrana. En cada sistema analizado es posible observar los efectos de la interacción péptido-membrana, mostrando la compactación en la membrana alrededor del péptido en todos los casos.



**Figura 4.17:** Evolución temporal del comportamiento KALP-DPPC en una membrana de 104 lípidos. En la parte superior mediante un mapa de calor y en la parte inferior vista lateral que muestra péptido (verde), fosforo en DPPC (naranja) y agua (azul).



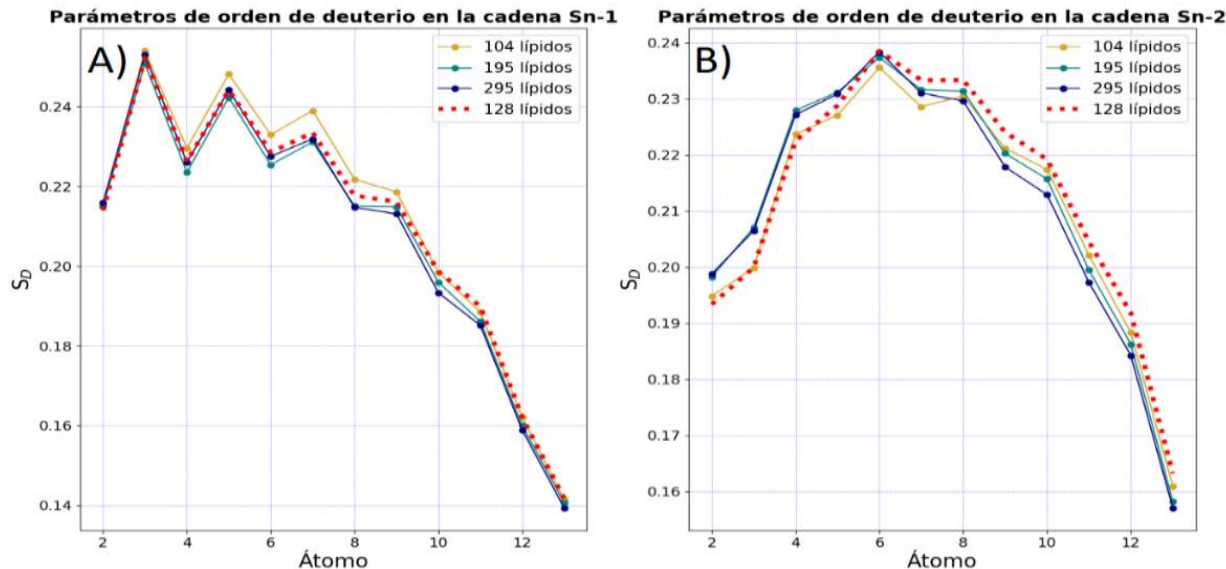
**Figura 4.18:** Evolución temporal del comportamiento KALP-DPPC en una membrana de 195 lípidos. En la parte superior mediante un mapa de calor y en la parte inferior vista lateral que muestra péptido (verde), fosforo en DPPC (naranja) y agua (azul).



**Figura 4.19:** Evolución temporal del comportamiento KALP-DPPC en una membrana de 295 lípidos. En la parte superior mediante un mapa de calor y en la parte inferior vista lateral que muestra péptido (verde), fosforo en DPPC (naranja) y agua (azul).

#### 4.2.2.2 Parámetros de orden de deuterio de las cadenas de acilo

El análisis de parámetros de orden de deuterio se realizó para cada sistema, comparando entre si el resultado en cada átomo (Figura 4.20). Al observar el comportamiento de los parámetros de orden de deuterio se analiza la desviación estándar que se tiene al considerar el sistema original con 128 lípidos y los sistemas de 104, 195 y 295 lípidos, esta desviación es tan pequeña que es posible considerar el resultado de cada sistema como equivalente. (Tabla 4.13 y Tabla 4.14)



**Figura 4.20:** Orden de parámetro de deuterio en las cadenas Sn-1 y Sn-2 de sistemas con 104, 195, 295 y 128 lípidos. A) Orden de parámetro de deuterio cadena 1 en sistemas de 104, 195, 295 y 128 (original) lípidos. B) Orden de parámetro de deuterio cadena 2 en sistemas de 104, 195, 295 y 128 (original) lípidos.

**Tabla 4.13:** Orden de parámetro de deuterio en la cadena Sn-1, de los sistemas con 104, 195, 295 y 128 (original) lípidos.

ATOMO	104 lípidos	195 lípidos	295 lípidos	128 lípidos	Promedio	Desviación
2	0,21498	0,21590	0,21393	0,21521	0,21500	0,00082
3	0,25076	0,25304	0,25220	0,25390	0,25247	0,00134
4	0,22346	0,22594	0,22618	0,22953	0,22628	0,00249
5	0,24228	0,24415	0,24411	0,24810	0,24466	0,00245
6	0,22539	0,22747	0,22852	0,23292	0,22858	0,00317
7	0,23108	0,23186	0,23343	0,23898	0,23384	0,00356
8	0,21501	0,21469	0,21766	0,22171	0,21727	0,00324
9	0,21482	0,21308	0,21608	0,21861	0,21565	0,00233
10	0,19593	0,19331	0,19863	0,19840	0,19657	0,00250
11	0,18612	0,18512	0,18987	0,18848	0,18740	0,00217
12	0,15997	0,15891	0,16208	0,16207	0,16076	0,00158
13	0,14066	0,13939	0,14174	0,14152	0,14083	0,00107

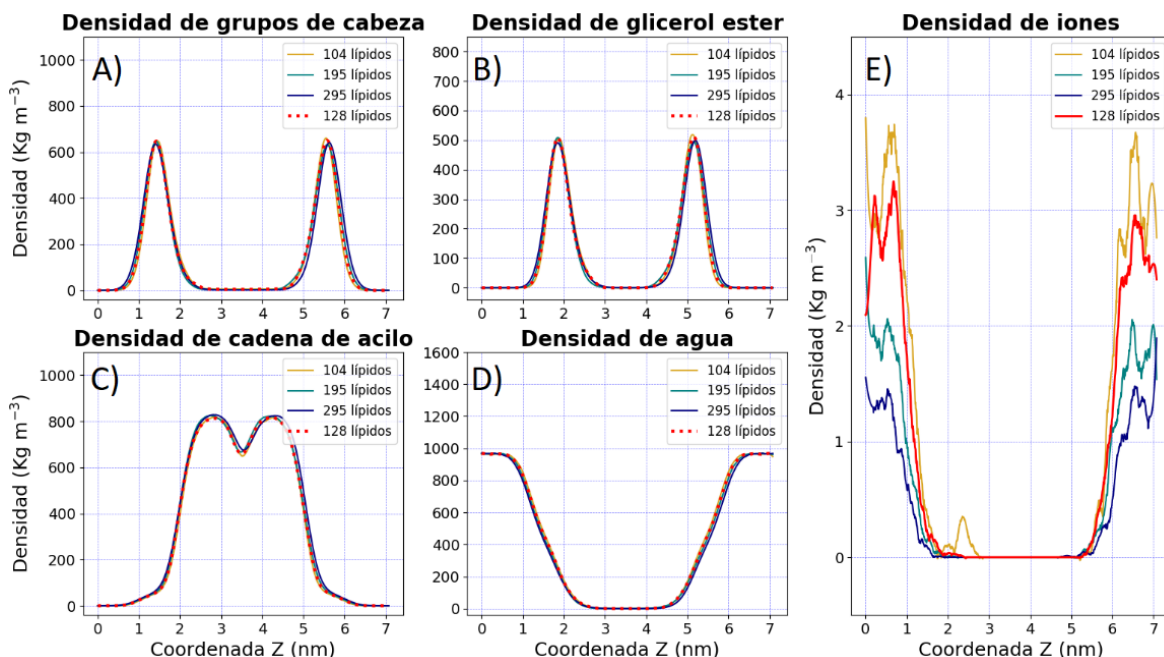
**Tabla 4.14:** Orden de parámetro de deuterio en la cadena Sn-2, de los sistemas con 104, 195, 295 y 128 (original) lípidos.

ATOMO	104 lípidos	195 lípidos	295 lípidos	128 lípidos	Promedio	Desviación
2	0,19825	0,19874	0,19334	0,19482	0,19629	0,00263
3	0,20700	0,20644	0,19989	0,19984	0,20329	0,00396
4	0,22792	0,22714	0,22249	0,22367	0,22531	0,00263
5	0,23116	0,23084	0,22877	0,22706	0,22946	0,00192
6	0,23734	0,23834	0,23850	0,23555	0,23743	0,00135
7	0,23159	0,23101	0,23331	0,22859	0,23112	0,00195
8	0,23136	0,22958	0,23331	0,23046	0,23118	0,00160
9	0,22025	0,21783	0,22401	0,22116	0,22081	0,00255
10	0,21570	0,21291	0,21919	0,21742	0,21630	0,00267
11	0,19947	0,19727	0,20449	0,20212	0,20084	0,00314
12	0,18625	0,18424	0,19178	0,18827	0,18764	0,00322
13	0,15817	0,15709	0,16323	0,16089	0,15984	0,00277



### 4.2.2.3 Densidades del sistema.

La densidad de cada región del sistema es equivalente entre sí, a excepción de la densidad de iones, pues al tratarse de un número fijo (4 iones) al aumentar las dimensiones de la membrana la densidad de iones en el sistema disminuirá, efecto que es visible (figura 4.21.E).



**Figura 4.21:** Comparación entre las densidades de grupos de cabeza, glicerol ester, adenas de acilo y agua de sistemas con 104, 195, 295 y 128 lípidos. A) densidad de grupos de cabeza en sistemas de 104, 195, 295 y 128 (original) lípidos. B) densidad de glicerol ester en sistemas de 104, 195, 295 y 128 (original) lípidos. C) densidad de cadenas de acilo en sistemas de 104, 195, 295 y 128 (original) lípidos. D) densidad de agua en sistemas de 104, 195, 295 y 128 (original) lípidos. E) densidad de iones en sistemas de 104, 195, 295 y 128 (original) lípidos.

### 4.3. Discusión

Como primer resultado en este capítulo, se encuentra el emular la simulación de dinámica molecular KALP en DPPC que se muestra en el artículo de referencia [25], para posteriormente replicar lo realizado bajo campo de fuerza GROMOS96 en el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN.

La diferencia en el área por lípido calculada con GROMOS96 y AMBER99SB-ILDN es atribuida a la ausencia de hidrógenos en el sistema GROMOS96, situación que repercute en el comportamiento de las cadenas de grupo acilo, las cuales se muestran “extendidas” sobre el eje Z. Este comportamiento se ve igualmente reflejado en el grosor, pues la conformación extendida de las cadenas de acilo sobre el eje Z, ocupan una menor área. Es importante recordar que el campo de fuerza GROMOS96 considera implícitamente los hidrógenos.

El comportamiento que se observa en las figuras 4.7 y 4.8 muestra mayor influencia del péptido KALP en los lípidos DPPC bajo el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN, este comportamiento es justificado por las interacciones debidas al hidrógeno en las estructuras empleadas bajo dicho campo de fuerza.

Empleando ambos campos de fuerza los extremos del péptido permanecen ligados a los grupos fosfato, logrando así deformaciones de membrana y con ello la disminución de grosor.

Al igual que los análisis de área por lípido y grosor de membrana, el orden de parámetro de deuterio calculado bajo el campo de fuerza GROMOS69, se ve afectado por la carencia de hidrógenos en las estructuras. Sin embargo, la diferencia en el valor calculado bajo AMBER99SB-ILDN resulta consistente.

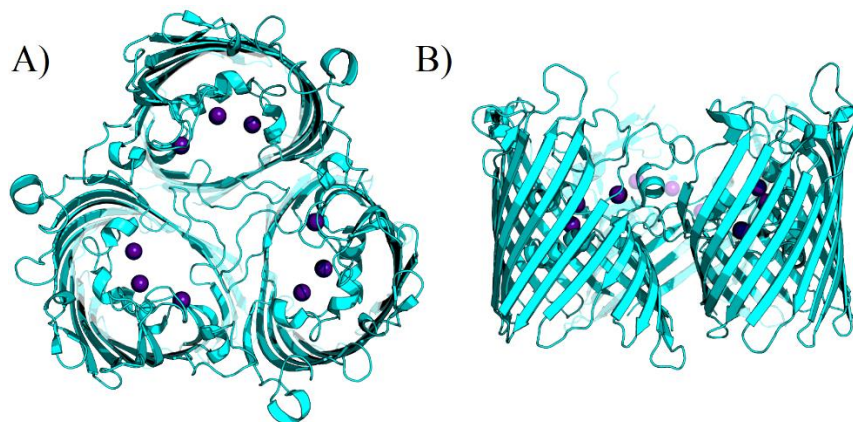
Tal consistencia en la diferencia entre los valores de parámetro de orden lleva a pensar que, si bien, emplear el campo de fuerza GROMOS69 no otorga resultados lo suficientemente detallados para ser confiables, si otorga una aproximación que se ve compensada ahorrando tiempo de simulación. En consecuencia, en el resto de las simulaciones desarrolladas en este trabajo se empleará el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN.

Dados los resultados obtenidos de comparar el sistema de 128 lípidos (original) con los sistemas de 104, 195 y 295 lípidos cuyas membranas fueron construidas bajo el método planteado en la sección 4.4 y cuyo comportamiento resultó equivalente, es posible decir que el método de diseño de membranas es completamente confiable.

# Capítulo 5

## DINÁMICA MOLECULAR DEL PORO PorB y ANÁLISIS MEDIANTE ELECTROFISIOLOGÍA COMPUTACIONAL

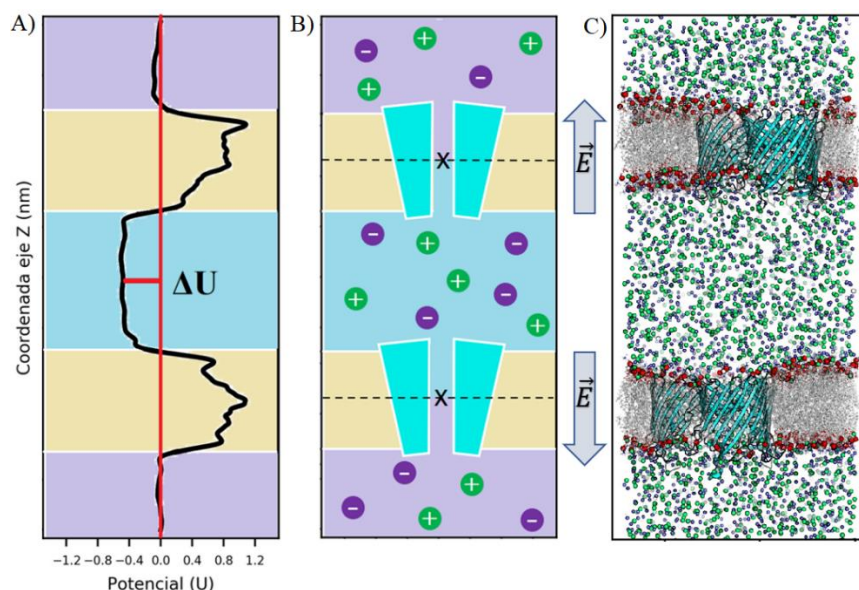
La importancia del estudio de la proteína PorB de la bacteria *Neisseria Meningitidis* reside en ser la segunda proteína de membrana con mayor presencia y con ello, esencial para su supervivencia. Esta bacteria es causante de la infección llamada meningitis meningocócica y afecta a las membranas que rodean la médula espinal y cerebro, causando la muerte en el 50% de los casos. [34]



**Figura 5.1:** Vista superior y lateral de la estructura PorB. (A) vista superior del canal PorB, (B) vista lateral del canal PorB.

Un método para el estudio de canales iónicos es la electrofisiología celular, la cual es una técnica experimental empleada en el estudio de canales iónicos enfocada a establecer relaciones entre los estados de conductividad de los canales y las condiciones fisiológicas (controladas). Generalmente, esto involucra determinar un gradiente electroquímico manteniendo una diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana celular.

Por su parte, la Electrofisiología Computacional busca establecer un paralelismo con la técnica experimental al intentar estimar, mediante simulaciones de dinámica molecular, el flujo de iones a través de canales iónicos impulsados por una diferencia de potencial transmembranal. Éste es causado y mantenido mediante un desequilibrio de cargas  $\Delta q$  a través de la membrana (Figura 5.2). El presente capítulo está enfocado al establecimiento de dicha técnica.



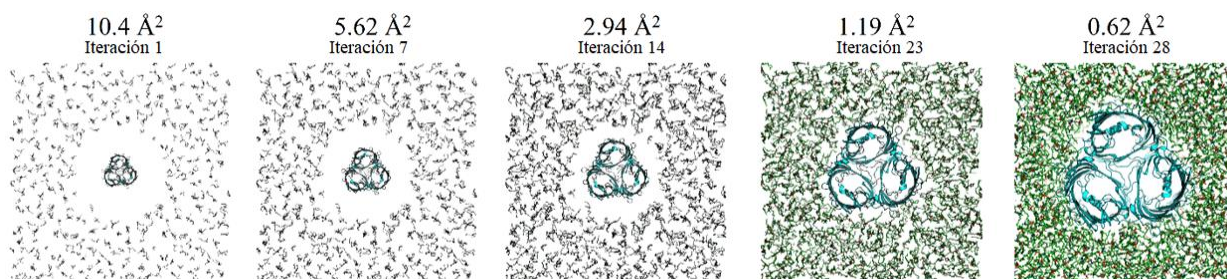
**Figura 5.2:** Esquemas del potencial asociado a un sistema de doble membrana. A) Gráfica del potencial asociado al sistema de doble membrana. B) Diagrama del sistema con doble membrana. C) Visualización del sistema de doble membrana.

El estudio de la proteína PorB mediante simulación de dinámica molecular se realizó en dos partes, la primera, toma el análisis de dos sistemas bajo igualdad de condiciones, uno con la estructura PorB silvestre (id: 3WI4) y otro con una estructura PorB mutada en G103K (id:3VZT). En ambos casos se empleó el protocolo de construcción de membrana establecido en el capítulo 4. Además, se realiza un análisis del comportamiento del radio del poro mediante el uso de la librería de Python "MDAnalysis" [32]. La segunda parte consiste en establecer el estudio de flujo de iones en la proteína PorB bajo el enfoque de la electrofisiología computacional [21].

## 5.1 Método Sistema Simple

### 5.1.1 Preparación de la estructura de simulación

El protocolo mediante el cual se realiza la inserción de la estructura PorB en la membrana de lípidos DPPC sigue los mismos pasos que la sección 4.1.1, el cual se basa en expandir la estructura de membrana e ir reduciendo sus dimensiones acompañado de la eliminación de los lípidos más próximos a la proteína, dando por resultado un modelo satisfactorio, listo para realizar la solvatación e ionización del sistema.



**Figura 4.3:** Reducción del sistema PorB-DPPC, pasando de un tamaño de  $10.4\text{\AA}^2$  a  $0.64\text{\AA}^2$ . Se muestra en color verde los lípidos DPPC y en color azul, PorB.

### 5.1.2 Solvatación e ionización

El método empleado es el indicado en la sección 4.1.2, el cual se basa en añadir solvente al sistema de manera ordinaria y eliminar las moléculas de agua que se encuentren en la región transmembrana, para posteriormente ionizar con una concentración de 400 mM de NaCl.

### 5.1.3 Equilibrado del sistema

Al igual que el capítulo anterior, este proceso se divide en dos etapas, aumentando el tiempo de equilibración del sistema, debido a las dimensiones del mismo.

**Tabla 5.1:** Parámetros para la simulación NVT.

<b>NVT – PorB</b>	
<b>Integrador</b>	md
<b>Número de pasos</b>	2000000
<b>Paso de tiempo</b>	0.001 ps
<b>Tiempo total</b>	2ns
<b>Acoplador de temperatura</b>	Berendsen
<b>Grupos sometidos al acoplamiento de temperatura</b>	Protein_DPPC, Sol_Ion
<b>Temperatura de referencia (K°)</b>	320

**Tabla 5.2:** Parámetros para la simulación NPT.

<b>NPT – PorB</b>	
<b>Integrador</b>	md
<b>Número de pasos</b>	2000000
<b>Paso de tiempo</b>	0.001 ps
<b>Tiempo total</b>	2ns
<b>Acoplador de temperatura</b>	Nose-Hoover
<b>Grupos sometidos al acoplamiento de temperatura</b>	Protein_DPPC, Sol_Ion
<b>Temperatura de referencia (K°)</b>	320
<b>Acoplador de presión</b>	Berendsen

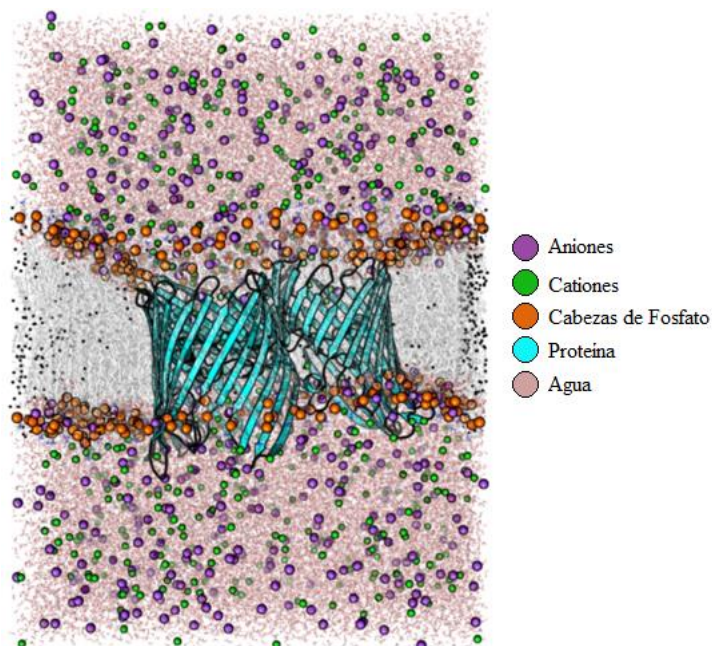
### 5.1.3 Producción y análisis

Al tratarse de un sistema de mayor volumen, implica una mayor cantidad de átomos, que se verá reflejado en el tiempo que dura la simulación, es en este punto donde es necesario recurrir al supercómputo. Además de aumentar el número de núcleos con que se realiza la simulación también se recurre a duplicar la diferencia de tiempo, con la finalidad de reducir el tiempo de simulación.

**Tabla 5.3:** Parámetros para la simulación de producción.

<b>PRODUCCIÓN – PorB</b>	
<b>Integrador</b>	md
<b>Número de pasos</b>	50000000
<b>Paso de tiempo</b>	0.002 ps
<b>Tiempo total</b>	100ns
<b>Acoplador de temperature</b>	Nose-Hoover
<b>Grupos sometidos al acoplamiento de temperatura</b>	Protein_DPPC, Sol_Ion
<b>Temperatura de referencia (K°)</b>	300
<b>Acoplador de presión</b>	Parrinello-Rahman

En este sistema el análisis se centró en el comportamiento del poro, realizando análisis de densidad (sección 4.2.2.3) y análisis del radio, empleando la librería de Python “MDAnalysis” [32].



**Figura 5.4:** Sistema PorB finalizado.

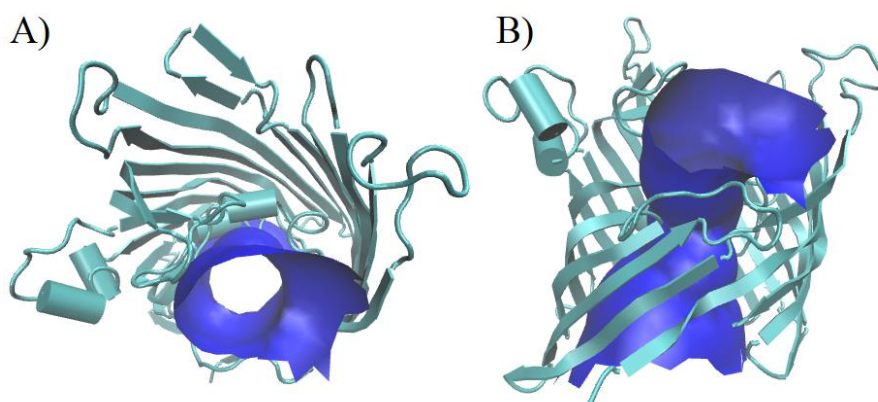
### 5.1.3.1 Análisis mediante MDAnalysis

MDAnalysis permite la lectura de trayectorias basadas en partículas y acceder a sus coordenadas a través de la librería de Python, Numpy, lo que otorga mayor flexibilidad para realizar tareas de análisis complejas.

El análisis en el radio del poro se realiza orientando la estructura sobre el eje z, calculando la distancia que existe entre los carbonos alfa que se encuentran más próximos al eje. Debido a la forma en la que se realiza el cálculo del radio y la geometría del trímero PorB (el poro no se encuentra en el centro de la estructura), no es posible realizar este análisis sobre la estructura PorB completa (trímero), sin embargo, es posible realizar el estudio por monómero.



Partiendo de la idea en que los monómeros de la estructura son idénticos y están sometidos a igualdad de condiciones es posible decir que se tiene el triple de muestreo de esta estructura. En consecuencia, la trayectoria de cada monómero se extrajo para ser alineada con respecto a una referencia (monómero 1) y posteriormente concatenar las trayectorias en un solo archivo formato PDB, del cual se obtuvo el radio mínimo con respecto al eje z.



**Figura 5.5:** Visualización del poro en PorB. Vista superior A) y lateral B) de la proteína PorB, con el área perteneciente al poro en color azul.

## 5.2 Resultados

El análisis de densidades para estos sistemas se realiza de manera homóloga al descrito en el Capítulo 4, enfocando dicho análisis al comportamiento de los iones y el solvente. Para describir el comportamiento del radio de los monómeros que conforman PorB se realiza el estudio empleando la librería para Python llamada “MDanalysis”.

Las características moleculares y computacionales de la simulación se muestran en las tablas 5.4 y 5.5.

**Tabla 5.4:** Características moleculares y átomos totales en cada sistema.

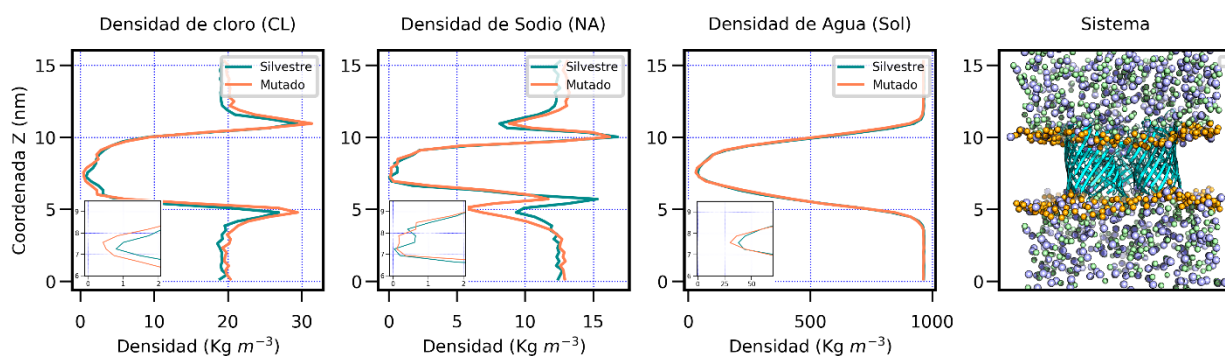
PorB	Proteína	Lípidos	Solvente	Cl -	Na +	Átomos
<b>Silvestre</b>	1	379	49009	529	532	211305
<b>Mutado</b>	1	372	48885	559	529	211439

**Tabla 5.5:** Características computacionales de cada simulación.

Sistema	Núcleos	Procesador	ns/día	Tiempo (día)
PorB mutado	128	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	31.1	3.1
PorB silvestre	128	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	31,2	3,2

### 5.2.1 Densidades del sistema

Los resultados que se muestran en la figura 5.6, comparan el comportamiento de densidad en los sistemas con la proteína silvestre y mutada, donde es posible observar que en los tres casos (agua, cloro y sodio), la densidad nunca es cero, en comparación con los resultados que se muestran en la sección 4.2.2.3. Esto se debe a que la conformación de PorB permite el paso de iones y moléculas de agua a través de la membrana.

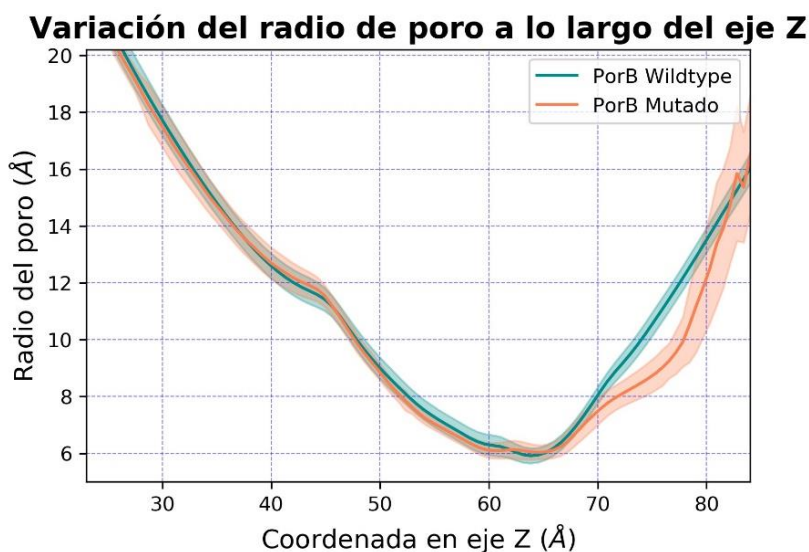
**Figura 5.6:** Densidad del agua, cloro y sodio en el sistema con PorB silvestre y mutado.

Además de observar el comportamiento transmembranal de los iones, se observan picos en su densidad que describen su acumulación en la membrana. Esto probablemente responde a una interacción con los fosfolípidos.

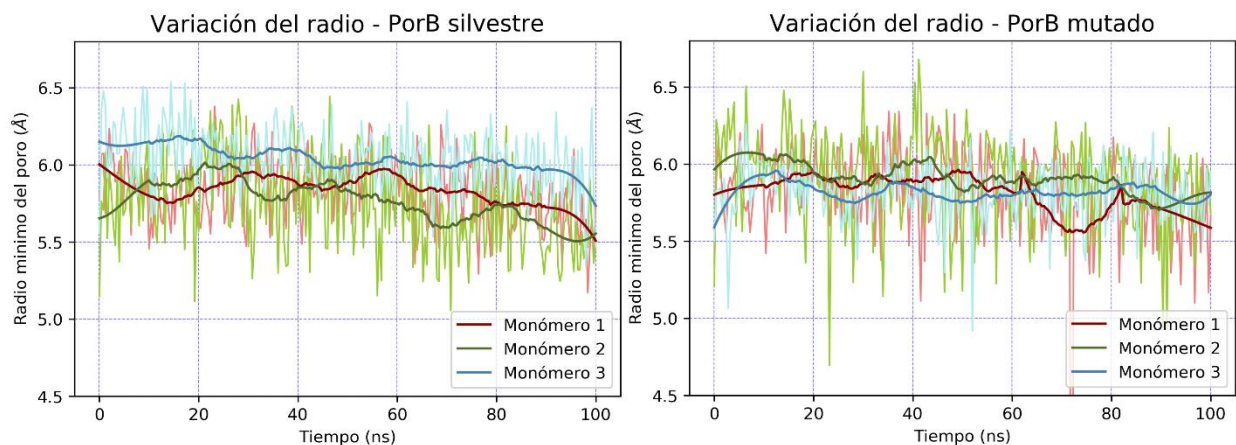
### 5.2.2 MDanalysis.

El análisis de estructura mediante MDanalysis otorga un estudio de la evolución temporal del radio del poro, tomando en cuenta los carbonos alfa, este proceso se realiza cuadro a cuadro de las trayectorias contenidas en formato PDB.

El primer análisis empleando MDanalysis, se realizó sobre una trayectoria conjunta. Ésta contiene, de forma secuencial, la trayectoria correspondiente a cada monómero en PorB, dejando un análisis con el triple de muestreo para un solo monómero. El análisis de radio del poro a lo largo de la coordenada Z muestra que en su región más se encuentra alrededor de los 5.8 Å para ambos sistemas (Figura 5.7). Esta región corresponde a la posición de los residuos R120 y R103 cuyo comportamiento es esencial en la permeación de PorB [21]. La poca variación respecto al tiempo, del radio mínimo alrededor del filtro de selectividad, muestra que la estructura se encuentra en una conformación abierta en cada uno de los monómeros (Figura 5.8)

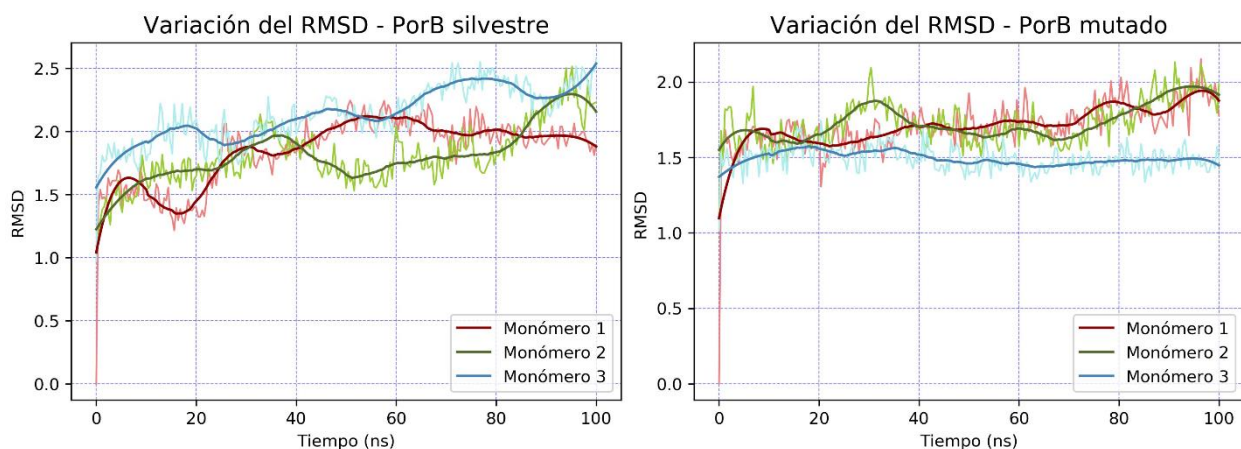


**Figura 5.7:** Radio del poro respecto a la coordenada Z.



**Figura 5.8:** Radio mínimo del poro del sistema con PorB silvestre y mutado, calculado para trayectorias individuales.

Al analizar bajo el RMSD (Figura 5.9), se observa que su valor no se mantiene “constante” en la mayoría de los monómeros, con excepción del monómero 3 de PorB mutado. Este comportamiento también se puede observar en la variación del radio del mismo monómero y sus valores promedio (Figura 5.8)(Tabla 5.6).



**Figura 5.9:** Variación de RMSD sistema con PorB silvestre y mutado, calculado para trayectorias individuales.

**Tabla 5.6:** Radio promedio de cada monómero de PorB silvestre y mutado.

PorB	Radio promedio	RMSD promedio
<b>Monómero 1 - Silvestre</b>	5.80 ± 0.38	1.84 ± 0.27
<b>Monómero 2 - Silvestre</b>	5.90 ± 0.32	1.80 ± 0.23
<b>Monómero 3 - Silvestre</b>	5.81 ± 0.18	2.13 ± 0.22
<b>Monómero 1 - Mutado</b>	5.83 ± 0.20	1.70 ± 0.17
<b>Monómero 2 - Mutado</b>	5.76 ± 0.20	1.73 ± 0.14
<b>Monómero 3 - Mutado</b>	6.03 ± 0.20	1.49 ± 0.08

### 5.2.3 Discusión

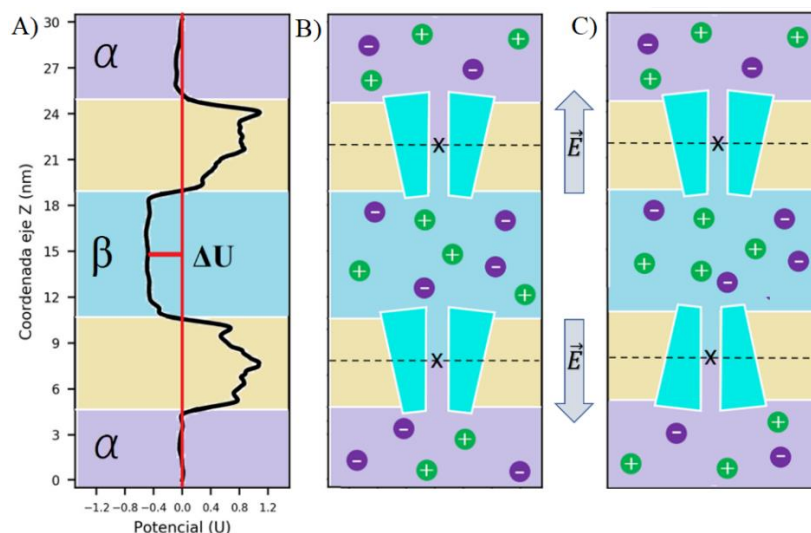
Analizar el comportamiento de la estructura a partir de densidades y MDanalysis otorga un buen acercamiento a la descripción del mismo, pero debido a la manera en la que se simula y las condiciones de periodicidad, no es posible tener una diferencia de potencial constante que promueva el flujo de iones, lo que daría un mejor acercamiento al comportamiento de la estructura.

Por otra parte, MDanalysis otorga una visión distinta del comportamiento estructural del poro, pues si bien, las variaciones del radio son mínimas en el caso de PorB, que se trata de una proteína cuya conformación es siempre abierta, este análisis toma relevancia para sistemas donde se busca la apertura del poro.

De forma general, es posible observar que la estructura mutada tiene mayor estabilidad que la estructura silvestre, como se muestra en el análisis de RMSD. En el caso del monómero 3 de la estructura mutada, cuyo comportamiento resalta, tanto en RMSD como en variación de radio, manteniéndose oscilando alrededor de un valor y no incrementando, como en los otros casos, lo cual, puede ser atribuido a una saturación iónica en el canal, que no permite la interacción del mismo con los iones en el sistema.

### 5.3 Método electrofisiología computacional

La electrofisiología computacional busca emular el flujo de iones a través del canal iónico a partir de la inducción del gradiente electroquímico, este proceso consta en duplicar el sistema proveniente de una simulación de dinámica molecular de proteína de membrana como la realizada en la primera mitad de este capítulo. La duplicación del sistema es requerida debido a que los sistemas de una sola membrana, al mantenerse las condiciones periódicas y de equilibrio en la caja de simulación, no permiten la existencia de un gradiente electroquímico que induzca el flujo de iones a través del canal. La duplicación del sistema sobre su eje Z permite emular el medio intracelular y extracelular (Figura 5.9-A). Con ello es posible inducir un gradiente electroquímico mediante la modificación del número de iones en la región  $\alpha$  y la región  $\beta$ . La diferencia de cargas  $\Delta q(t)$  otorga una diferencia de potencial  $\Delta U(t)$  que influencia el flujo de iones a través de las estructuras PorB embebidas en la membrana.



**Figura 5.9:** Esquemas de orientación del sistema de doble membrana. A) potencial en el sistema, B) Sistema de doble membrana simple, C) Sistema de doble membrana invertido.

El diseño del sistema de doble membrana tiene 2 posibles configuraciones, la primera de ellas toma al sistema primario, el cual es replicado y desplazado sobre su eje Z (Figura 5.9-B), con lo cual, si una proteína está sometida a un potencial, la proteína subsecuente se encuentra sometida al potencial inverso. La segunda configuración establece el sistema subsecuente rotado 180° sobre su eje X (Figura 5.9-C), con lo cual, ambas proteínas estarán sometidas al mismo potencial, teniendo el doble de muestreo. La configuración en la que se encuentran los sistemas de este capítulo será la primera.

El estudio de electrofisiología a través de GROMACS, requiere de la adición de nuevos parámetros en el archivo de entrada *.mdp*, a partir de los cuales es posible controlar el comportamiento del sistema (Figura 5.10). Al igual que se realizan modificaciones en el archivo *.mdp*, se realizan las respectivas modificaciones en los demás archivos de entrada, las cuales deben tener congruencia con el nuevo “sistema doble”.

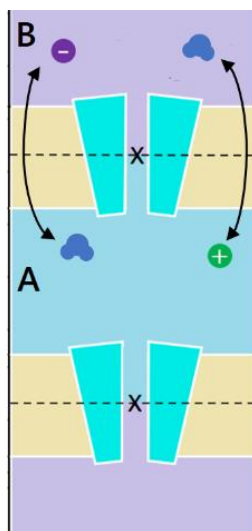
```

swapcoords      = Z           ; Posición de intercambio: no, X, Y, Z
swap-frequency  = 100         ; Frecuencia de intercambio
split-group0    = channel0    ; Define el límite del compartimento
split-group1    = channel1    ; Define el límite del otro compartimento
massw-split0    = no          ; ¿Utilizar centro ponderado de masa?
massw-split1    = no
solvent-group   = SOL         ; Grupo que contiene las moléculas de solvente
iontypes        = 2           ; Numero de diferentes tipos de iones
iontype0-name   = NA          ; Nombre del primer tipo de iones
iontype0-in-A   = --          ; Iones NA en A
iontype0-in-B   = --          ; Iones NA en B
iontype1-name   = CL          ; Nombre del segundo tipo de iones
iontype1-in-A   = --          ; Iones CL en A
iontype1-in-B   = --          ; Iones CL en B
coupl-steps     = 10          ; Promedio de pasos para intercambio
threshold       = 1           ; no intercambiar si swap < threshold
cyl0-r          = 5.0         ; Radio del cilindro para canal 1 (nm)
cyl0-up         = 0.75        ; Longitud superior del cilindro (nm)
cyl0-down       = 0.75        ; Longitud inferior del cilindro (nm)
cyl1-r          = 5.0         ; Radio del cilindro para canal 2 (nm)
cyl1-up         = 0.75        ; Longitud superior del cilindro (nm)
cyl1-down       = 0.75        ; Longitud inferior del cilindro (nm)

```

**Figura 5.10:** Parámetros correspondientes al estudio de electrofisiología computacional.

Inicialmente la inducción del potencial está limitado al tiempo en que el sistema encuentre la estabilidad. Sin embargo, es posible mantener una diferencia de potencial constante, y con ello un flujo igualmente constante, debido a la realización de un proceso de “intercambio” de cargas cual busca mantener la diferencia de cargas entre la región  $\alpha$  y  $\beta$  del sistema. Este proceso consiste en el intercambio de posición entre iones y moléculas de agua entre las regiones intra y extracelulares. Con ello se garantiza que no exista superposición de partículas y al realizar dicha rectificación en periodos de tiempo cortos, el potencial se mantiene constante y con ello el flujo de iones (Figura 5.11).



**Figura 5.11:** Esquema del mecanismo de intercambio ion-agua.

El análisis por electrofisiología computacional se lleva a cabo tomando como referencia el artículo *Computational Electrophysiology: The Molecular Dynamics of Ion Channel Permeation and Selectivity in Atomistic Detail* [21], con lo cual este análisis se orienta en la descripción y contraste en el comportamiento de PorB silvestre y mutado.



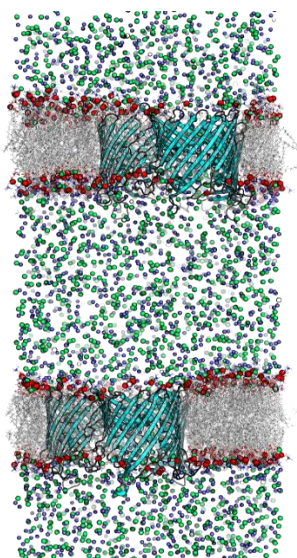
### 5.3.2 Producción y análisis

Para realizar el análisis por electrofisiología se emplearon sistemas bajo una concentración iónica de 1M (uno molar), con lo cual se busca aumentar en número de permeaciones. La producción del sistema de doble membrana no requiere de procesos de minimización de energía ni de equilibración, como en los sistemas anteriores, esto, al provenir de un sistema previamente sometido a una simulación de dinámica molecular.

La simulación bajo la electrofisiología computacional requiere de la actualización de índices, los cuales deben referir al doble de elementos.

**Tabla 5.7:** Características moleculares y átomos totales en cada sistema.

<b>PRODUCCIÓN – PorB doble</b>	
<b>Integrador</b>	md
<b>Número de pasos</b>	100000000
<b>Paso de tiempo</b>	0.002 ps
<b>Tiempo total</b>	200ns
<b>Acoplador de temperature</b>	Nose-Hoover
<b>Grupos sometidos al acoplamiento de temperatura</b>	Protein_DPPC, Sol_Ion
<b>Temperatura de referencia (K°)</b>	300
<b>Acoplador de presión</b>	Parrinello-Rahman



**Figura 5.12:** Sistema de doble membrana.

## 5.4 Resultados electrofisiología

Al igual que en el artículo de referencia [21], se emplean dos sistemas, el primero con la proteína PorB en estado silvestre y el segundo con la proteína PorB mutada, para ambos sistemas se realizan las simulaciones correspondientes a las diferencias de carga de 4 e, 8 e y 12 e, con lo cual se tienen 6 sistemas para analizar.

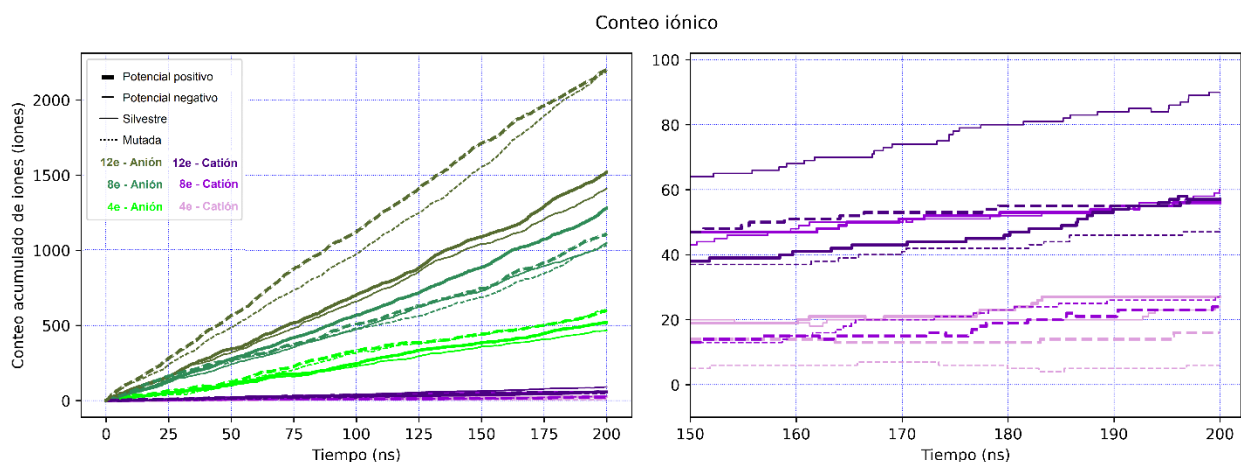
**Tabla 5.8:** Características moleculares y átomos totales en cada sistema.

PorB	Proteína	Lípidos	Solvente	Cl -	Na +	Átomos
<b>Silvestre</b>	2	758	100572	2644	2650	433444
<b>Mutado</b>	2	744	94598	2704	2644	416534

**Tabla 5.9:** Características computacionales de cada simulación.

Sistema	Diferencia de carga	Núcleos	Procesador	ns/día	Tiempo (día)
<b>PorB silvestre</b>	4	128	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	19.06	5.25
<b>PorB silvestre</b>	8	128	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	18.71	5.34
<b>PorB silvestre</b>	12	128	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	18.68	5.35
<b>PorB mutado</b>	4	128	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	18.92	5.29
<b>PorB mutado</b>	8	128	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	19.22	5.20
<b>PorB mutado</b>	12	128	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	19.25	5.19

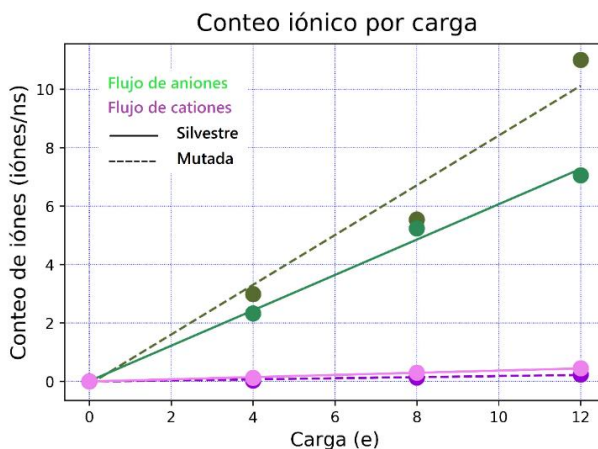
El estudio de electrofisiología computacional otorga los datos correspondientes al conteo de la cantidad de iones que permean el poro PorB en función del tiempo, este estudio se realiza para las tres diferencias de carga (4 e, 8 e y 12 e) en ambas estructuras PorB. (Figura 5.13).



**Figura 5.13:** Flujo de iones a través de los canales PorB silvestre (línea sin puntos) y mutado (línea con puntos).

### 5.4.1 Conductancia

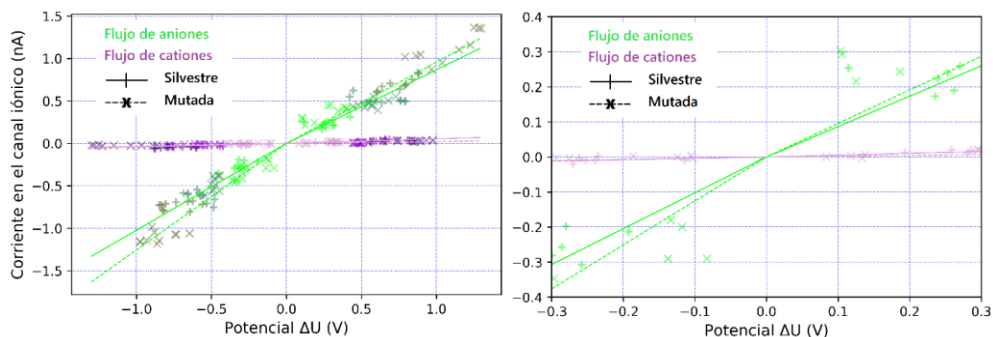
Al tomar el promedio de iones que cruzan la membrana al final de 200 ns de simulación para cada diferencia de carga se obtiene el flujo iónico neto, el cual muestra una clara diferencia de carga en el conteo iónico, situación que describe la relación lineal que existe entre el conteo iónico y la diferencia de carga (Figura 5.14).



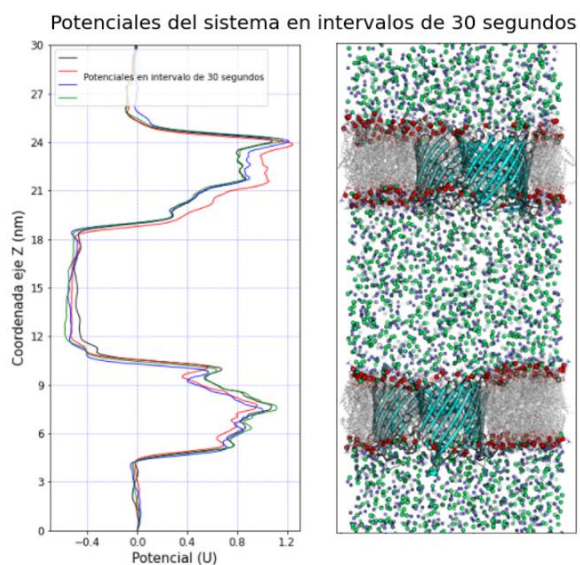
**Figura 5.14:** Cantidad de aniones y cationes que cruzan el canal PorB entre nano segundo (ns).

El resultado de mayor relevancia es el cálculo de la conductancia ( $\Lambda = I/\Delta U$ ) para cada estructura PorB, la cual se tiene a partir de la regresión lineal que se traza de los datos obtenidos por la cantidad de iones que permean en la membrana y la diferencia potencial asociada al sistema para el mismo intervalo de tiempo en polarización positiva y negativa, situación que se realiza con 10 muestreos de 30 ns para cada diferencia de 4 e, 8 e y 12 e, del PorB-silvestre y PorB-mutado.

Dicha diferencia de potencial se obtiene por un análisis de potencial con gromacs, en el cual, no se consideran las estructuras de agua. Del resultado de este análisis, se puede obtener el potencial que existe en el centro y los extremos del sistema y con ello determinar la diferencia de potencial (Figura 5.16).



**Figura 5.15:** Corriente iónica en función de  $\Delta U$  para intervalos de 30ns.



**Figura 5.16:** Corriente iónica en función de  $\Delta U$  para intervalos de 30ns.

**Tabla 5.10:** Conductancia de aniones y cationes para la polarización negativa y positiva con la estructura PorB mutada y silvestre.

Estructura	Conductancia CL polarización negativa (nS)	Conductancia CL polarización positiva (nS)	Conductancia NA polarización negativa (nS)	Conductancia NA polarización positiva (nS)
<b>Silvestre</b>	9.846	8.495	0.538	0.455
<b>Mutado</b>	12.191	9.879	0.312	0.218

**Tabla 5.11:** Conductancia de aniones y cationes para la polarización negativa y positiva con la estructura PorB mutada y silvestre, calculados en [21].

Estructura	Conductancia CL polarización negativa (nS)	Conductancia CL polarización positiva (nS)	Conductancia NA polarización negativa (nS)	Conductancia NA polarización positiva (nS)
<b>Silvestre</b>	2.7	2.3	2	2.5
<b>Mutado</b>	12.3	5.9	2	2.4

Los resultados en la tabla 5.10, muestran una clara diferencia en el comportamiento de ambas estructuras, donde se aprecia el efecto que la mutación realizada sobre la estructura PorB es relevante en el su comportamiento, el cual aumenta la conductancia de aniones y disminuye la conductancia de cationes, sin embargo, al comparar estos resultados con los que se reportan en el artículo de referencia (Tabla 5.11), se muestra una gran diferencia, situación que puede deberse a múltiples factores derivados de la diferencia de membranas.

#### 5.4.2 Discusión

Por lo mostrado en esta sección, el análisis por electrofisiología computacional otorga un acercamiento sustancial hacia la comprensión del comportamiento de las proteínas de membrana, pues si bien los resultados no se encuentran cuantitativamente cerca de los reportados, teniendo un acercamiento del 25% respecto al valor reportado, es claro que existe diferencia cualitativa en el comportamiento de ambas estructuras que corresponden con la evidencia experimental.

Un factor que parece tener mucha relevancia en el flujo de iones, es la membrana empleada en las simulaciones, la cual en esta tesis es DPPC, una estructura diferente en conformación a POPC, que es la estructura empleada en el artículo de referencia [21]. La conformación de la membrana toma relevancia al tratarse de un elemento que promueve el potencial electroquímico, al acumular cargas (iones) en su superficie.

# Capítulo 6

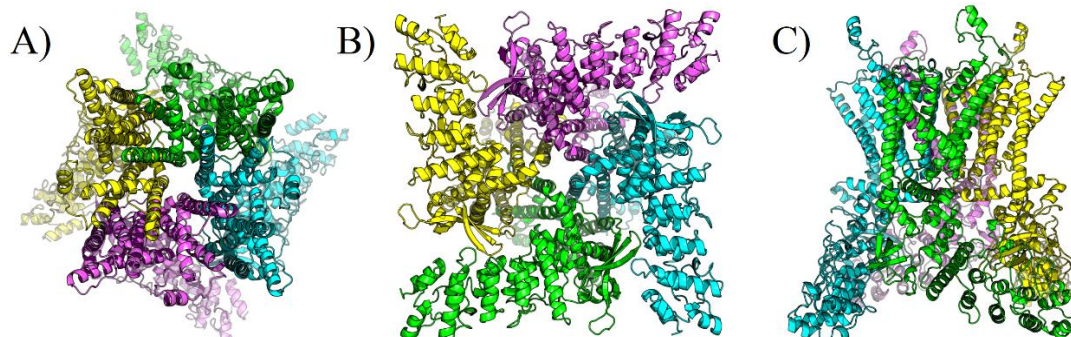
## **DINÁMICA MOLECULAR DEL CANAL IÓNICO TRPV4, INTERACCIÓN CON EL LÍPIDO PIP2 y EFECTOS POR MUTACIÓN**

Para sobrevivir, los organismos se han adaptado para detectar acontecimientos en el entorno que los rodea, para lo cual, el grupo de proteínas de membrana llamadas canales de potencial receptor transitorio (TRP por sus siglas en inglés) juegan un papel clave en la interpretación de los estímulos [30].

Según la homología de secuencia, la superfamilia de canales TRP de mamíferos se clasifica en seis subfamilias: TRPC (canónica), TRPV (vanilloide), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPML (mucolipina) y TRPP (poliquístico).

La subfamilia Vaniloide TRP (TRPV) ha sido ampliamente estudiada debido a la sensibilidad al calor. En general, esta superfamilia de canales está involucrada en una amplia gama de procesos fisiológicos y fisiopatológicos que hacen que el estudio de estos canales sea imprescindible para nuestra comprensión de la bioquímica subcelular [30].

De acuerdo con datos presentados por O. F. Harraz et al. [31], el Fosfatidilinositol-4-5-bifosfatol (PIP2) actúa como un inhibidor de la actividad del canal TRPV4. Sin embargo, el mecanismo molecular de dicha inhibición es aún desconocido.



**Figura 6.1:** Vista superior y lateral de la estructura PorB. Vista superior (A), inferior (B) y lateral (C) del tetrámero TRPV4.

En el presente capítulo se describe un estudio exploratorio de la interacción PIP2 con TRPV4. Para ello se empleó la estructura de criomicroscopía electrónica del canal de *Xenopus Tropicalis* (pdb: 6BBJ). Se estableció un estudio comparativo, empleado simulaciones DM, bajo tres condiciones:

- Canal TRPV4 silvestre libre de ligando.
- Canal TRPV4 silvestre en complejo con moléculas de PIP2.
- Canal TRPV4 mutado en complejo con moléculas de PIP2.

Los sistemas simulados fueron embebidos en una membrana de DPPC, que es la estructura empleada en todo este trabajo. Los sistemas mutados consistieron en 3 modificaciones puntuales; R742K, R742D y R742C. Por ende, el estudio comparativo consto de 5 sistemas a los que se les realizaron simulaciones de dinámica molecular con igualdad de condiciones (Tabla 6.1).

**Tabla 6.1:** Características de ionización y presencia de lípidos para cada sistema.

Residuo	Lípidos	Iones +	Iones -	Concentración iónica
<b>Arginina</b>	DPPC	Na-Cs	Cl	400 mM
<b>Arginina</b>	DPPC-PIP2	Na-Cs	Cl	400 mM
<b>Lisina</b>	DPPC-PIP2	Na-Cs	Cl	400 mM
<b>Cisteína</b>	DPPC-PIP2	Na-Cs	Cl	400 mM
<b>Ácido aspártico</b>	DPPC-PIP2	Na-Cs	Cl	400 mM

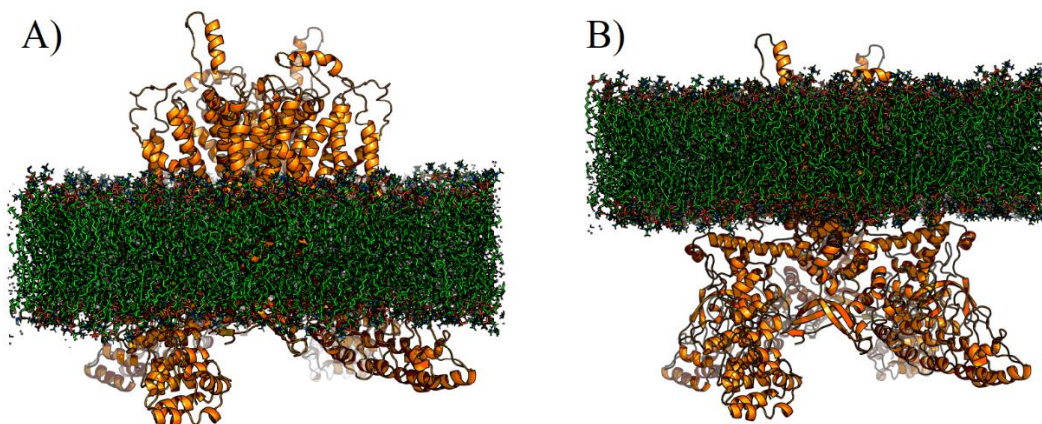
## 6.1 Establecimiento de los sistemas a simular

### 6.1.1 Canal TRPV4 silvestre libre de ligando

Al realizar la dinámica molecular para proteínas de membrana cuya región transmembrana no corresponde al centro geométrico de la estructura, como en el caso de PorB en el capítulo 5, se requiere realizar ajustes en la posición la membrana (Figura 6.2), además de correcciones en el tamaño de la caja a través de la coordenada Z. La proteína fue embebida en una membrana de DPPC siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 4 (Figura 6.3). Debido a que el canal TRPV4 presenta afinidad por iones de Cesio, estos le fueron agregados al sistema como parte del búfer de solvatación (200 mM con 50 % Cloro, 25 % Cesio y 25 % Sodio), en busca de inducir activación en su filtro de selectividad (Figura 6.4). La tabla 6.2 resume la composición final del sistema.

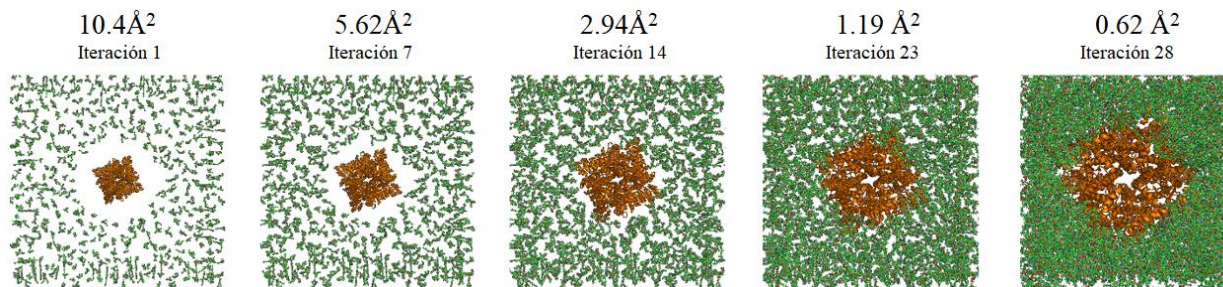
**Tabla 6.2:** Características moleculares y átomos totales de cada sistema de simulación.

Campo de fuerza	Proteína	Lípidos	Solvente	Cl -	Na +	Cs +	Átomos
AMBER99SB-ILDN	1	569	78176	902	447	447	351898

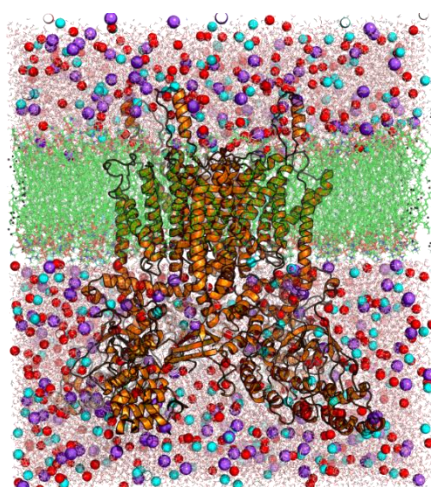


**Figura 6.2:** Superposición correcta e incorrecta del sistema TRPV4-DPPC. (A) Sistema unido a partir del centro geométrico de la membrana y TRPV4 (montaje incorrecto). (B) Sistema unido sobre la región transmembrana (montaje correcto).





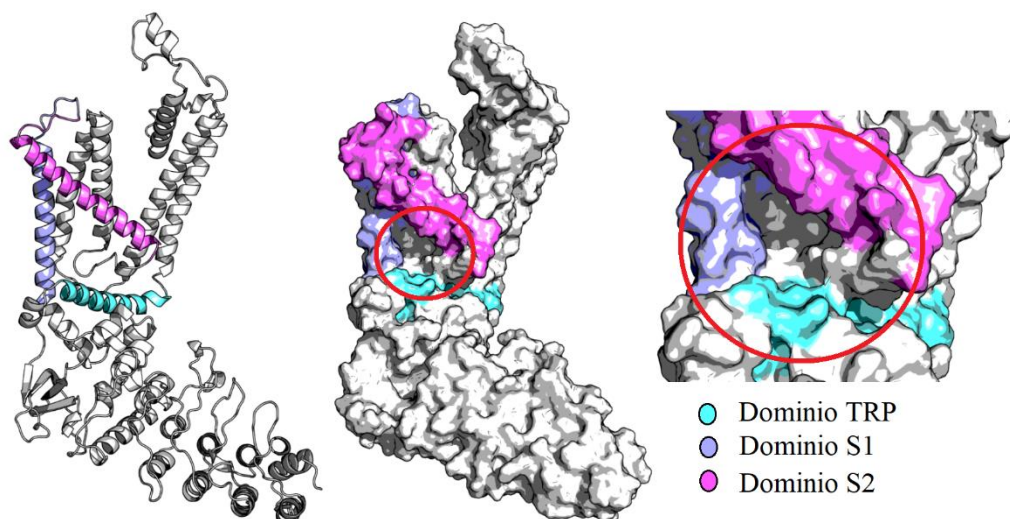
**Figura 6.3:** Progreso de compactación y eliminación de lípidos debido al método de “expansión y reducción”.



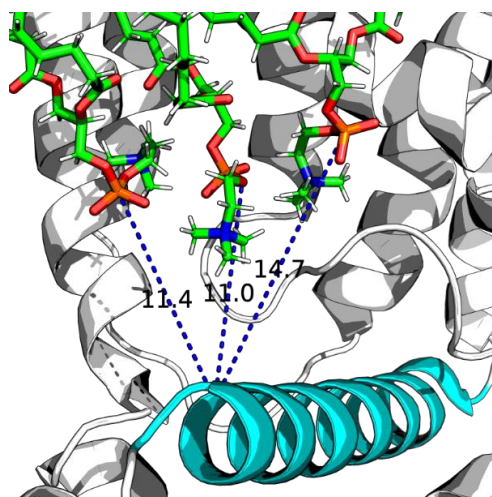
**Figura 6.4:** Sistema TRPV4-DPPC, solvatado y ionizado, previo a ser equilibrado.

### 6.1.2 Canal TRPV4 silvestre en complejo con moléculas de PIP2

La región entre los dominios TRP, S1 y S2, (Figura 6.5) fue seleccionada como posible sitio de unión de la molécula PIP2 con información otorgada por la Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir del Instituto de Fisiología Celular UNAM. La estructura inicial del complejo TRPV4-PIP2 fue generada, a partir de la estructura silvestre libre de ligando, por substitución directa de 4 moléculas de DPPC (una por monómero) por 4 moléculas de PIP2. En concreto, la molécula DPPC seleccionada para ser substituida por una molécula de PIP2 fue aquella cuyo grupo fosfato estuviera más cercano al extremo N-terminal de la hélice TRP (Figura 6.6). Los resultados descritos en la sección 6.3.1 abordan con mayor detalle el proceso de selección.



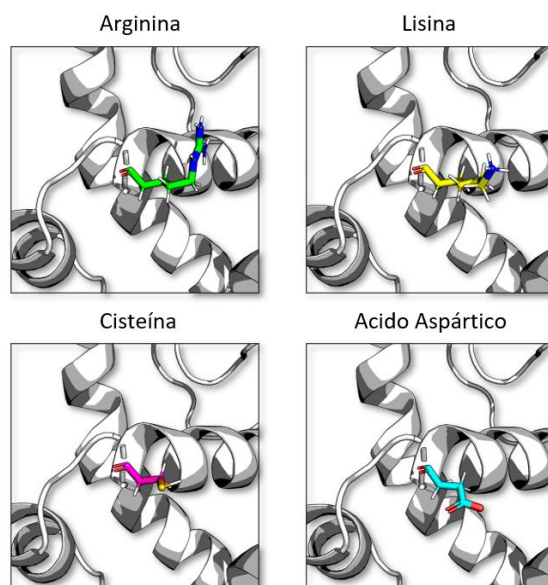
**Figura 6.5:** Ubicación de la cavidad entre los dominios TRP, S1 y S2.



**Figura 6.6:** Distancia en angstroms entre los residuos 742 y los fosfatos en DPPC.

### 6.1.2 Canal TRPV4 mutado en complejo con moléculas de PIP2

Con el fin de evaluar la participación del residuo Arg742 en la estabilidad de complejo TRPV4-PIP2, se realizó la mutación puntual R742X. El cambio de coordenadas asociado a esta mutación fue realizado con el software PyMOL 2.4 [33], en su versión de uso libre, teniendo como base el complejo silvestre descrito en la subsección anterior.



**Figura 6.7:** Mutaciones realizadas sobre el residuo 742.

## 6.2 Parámetros de simulación

Los parámetros de las simulaciones asociados al ajuste de los valores de temperatura y presión de los sistemas simulados se encuentran descritos en las tablas 6.3 y 6.4. Similarmente, los parámetros asociados a las corridas de producción se encuentran resumidos en la tabla 6.5. En el capítulo 4 es posible encontrar una descripción más detallada de estos procedimientos y parámetros. Este protocolo fue implementado, en una primera instancia, para el sistema TRPV4 silvestre libre de ligando con el fin de generar los modelos silvestre y mutado del canal TRPV4 en complejo con PIP2 (Sección 6.1 y 6.3.1). Este mismo protocolo fue implementado en todos los sistemas descritos en la Tabla 6.1.

Las características del equilibrado y producción de estos sistemas se mantienen consistentes con los parámetros empleados en el capítulo 5, teniendo como diferencia la adición del grupo PIP al grupo conformado por Protein\_DPPC cuando el residuo PIP2 está presente.

Tabla 6.3: Parámetros para la simulación NVT.

<b>NVT – TRPV4</b>	
<b>Integrador</b>	md
<b>Número de pasos</b>	2000000
<b>Paso de tiempo</b>	0.001 ps
<b>Tiempo total</b>	2ns
<b>Acoplador de temperatura</b>	Berendsen
<b>Grupos sometidos al acoplamiento de temperatura</b>	Protein_Membrana_PIP, Sol_Ion
<b>Temperatura de referencia (K°)</b>	300

Tabla 6.4: Parámetros para la simulación NPT.

<b>NPT – TRPV4</b>	
<b>Integrador</b>	md
<b>Número de pasos</b>	2000000
<b>Paso de tiempo</b>	0.001 ps
<b>Tiempo total</b>	2ns
<b>Acoplador de temperatura</b>	Nose-Hoover
<b>Grupos sometidos al acoplamiento de temperatura</b>	Protein_Membrana_PIP, Sol_Ion
<b>Temperatura de referencia (K°)</b>	300
<b>Acoplador de presión</b>	Berendsen

Tabla 6.5: Parámetros para la simulación de producción.

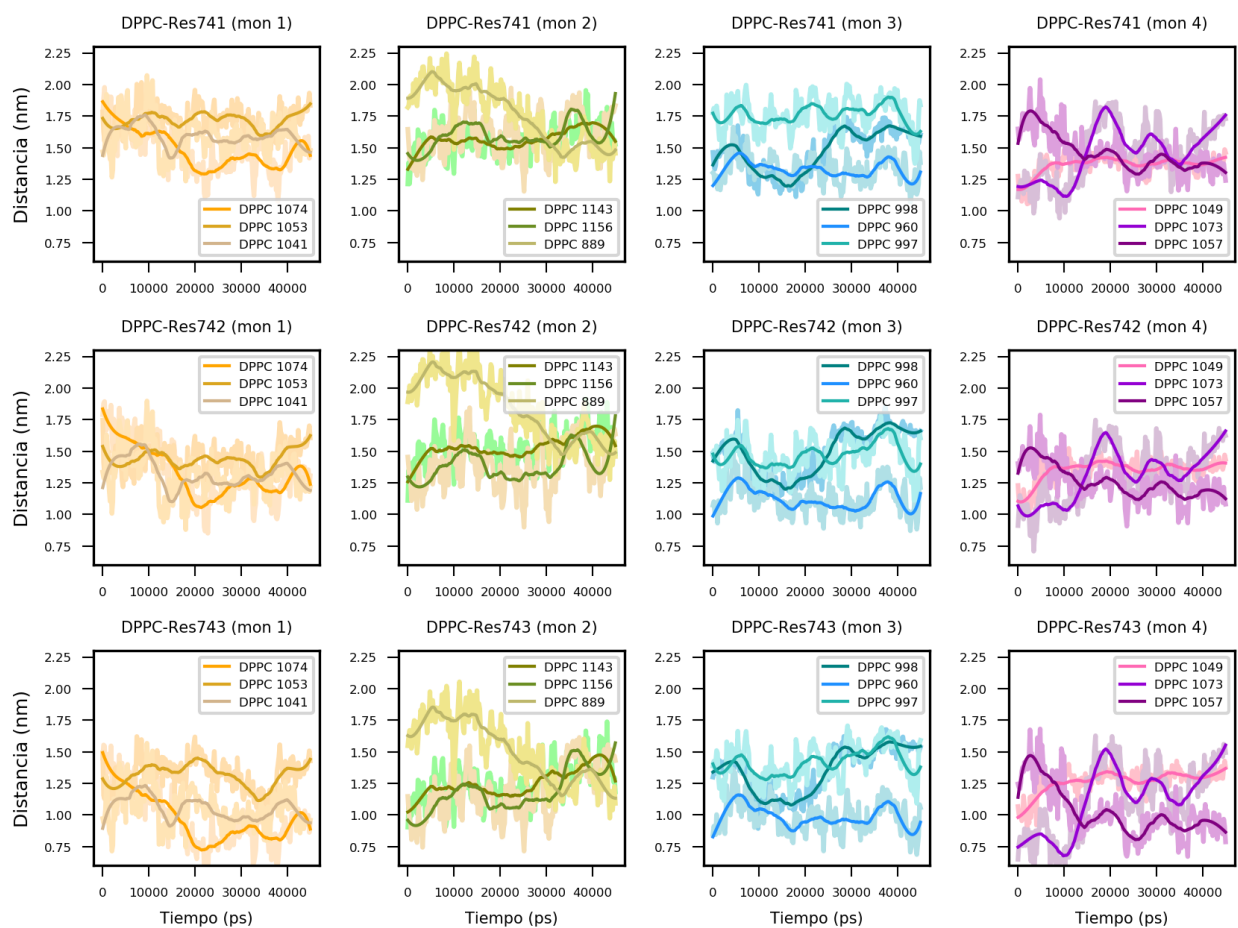
<b>PRODUCCIÓN – TRPV4</b>	
<b>Integrador</b>	md
<b>Número de pasos</b>	25000000
<b>Paso de tiempo</b>	0.002 ps
<b>Tiempo total</b>	50ns
<b>Acoplador de temperatura</b>	Nose-Hoover
<b>Grupos sometidos al acoplamiento de temperatura</b>	Protein_Membrana_PIP, Sol_Ion
<b>Temperatura de referencia (K°)</b>	300
<b>Acoplador de presión</b>	Parrinello-Rahman

## 6.3 Resultados

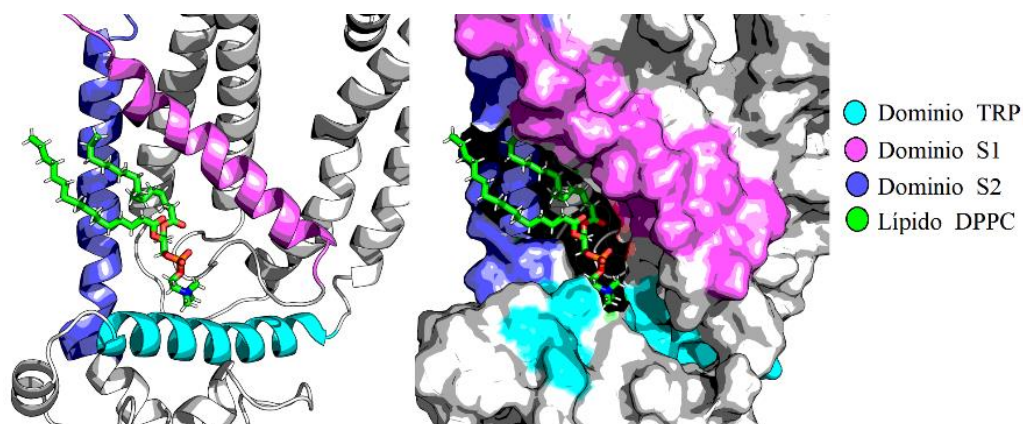
### 6.3.1 Selección y sustitución de moléculas DPPC

Esta sección describe el proceso de selección de moléculas de DPPC embebidas en la cavidad formada entre los dominios S1, S2 y TRP. Recordando que el objetivo de dicha selección es la de realizar una sustitución por moléculas de PIP2 y así generar una estructura del complejo

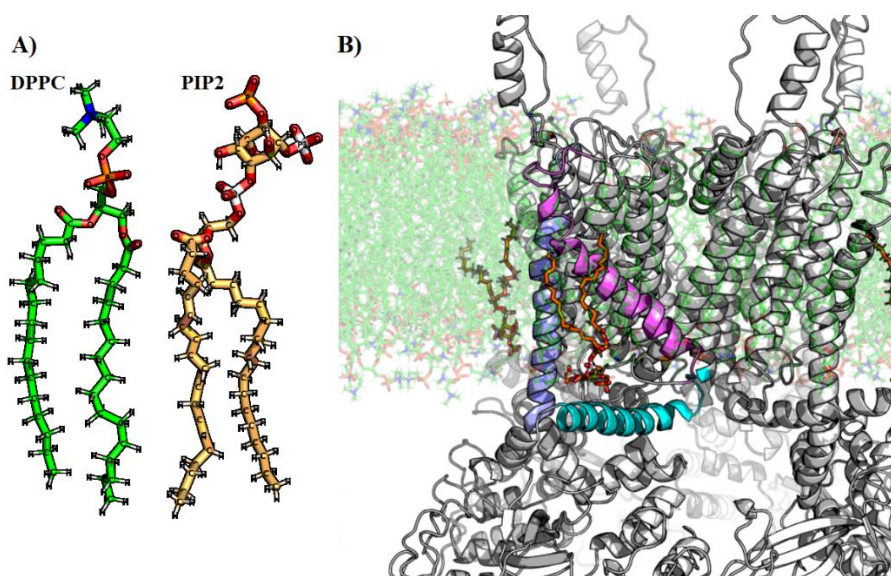
TRPV4-PIP2. Como criterio para evaluar la estabilidad y cercanía de una molécula de DPPC en la cavidad blanco, se consideró la distancia de los grupos fosfato de moléculas de DPPC a los carbonos alfa de residuos E741, R742 y S743, localizados en la sección N-terminal del dominio TRP (Figura 6.8). En general, se observa un comportamiento consistente, para cada uno de los monómeros, respecto a que molécula de DPPC que se encuentra más cercana a la sección N-terminal del dominio TRP. Así, por ejemplo, en el monómero 1 se observa que la molécula de DPPC-1074 es la que menor distancia mantiene respecto al residuos monitoreados (Figura 6.8, paneles a la izquierda). Bajo este análisis se seleccionaron a las moléculas 1074 para el primer monómero, 889 para el segundo monómero, 960 para el tercer monómero y 1057 para el cuarto monómero (Figura 6.9). Estas moléculas fueron substituidas empleando el programa de visualización molecular Pymol, en el último cuadro de la simulación, por moléculas de PIP2 para dar paso al complejo TRPV4-PIP2 (Figura 6.10). Mientras que la estructura DPPC tiene una carga neutra, PIP2 cuenta con carga negativa, esta característica permite intuir que la interacción con el dominio TRP se da a través del residuo cuya carga sea positiva.



**Figura 6.8:** Variación de la distancia entre los residuos E741, R742 y S743 de cada monómero (fila superior a la inferior) respecto a los lípidos DPPC cercanos (se muestran en cada gráfica), mostrado para cada monómero (columna izquierda a derecha).



**Figura 6.9:** Lípido DPPC embebido en la cavidad que se encuentra entre los dominios S1, S2 y TRP.



**Figura 6.10:** A) Estructuras DPPC y PIP2. B) Visualización lateral del sistema, dando énfasis a los dominios S1, S2 y TRP, además del lípido PIP2.

### 6.3.2 Mutaciones puntuales en canal TRPV4

De los tres residuos que se consideraron en la región interacción propuesta (G741, R742 y S743), el residuo R742 cumple con la característica de tener carga positiva. Lo cual lo hace un candidato para sustentar interacción electrostática con la carga negativa en PIP2. En consecuencia, se realizan las mutaciones R742K, R742D y R742C con ayuda del software pymol [33].

### 6.4 Resultados de la interacción con PIP2 y mutaciones

Cada sistema fue simulado bajo igualdad de condiciones, en el equilibrado y la producción (Sección 6.2). Un resumen de la composición de los sistemas evaluados es presentado en la tabla 6.6 y las características computacionales para la simulación de cada sistema en la tabla 6.7. Primero se presentan los resultados del análisis de la distancia entre PIP2 y el residuo 742. Posteriormente,

se aborda el análisis del radio del canal. Esto con el fin de evaluar una posible relación entre la presencia del lípido PIP2 con la apertura del poro.

**Tabla 6.6:** Características moleculares y átomos totales de cada sistema de simulación.

Residuo y lípidos	Proteína	DPPC	PIP2	Solvente	Cl -	Na +	Cs +	Átomos
<b>Arginina-DPPC</b>	1	569	////	71632	836	418	430	331634
<b>Arginina-DPPC-PIP2</b>	1	565	4	71632	836	418	430	332230
<b>Lisina-DPPC-PIP2</b>	1	565	4	78318	894	447	459	352396
<b>Cisteina-DPPC-PIP2</b>	1	565	4	78279	894	447	463	352239
<b>Ácido aspártico-DPPC-PIP2</b>	1	565	4	78211	894	447	467	352043

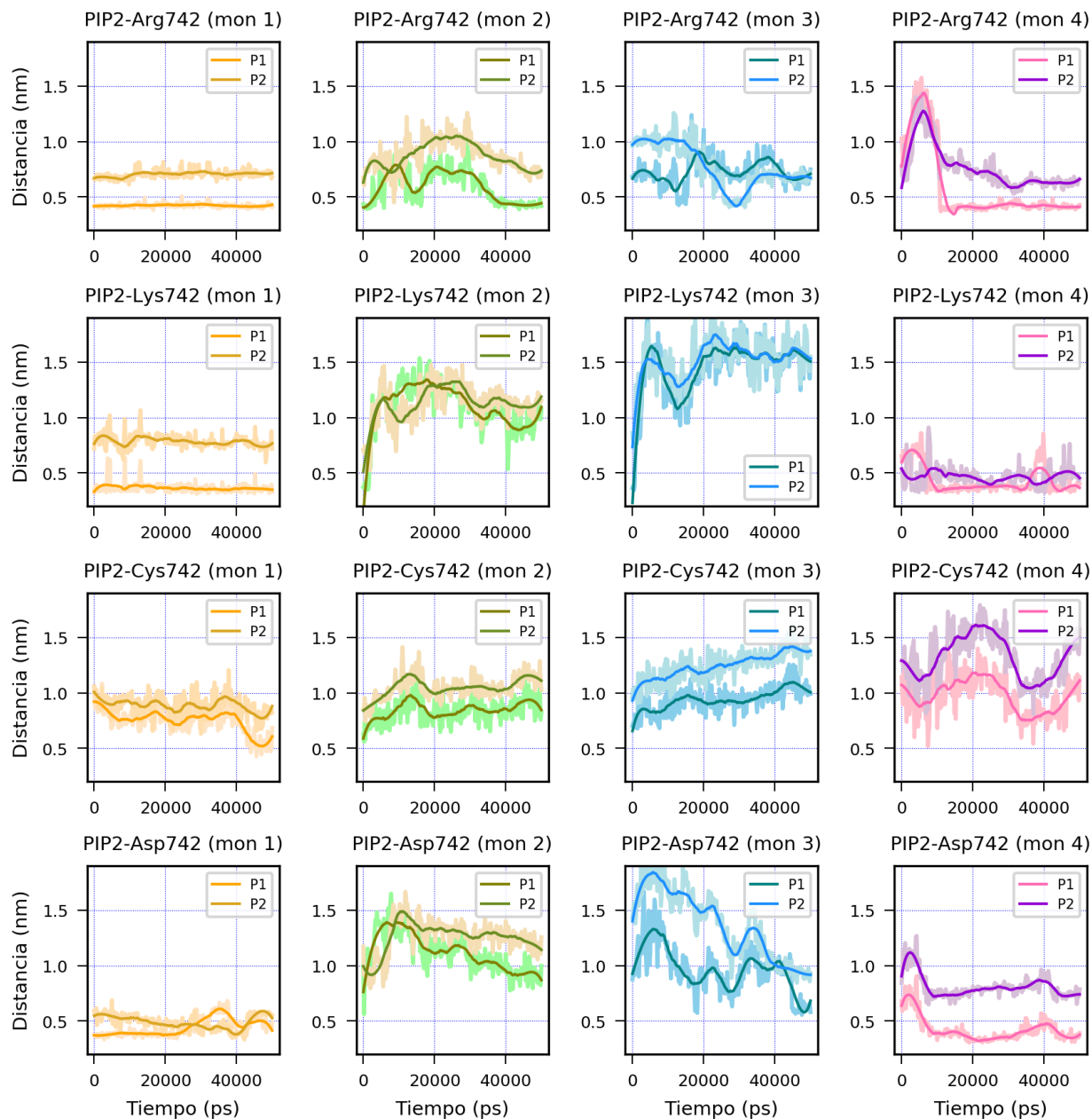
**Tabla 6.7:** Características moleculares y átomos totales de cada sistema de simulación.

Sistema	Núcleos	Procesador	ns/día	Tiempo (día)
<b>TRPV4</b>	128	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	10,03	10
<b>TRPV4-pip2</b>	128	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	10,75	9.3
<b>TRPV4-lys</b>	64	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	5,04	19.8
<b>TRPV4-cys</b>	64	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	5,297	18.9
<b>TRPV4-asp</b>	64	Intel Xeon, CPU E5-2650 - 2.00GHz	5,6	17.9

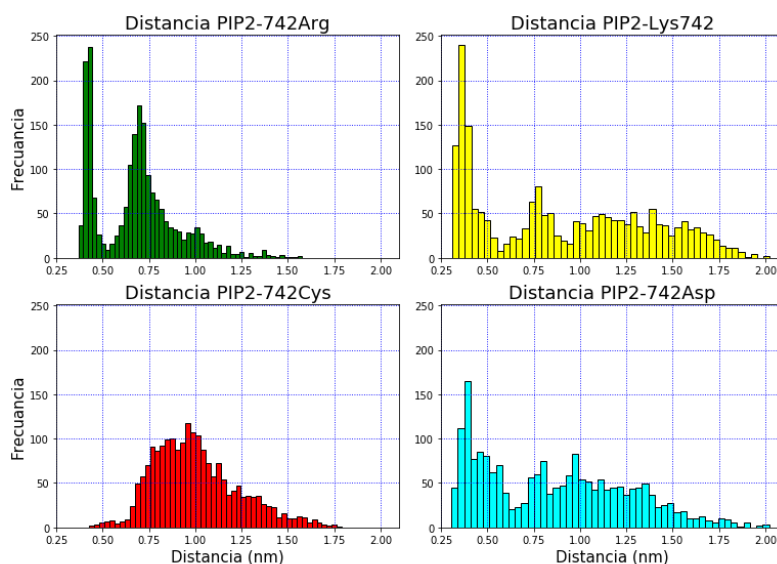
#### 6.4.1 Distancia entre el residuo 742 y los fosfatos de PIP2

La distancia entre residuo 742 y cada uno de los dos fosfatos de PIP2, para cada uno de los monómeros, muestra la influencia de interacciones electrostáticas (Figura 6.10). La distancia mínima que se observa, es de 0.42 nm y es observada principalmente en los sistemas con residuos con carga positiva en la posición 742 (Arg y Lys). En contraste, en las simulaciones con D472 y C742 la presencia de esta distancia mínima es menos constante. Este comportamiento es más evidente si se analiza el histograma de distancias indistintamente del grupo fosfato y monómero en cuestión (Figura 6.11). Sin embargo, es importante mencionar que la interacción de PIP2 resulta más estable de lo inicialmente pensado.





**Figura 6.11:** Variación de la distancia entre el residuo R742 de cada monómero (fila superior a la inferior) respecto a los fosfatos en la cabeza de PIP2 (se muestran en cada gráfica), mostrado para cada monómero (columna izquierda a derecha).

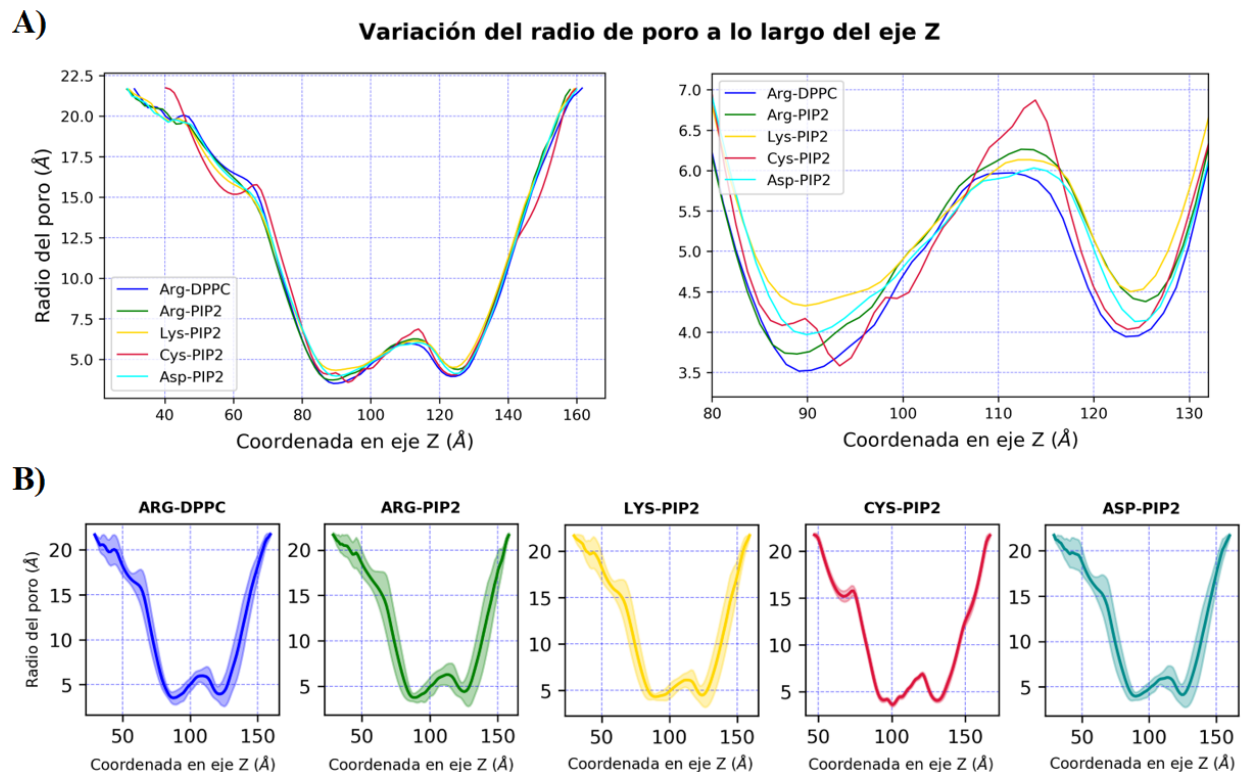


**Figura 6.12:** Histogramas (50 bins) de la variación temporal de la distancia en nanómetros (nm) entre los fosfatos en la cabeza de PIP2 y el residuo 742.

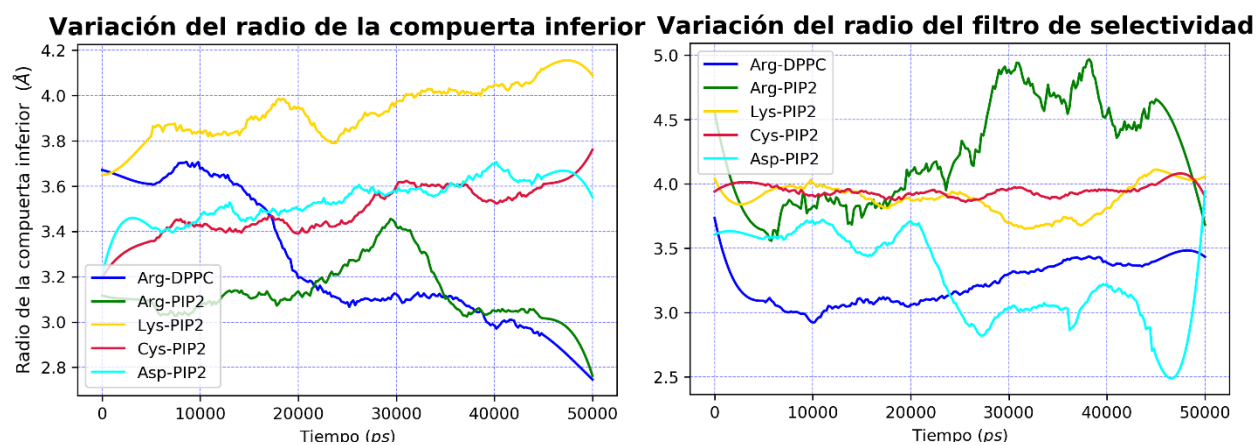
Al visualizar los histogramas de la Figura 6.12, los cuales toman todos los valores de distancia de la Figura 6.11, en este caso, divididos por la mutante en R742, se observa que las distancias de mayor frecuencia oscilan alrededor de los mismos valores (0.42 nm) cuando R742 es un residuo con carga, sin embargo, cuando R742 tiene carga positiva (arginina y lisina) la frecuencia es mayor que en el caso de contar con carga negativa (ácido aspártico), esta situación se debe directamente a que PIP2 cuenta con carga negativa, por lo cual es completamente razonable que la distancia de mayor frecuencia encuentre valores más grandes cuando R742 cuenta con carga positiva, mientras que para la mutante por cisteína la distancia con mayor frecuencia se encuentra alrededor de 1 nm, situación por la cual se concluye que la interacción electrostática entre TRPV4 y PIP2 se encuentra presente en los sistemas.

### 6.4.2 Variación del tamaño del poro

Similar al estudio realizado en la sección 5.1.3.1, aquí se realiza el estudio del radio del poro canal TRPV4 en relación con la presencia la molécula PIP2 y las mutaciones en la posición 742 (Figura 6.13 A). Es importante notar que el canal TRPV4 presenta dos secciones estrechas: I) el filtro de selectividad como primer punto de acceso desde el exterior celular, y II) la compuerta interior que conduce al medio intracelular. En este contexto, resulta interesante notar que el sistema silvestre sin ligando (Arg-DPPC) es el que muestra los menores radios de apertura, en ambas regiones, entre los sistemas analizados. En contraste, la presencia de la molécula PIP2 en sistema silvestre (Arg-PIP2) muestra un incremento en la apertura del poro de 0.5 Å en la región del filtro de selectividad con respecto al sistema sin molécula PIP2. Resulta interesante observar que la mutante con R742K parece ser la más receptiva a la presencia de la molécula PIP2, dado que registra una radio de poro de aproximadamente 1 Å y 0.5 Å, con respecto Arg-DPPC, en las regiones de compuerta y filtro de selectividad respectivamente. Los radios de apertura en mutantes R742D y R742C fueron menos receptivos a la presencia de la molécula PIP2. Es importante mencionar que mutante R724C presento una menor variación en la apertura del poro con respecto a los demás sistemas analizados (Figura 6.13 B). Por otra parte, al observar la variación temporal para el radio mínimo del filtro de selectividad y compuerta inferior es posible distinguir que existen similitudes en el comportamiento de los sistemas (Figura 6.14). En resumen, este análisis resalta la relevancia del residuo 742, dado que es la única modificación que se realiza en los sistemas que interactúan con PIP2, en el comportamiento del radio del filtro de selectividad y compuerta inferior.



**Figura 6.13:** Variación de radio del poro de PorB, para cada mutación en el residuo 742. A) Superposición de los radios (curva promedio) del poro respecto al eje Z, calculados para cada sistema. B) Radio del poro respecto al eje Z (curva promedio y desviación estándar en sombra) para cada sistema en estudio.



**Figura 6.14:** Radio de la compuerta inferior y filtro de selectividad.

### 6.4.3 Correlación de variables

Con el fin de analizar los datos desde una perspectiva más amplia, en esta sección se realiza una correlación entre variables obtenidas a partir de las simulaciones de los sistemas bajo estudio (Tabla 6.6).

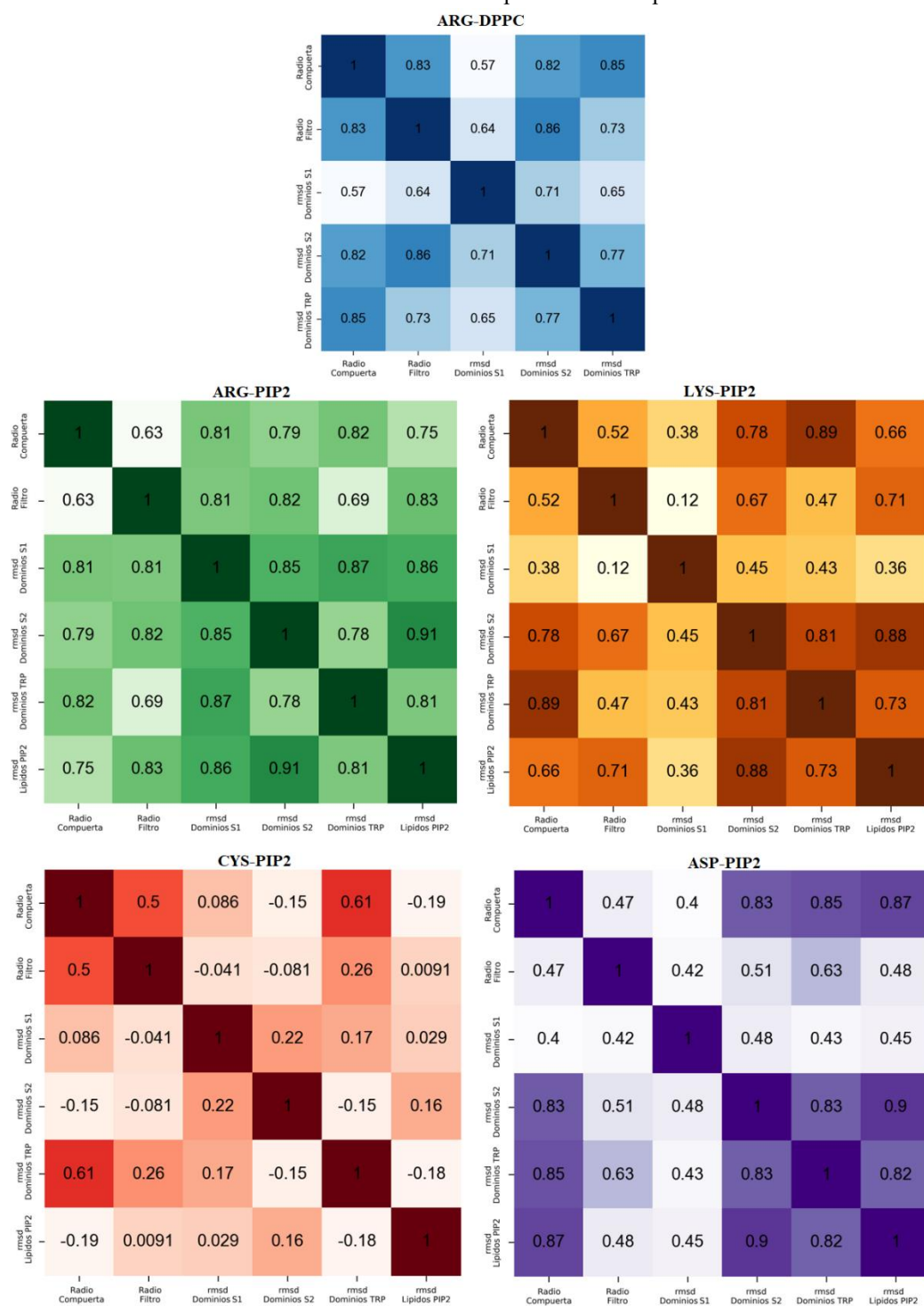
Las variables son diferenciadas en dos grupos “variables primarias” las cuales provienen del análisis de la estructura TRPV4 como tetrámero (Tabla 6.7) y “variables secundarias” que provienen del análisis por monómero.

**Tabla 6.8:** Variables Primarias y características.

<b>Variables Primarias</b>	<b>Características</b>
<b>Radio Compuerta</b>	Radio en la compuerta inferior
<b>Radio Filtro</b>	Radio en el filtro de selectividad
<b>RMSD Dominios TRP</b>	RMSD de los 4 dominios TRP que conforman el tetrámero
<b>RMSD_Dominios S1</b>	RMSD de los 4 dominios S1 que conforman el tetrámero
<b>RMSD Dominios S2</b>	RMSD de los 4 dominios S2 que conforman el tetrámero
<b>RMSD Lípidos PIP</b>	RMSD de los 4 lípidos PIP2 que interactúan con TRPV4

La Tabla 6.9 muestra las correlaciones entre las variables primarias, de este resultado el objetivo es visualizar si existen comportamientos similares entre los diferentes sistemas.

**Tabla 6.9:** Tablas de correlación para “variables primarias”.



Al observar las correlaciones con valores bajos, destaca “Radio Filtro” con “Radio Compuerta”, hecho que se observaba en la Figura 6.12 donde la disminución o aumento del radio de la compuerta inferior y filtro de selectividad no sucede de igual forma en ambas regiones.

Para el caso de “radio compuerta” y el “RMSD Dominios TRP” el alto índice de correlación tiene respuesta en la cercanía que existe entre ambas regiones, o bien este resultado puede interpretarse como la relevancia del dominio TRP en el comportamiento de la compuerta.

De las correlaciones que se muestran en la Tabla 6.8, resultan de mayor interés aquellas con un coeficiente de correlación mayor a 0.5 y que esté presente en al menos dos sistemas. Las correlaciones que cumplen con ambos elementos son agrupadas según la característica principal de TRPV4.

**Todos:** Radio Compuerta - RMSD Dominios TRP

**Sistema con Arg742:** Radio filtro - RMSD Dominios S1,  
RMSD Dominios S1 - RMSD Dominios S2

**R742 con carga:** Radio Compuerta – RMSD Lípidos PIP2,  
Radio Compuerta – RMSD Dominios S2,  
RMSD Dominios S2 – RMSD Lípidos PIP2,  
Radio Filtro – RMSD Dominios S2,  
RMSD Dominios S2 – RMSD Dominios TRP,

Existen 3 variables primarias que resultan particularmente interesantes por la naturaleza del modelo, orientado al análisis de la interacción TRPV4-PIP2, estas variables son, el RMSD de PIP2, los dominios TRP y los dominios S2:

**RMSD de los lípidos PIP2:** Se trata de las estructuras que promueven el comportamiento de apertura del canal.

**RMSD de los dominios TRP:** al tratarse del dominio donde se encuentra el residuo con el cual PIP2 interactúa y promueve la apertura del canal.

**RMSD del dominio S2:** cuyo comportamiento no parecía trascendente, sin embargo, los resultados indican lo contrario, al tener un valor alto en sus índices de correlación con otras variables.

Como se menciona anteriormente, el análisis de “variables secundarias” se orienta en el análisis por monómeros, para así encontrar cuál de ellos contribuye en mayor medida a las variaciones de RMSD como tetrámero y si esta contribución proviene de monómeros iguales indica que la interacción con PIP2 se está llevando a cabo ahí. (tabla 6.10)

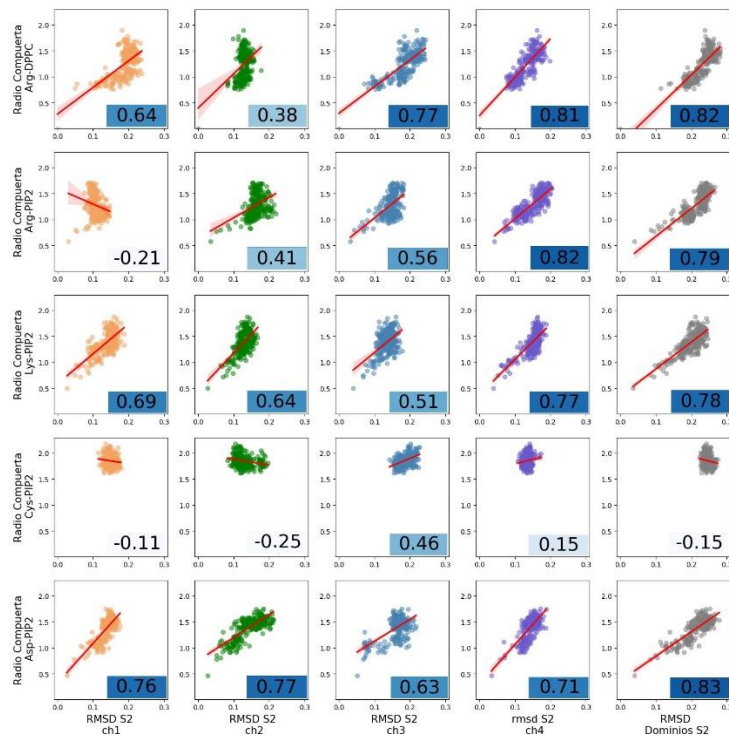
Para el análisis con “variables secundarias”, de la serie de correlaciones que se muestran, además de tomar aquellas que relacionan el dominio S2 con los radios (Radio Filtro – RMSD Dominios S2 y Radio Compuerta – RMSD Dominios S2), se toma “RMSD Dominios S2 – RMSD Lípidos PIP2”, correlación que vincula dos elementos importantes de la interacción TRPV4-PIP2.

**Tabla 6.10:** Variables secundarias y características.

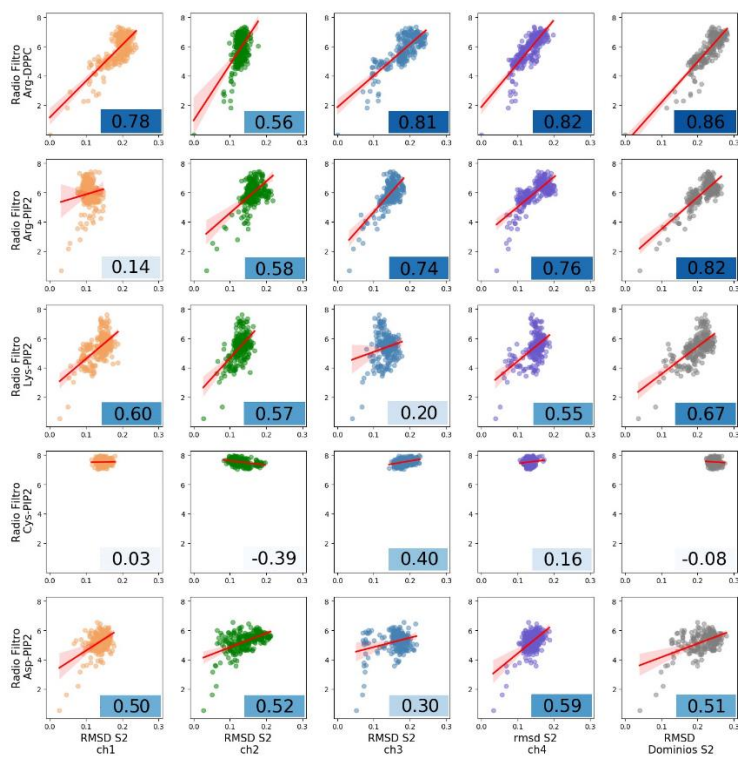
Variables Secundarias	Características
<b>RMSD S2 ch*</b>	RMSD del dominio S2 en el monómero * (* de 1 a 4)
<b>RMSD PIP2 ch*</b>	RMSD del lípido PIP2 en el monómero * (* de 1 a 4)

El resultado de las correlaciones que implican al dominio S2 con los radios de la compuerta inferior y filtro de selectividad se observa en las figuras 6.13 y 6.14.





**Figura 6.15:** Valor del radio mínimo en la zona de la compuerta inferior (eje y) vs RMSD en S2 de cada monómero (columna 1 a 4) y como tetramero (columna 5), realizado para cada sistema mutado (fila).



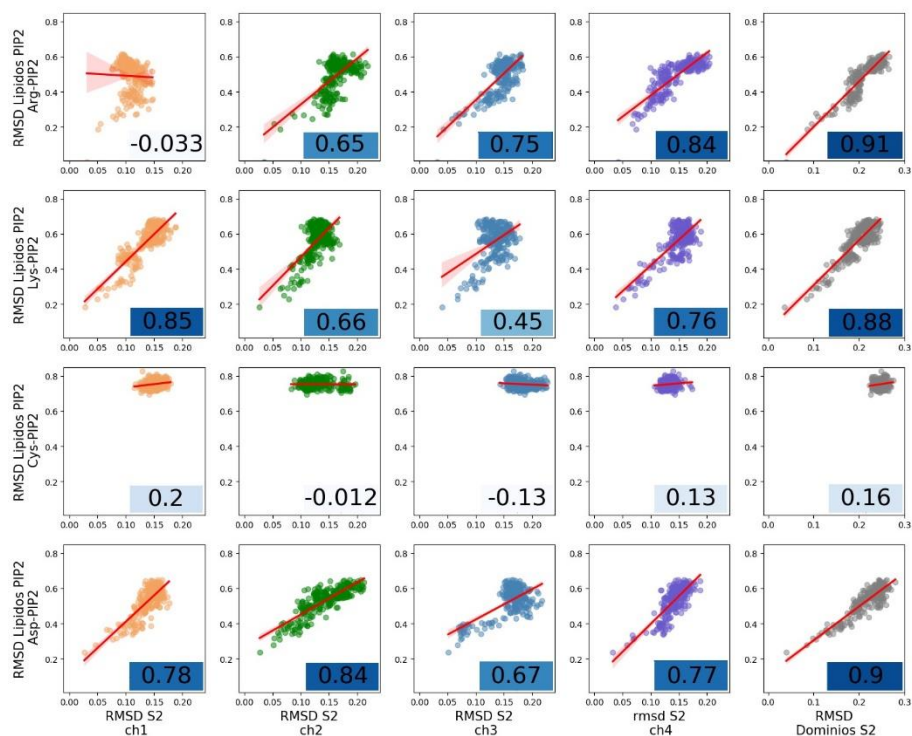
**Figura 6.16:** Valor del radio mínimo en la zona del filtro de selectividad (eje y) vs RMSD en S2 de cada monómero (columna 1 a 4) y como tetramero (columna 5), realizado para cada sistema mutado (fila).

En las figuras 6.15 y 6.16 es notable que los índices de correlación que corresponden al monómero 4 (ch4) muestran un comportamiento consistente para cada sistema, manteniendo índices de correlación altos, lo que indica que este monómero parecería tener mayor contribución en el comportamiento de la estructura como tetrámero.

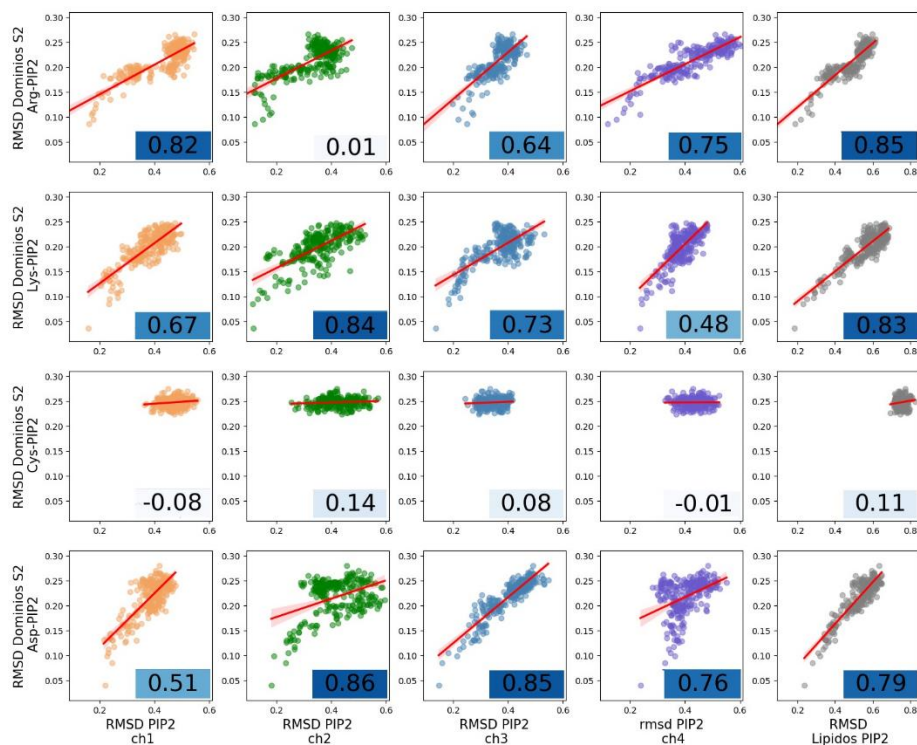
Otra característica que resalta, son los índices de correlación bajos que existen cuando el residuo R742 se trata de cisteína, situación que resulta anómala al comportamiento cuando los otros residuos están presentes, sin embargo, este comportamiento anómalo también se encuentra presente en los resultados 6.4.1 y 6.4.2, dejado ver la importancia de este residuo en el comportamiento de toda la estructura TRPV4.

Al observar la columna correspondiente al RMSD dominio S2 en las figuras 6.15 y 6.16, los valores en la figura 6.15 se encuentran en un rango más grande en su eje X (RMSD dominio S2) cuando el sistema se encuentra en interacción con PIP2, mientras que en la Figura 6.16 la variación en el eje X en los elementos de la quinta columna oscila en el mismo rango para todos los sistemas, este resultado se interpreta como la contribución de la interacción TRPV4-PIP2 en la variación del radio de la compuerta inferior, y no así en el radio del filtro de selectividad.

No obstante que el resultado anterior es un buen indicativo de la contribución de PIP2 en la variación del radio de la compuerta inferior, es necesario saber en dónde se lleva a cabo la interacción que arroja este resultado, es por ello que se emplea el análisis de variables secundarias. El análisis para la correlación “RMSD Dominios S2 – RMSD Lípidos PIP2” se realiza separando en dos, tomando un elemento como variable primaria mientras que el otro se descompone en sus variables secundarias.



**Figura 6.17:** Valor de RMSD de los lípidos PIP2 (eje y) vs RMSD en S2 de cada monómero (columna 1 a 4) y como tetramero (columna 5), realizado para cada sistema mutado (fila).



**Figura 6.18:** Valor de RMSD de los dominios S2 (eje y) vs RMSD del lípido PIP2 correspondiente a cada monómero (columna 1 a 4) y como tetramero (columna 5), realizado para cada sistema mutado (fila).

Al visualizar las Figuras 6.17 y 6.18 que correlacionan el RMSD de los lípidos PIP2, se aprecia que el comportamiento del sistema bajo la mutación por lisina resulta nuevamente el de menor variación. En este resultado lo que se aprecia es que la mutación en R742 no solo afecta el comportamiento de TRPV4, también afecta el comportamiento de los lípidos PIP2 embebidos en la estructura.

Al igual que en las Figuras 6.15 y 6.16 el comportamiento que se presenta en el monómero 4 es el de mayor relevancia, dejando ver que es esta región la que tiene mayor contribución en el comportamiento del sistema y en donde se presume que existe una interacción TRPV4-PIP2 adecuada.

#### 6.4.4 Discusión

Los resultados que se muestran a lo largo de este capítulo, derivados de la interacción de TRPV4 con PIP2 y las mutaciones realizadas sobre el residuo 742 muestran que la interacción entre TRPV4 y PIP2 podría darse a través de la inserción de este último elemento entre los dominios S1, S2 y TRP del canal TRPV4.

Al observar los resultados que se muestran en la sección 6.5.3 donde el comportamiento de los radios del sistema Arg-DPPC y Arg-PIP2 distan mucho de ser cercanos, sin mostrar evidencia en la apertura del canal. Sin embargo, cuando el residuo es mutado a lisina, se muestra un claro comportamiento de apertura en la compuerta inferior, situación que muestra una relación con el comportamiento descrito en el artículo *PIP2 depletion promotes TRPV4 channel activity in mouse brain capillary endothelial cells* [31].

## Conclusiones

Dentro de los resultados más importantes que presenta esta tesis, se encuentra la construcción de la membrana del tamaño requerido, lo cual abrió paso al manejo de proteínas de mayor complejidad y el análisis mediante electrofisiología computacional. Aunque existen servidores web que permiten realizar este procedimiento el protocolo aquí presentado permite una fácil automatización vía scripts de bash y/o Python.

Centrándonos en el análisis de PorB, los resultados que se presentan son satisfactorios, en el sistema simple como en el doble. Mientras el sistema simple logra capturar las diferencias esperadas en el radio del poro entre los sistemas silvestre y mutado, el sistema doble reproduce la diferencia en el flujo de iones esperada en las proteínas PorB.

Los resultados de mayor relevancia se encuentran en el análisis de la estructura TRPV4, en donde se plantea el posible vínculo entre R742 y la estructura lipídica PIP2, situación que es reportada desde el lado experimental [31] y al llevarla a la simulación de dinámica molecular se presentan resultados satisfactorios desde los múltiples enfoques que se abordaron en el análisis. Entre estos resultados se encuentra la afectación en el comportamiento de la estructura cuando en R742 se tiene cisteína, residuo que tiene como particularidad carga nula, este comportamiento además de verse reflejado en el RMSD de la estructura, también es posible apreciarlo en la interacción con PIP2, con lo cual R742 parece ser de gran relevancia en la actividad de la estructura TRPV4. Sin embargo, estos resultados se despliegan de simulaciones sin replica, situación necesaria en las simulaciones de dinámica molecular, al tratarse de modelos que parten de una estructura probabilística. No obstante, los resultados que se observan dan un buen indicio del comportamiento de TRPV4 y la relevancia del residuo 742.

Al observar la serie de resultados que se han presentado en esta tesis, es posible decir que estos buenos, al no limitarnos en reproducir, sino proponer variaciones de las simulaciones en las que se basa esta tesis. Además de proponer un sistema nuevo cuyos resultados podrían ser de gran ayuda en la comprensión del comportamiento de TRPV4.

## Lista de referencias

- [1] C.A. Orengo, A.E. Todd & J.M Thornton. From protein structure to function, *Current Opinion in Structural Biology*;9:374-382 (1999).
- [2] E. Paquet & H. L. Viktor. Molecular Dynamics, Monte Carlo Simulations, and Langevin Dynamics: A Computational Review, *Biome Tod Research International*; ID 183918 (2015).
- [3] Tamar Schlick-Molecular Modeling and Simulation-New York University (2010).
- [4] Manuel Megías, Pilar Molist & Manuel A. Pombal – Atlas de histología animal y vegetal: La célula – Facultad de Biología. Universidad de Vigo (2017).
- [5] Jaakko Malmivuo & Robert Plonsey – Bioelectromagnetism: Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields - Oxford University (1995).
- [6] – Jordi Ortin, José Ma Sancho - Curso de física estadística – Universitat de Barcelona (2006)
- [7] – Sergio A. Cannas - notas de mecánica estadística 1ª Ed – Universidad Nacional de Córdoba, (2013)
- [8] D. A. McQuarrie, *Statistical Mechanics*, First Edition, Harper and Row (1976).
- [9] Andrea Ruiz Millan, Estudio de Simulación Molecular del Agua (Tesis de licenciatura en física). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (2015).
- [10] Gilles Paul Pieffet, The application of molecular dynamics simulation techniques and free energy, University of Groningen (2005).
- [11] Qiong Zhang, Molecular Dynamics Simulations of Biomimetic Carbohydrate Materials (Doctoral Thesis in Theoretical Chemistry and Biology), Royal Institute of Technology (2011)
- [12] Zhuyi Xue, Understanding the Molecular Mechanism of Elasticity in Elastin from a Solvation Perspective, (Master Thesis in Masters of Science), University of Toronto (2013)
- [13] Walter Greiner, Ludwig Neise & Horst Stöcker, *Thermodynamics and Statistical Mechanics*, Institut für Theoretische Physik, (1997)
- [14] Berendsen, H. J. C. Transport properties computed by linear response through weak coupling to a bath. In: *Computer Simulations in Material Science*. Meyer, M., Pontikis, V. eds. . Kluwer 1991 139–155.
- [15] Bussi, G., Donadio, D., Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 126:014101. (2007)

- [16] C. W. Gardiner, *Handbook of Stochastic Methods* (Springer, 2003), 3rd ed.
- [17] M.J. Abraham, D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, and the GROMACS development team, *GROMACS User Manual version 2018*, [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org) (2018)
- [18] Zhaleh Ghaemi, *Atomistic Simulation Studies of the Permeation of Pharmacologically Relevant Molecules Through Lipid Membranes* ( Thesis submitted for the degree of Doctor Philosophiae), International School for Advanced Studies (2012)
- [19] Mark E. Tuckerman, *Statistical Mechanics: Theory and Molecular Simulation*, Department of Chemistry, New York University and Courant Institute of Mathematical Sciences, New York (2010)
- [20] Senthil K. Kandasamy and Ronald G. Larson *Molecular Dynamics Simulations of Model Trans-Membrane Peptides in Lipid Bilayers: A Systematic Investigation of Hydrophobic Mismatch*, *Biophysical Journal* 90, pp. 2326 - 2343 (2006)
- [21] Carsten Kutzner, Helmut Grubmüller, Bert L. de Groot and Ulrich Zachariae, *Computational Electrophysiology: The Molecular Dynamics of Ion Channel Permeation and Selectivity in Atomistic Detail*, *Biophysical Journal* 101 (4), pp. 809 - 817 (2011)
- [22] HILLE B. (Ed.). *Ionic Channels of Excitable Membranes* (3<sup>a</sup> ed). Sun-derland, MA: Sinauer.
- [23] Van Gunsteren, W. F., Billeter, S. R., Eising, A. A., Hünenberger, P. H., Krüger, P., Mark, A. E., Scott, W. R. P., Tironi, I. G. *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 manual and user guide*. Zürich, Switzerland: Hochschulverlag AG an der ETH Zürich. 1996.
- [24] Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dorr, R. O., Shaw, D. E. Improved side-chain torsion potentials for the AMBER ff99SB protein force field. *PROTEINS: Struct. Funct. Gen.* 78:1950–1958, 2010.
- [25] Justin A. Lamkil, Ph D (2018). *GROMACS Tutorial (Membrane Protein: KALP<sub>15</sub> in DPPC)*, Virginia Tech Department of Biochemistry, Recuperado de <http://www.mdtutorials.com/gmx/index.html>
- [26] C.Shepherd, H. Vogel, and P. Tieleman. Interactions of the designed antimicrobial peptide mb21 and truncated dermaseptin s3 with lipid bilayers. *molecular dynamics simulations*, *Biochem J*, 730:233–243, 2003
- [27] William J. Allen, Justin A. Lemkul, David R. Bevan. *GridMAT-MD: A Grid-Based Membrane Analysis Tool for Use With Molecular Dynamics*, *Journal of Computational Chemistry*, DOI 10.1002/jcc.21172



- [28] S. Louic, E. Vermeer, Bert. de Groot, V. Reat, A. Milon, and J. Czaplicki. Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers. computation from molecular dynamics simulations and comparison with 2h nmr experiments. *Eur Biophys J*, 36:919–931. (2007)
- [29] S. Feller. Computer simulation of a dppc phospholipid bilayer: Structural changes as a function of molecular surface area. *Langmuir*, 13:6555–6561, 1997.
- [30] Deng, Z., Hite, R.K., Yuan, P. Cryo-EM and X-ray structures of TRPV4 reveal insight into ion permeation and gating mechanisms. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25: 252–260, DOI: 10.1038/s41594-018-0037-5 (2018)
- [31] O. F. Harraz. PIP2 depletion promotes TRPV4 channel activity in mouse brain capillary endothelial cells, *eLife*;7:e38689 DOI: 10.7554/eLife.38689 (2018)
- [32] N. Michaud-Agrawal, E. J. Denning, T. B. Woolf, and O. Beckstein. MDAnalysis: A Toolkit for the Analysis of Molecular Dynamics Simulations. *J. Comput. Chem.* 32:2319-2327, DOI 10.1002/jcc.21787, PMID 21500218. (2011)
- [33] DeLano, W. L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography*, 40, 82-92. (2002)
- [34] Organización mundial de la salud. Meningitis – datos y cifras (28 de septiembre de 2021). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/meningitis>

## Apéndice A

### A1 Ecuación de Nernst y de Goldman-Hodgkin-Katz

La acumulación de iones en las superficies tanto interna como externa de la membrana plasmática, produce un campo eléctrico dentro de la membrana que ejerce fuerza sobre los iones que la cruzan. Por tanto, para describir el movimiento de los iones que permean la membrana se considera la fuerza debida al campo eléctrico y fuerza debida al fenómeno de difusión [5].

#### *Fuerza debida al campo eléctrico*

Según la ley de Ohm la corriente de conducción  $\underline{J}$  está definida por el producto entre el campo eléctrico  $\underline{E}$  y la conductividad del medio  $\sigma$  de modo que  $\underline{J} = \sigma \underline{E} = -\sigma \nabla V$ , por ello, el flujo que resulta de la presencia de un campo eléctrico para un k ion, depende de la resistencia eléctrica, la cual es función de la movilidad iónica definida por  $u_k$ .

$$\underline{j}_{ke} = -u_k \frac{Z_k}{|Z_k|} c_k \nabla V \quad (\text{A1.1})$$

Donde  $\underline{j}_{ke}$ = flujo iónico [ $\text{mol}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$ ],  $u_k$ = movilidad iónica [ $\text{cm}^2/(\text{V} \cdot \text{s})$ ],  $z_k$ =valencia del ion y  $c_k$ = concentración iónica [ $\frac{\text{mol}}{\text{cm}^3}$ ].

#### *Fuerza debida al fenómeno de difusión*

El principio por el cual los iones fluyen de regiones de alta a baja concentración se llama *difusión* [5]. Para las especies de k iones, el flujo iónico se expresa como:

$$\underline{j}_{kd} = -D_k \nabla C_k \quad (\text{A1.2})$$

Donde  $\underline{j}_{kd}$ = flujo iónico debido a la difusión [ $\text{mol}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$ ],  $c_k$ = concentración iónica [ $\frac{\text{mol}}{\text{cm}^3}$ ],

$D_k = \frac{u_k RT}{|z_k| F}$  = Constante de Fick (constante de difusión) [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ] con T = temperatura [K] y R= constante de gas [ $\frac{8.314 \text{J}}{(\text{mol} \cdot \text{K})}$ ].

El comportamiento cuando la membrana es permeable a solo un tipo de ion está descrito por la ecuación de Nernst, mientras que al considerar distintos tipos de iones este comportamiento se describe con la ecuación de Goldman–Hodgkin–Katz.

### A1.1 Ecuación de Nernst-Planck

El flujo iónico total para un  $k$  ion bajo un gradiente de concentración y un campo eléctrico esta dado por la suma del flujo de difusión y el campo eléctrico, esta ecuación se conoce como la ecuación de Nernst-Planck [5].

$$\underline{J}_k = \underline{j}_{kd} + \underline{j}_{ke} = -D_k z_k \vec{F} \left( \nabla c_k + \frac{c_k z_k \vec{F}}{RT} \nabla V \right) \quad (\text{A1.3})$$

### A1.2 Potencial de Nernst

Una relación entre la concentración de un tipo de iones dentro y fuera de la membrana se puede derivar de la ecuación (1.3), considerando una membrana en equilibrio  $\underline{J}_k = 0$ .

$$\nabla c_k = -\frac{c_k z_k \vec{F}}{RT} \nabla V \quad (\text{A1.4})$$

El voltaje de equilibrio a través de la membrana para el ion  $k$  esta dado por el potencial de Nernst,

$$V_k = -\frac{RT}{z_k \vec{F}} \ln \frac{c_{i,k}}{c_{o,k}} \quad (\text{A1.5})$$

$c_{i,k}$  y  $c_{o,k}$  denotan la concentración intracelular y extracelular del ion  $k$  respectivamente,  $V_k$  = voltaje de equilibrio para el ion  $k$  [V],  $R$  = constante de gas [8.314 J/(mol·K)],  $T$  = temperatura absoluta [K],  $z_k$  = valencia del  $k$  ion,  $F$  = Constante de Faraday [9.649 x 10<sup>4</sup> C/mol],  $c_{i,k}$  = concentración intracelular del ion  $k$ ,  $c_{o,k}$  = concentración extracelular del ion  $k$ .

### A1.3 Ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz

Considerando que el grosor de la membrana es muy pequeño comparado con su extensión, la membrana se considera plana, uniforme e infinita, por lo cual el potencial  $V$  y la concentración iónica  $c$  son funciones de  $x$  solamente. El supuesto básico de Goldman-Hodgkin-Katz reside en que el campo dentro de la membrana es constante [5].

$$\frac{dV}{dx} = \frac{V_h - V_0}{h} = \frac{V_m}{h} \quad (\text{A1.6})$$

con  $V_0$ =potencial en la superficie externa,  $V_h$ =potencial en la superficie interna,  $V_m$ =voltaje transmembrana,  $h$ = grosor de membrana.

Debido a las dimensiones de la membrana se sustituye  $\nabla V \equiv \frac{dV}{dx}$ ,  $\nabla c_k \equiv \frac{dc_k}{dx}$  y (1.6) en (1.3), despejando  $dx$  de la ecuación y  $j_k$  del resultado, se tiene:

$$j_k = -\frac{D_k V_m z_k \vec{F}}{RT h} \cdot \frac{c_k^h - c_k^0 e^{-\frac{V_m z_k \vec{F}}{RT}}}{1 - e^{-\frac{V_m z_k \vec{F}}{RT}}} \quad (\text{A1.7})$$

La densidad de corriente  $J_k$  se obtiene multiplicando el flujo de corriente (1.7) por la constante y la valencia de Faraday y simplificando con la permitividad  $P_k = \frac{D_k \beta_k}{h}$ , donde la relación entre la concentración dentro y fuera de la membrana se da mediante el coeficiente de partición  $\beta$ .

Si el flujo a través de la membrana en reposo es la contribución de todas las corrientes por el paso de los distintos tipos de iones, constituido mayormente por el paso de iones de potasio, sodio y cloro,

$$J_k + J_{Na} + J_{CL} = 0 \quad (\text{A1.8})$$

que sustituyendo (1.7) en (1.8) y tomando los valores de valencia para potasio y sodio con  $z = 1$  y para cloro  $z = -1$ ,

$$-P_K \frac{c_{i,K} - c_{0,K} e^{-\frac{V_m \vec{F}}{RT}}}{1 - e^{-\frac{V_m \vec{F}}{RT}}} - P_{Na} \frac{c_{i,Na} - c_{0,Na} e^{-\frac{V_m \vec{F}}{RT}}}{1 - e^{-\frac{V_m \vec{F}}{RT}}} - P_{CL} \frac{c_{i,CL} - c_{0,CL} e^{-\frac{V_m \vec{F}}{RT}}}{1 - e^{-\frac{V_m \vec{F}}{RT}}} \quad (\text{A1.9})$$

simplicando la ecuación, multiplicando por las permeabilidades y reagrupando términos, se obtiene la diferencia de potencia  $V_m$  a través de la membrana.

$$V_m = -\frac{RT}{\vec{F}} \ln \ln \frac{P_K c_{i,K} + P_{Na} c_{i,Na} + P_{CL} c_{0,CL}}{P_K c_{0,K} + P_{Na} c_{0,Na} + P_{CL} c_{i,CL}} \quad (\text{A1.1})$$

Esta ecuación es llamada Ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz.

## A2 Acoplamiento de Temperatura y presión

### A2.1 Acoplamiento de temperatura Berendsen

El acoplamiento de temperatura Berendsen mantiene la temperatura constante con el acoplamiento del sistema en un baño térmico externo, que actúa como una fuente de energía térmica. Se re-escalan las velocidades en cada paso de tiempo, de manera que el cambio de temperatura sea proporcional a la diferencia de temperatura entre el sistema y el baño [13],

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (\text{A2.1})$$

donde  $\tau$  es un parámetro de acoplamiento elegido por el usuario.

Tomando en cuenta que por el principio de equipartición, la temperatura se encuentra relacionada con la energía cinética y puede calcularse entonces el factor de escala para las velocidades:

$$\langle K \rangle_{NVT} = \frac{3}{2} Nk_B T \quad (\text{A2.2})$$

Si en un tiempo  $t$  la temperatura es  $T(t)$  y las velocidades son multiplicadas por un factor  $\lambda$ , el cambio de temperatura se describe como:

$$\Delta T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{2 m_i (\lambda v_i)^2}{3 Nk_B} - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{2 m_i v_i^2}{3 Nk_B} = (\lambda^2 - 1) T(t) \quad (\text{A2.3})$$

Con un factor de escala  $\lambda$ :

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\Delta t}{\tau} \left( \frac{T_0}{T} - 1 \right) \quad (\text{A2.4})$$

Aquí,  $T_0$  es la temperatura del punto de ajuste,  $\Delta t$  es el paso del tiempo de integración, y  $\tau$  es una constante llamada "tiempo de subida" del termostato. El acoplamiento de Berendsen es simple y eficiente al relajar un sistema a la temperatura deseada [13].

## A2.2 Acoplamiento de temperatura reescalamiento de velocidad (V-rescaling)

En su formulación más simple, el método de v-rescale consiste en multiplicar las velocidades de todas las partículas por el mismo factor  $\lambda$ , calculado al hacer que la energía cinética total  $K$  sea igual a la energía cinética promedio a la temperatura deseada  $\underline{K} = \frac{N_f}{2\beta}$ , donde  $N_f$  es el número de grados de libertad y  $\beta$  es la temperatura inversa [14]. Por lo tanto, el factor de reescalado  $\lambda$  para las velocidades se obtiene como:

$$\left\langle \frac{1}{2} m_i v_{i,\alpha}^2 \right\rangle = \frac{1}{2} k_B T, \quad \langle K \rangle_{NVT} = \frac{N_f}{2} k_B T \quad (\text{A2.5})$$

Además de calcular la temperatura instantánea para un tiempo  $t$ , la ergodicidad sostiene que:

$$T(t) = \frac{1}{k_B N_f} \sum_{i,\alpha} m_i v_{i,\alpha}^2(t) \quad (\text{A2.6})$$

$$T = \underline{T} = \frac{1}{t} \int_0^t T(t') dt \quad (\text{A2.7})$$

El acoplamiento por V-rescaling es un método de restricción en el que las velocidades de las partículas se escalan con el parámetro  $\lambda$  para que  $T(t)$  de la ecuación (2.17) coincida con  $T$ .

$$T_{nueva} = \frac{1}{k_B N_f} \sum_{i,\alpha} m_i (\lambda v_{i,\alpha}(t))^2 = \lambda^2 T(t) \quad (\text{A2.8})$$

y

$$T_{nueva} - T(t) = (\lambda^2 - 1)T(t) \quad (\text{A2.9})$$

Esto permite la identificación de  $\lambda$  para  $T$ .

$$\lambda = \sqrt{\frac{T}{T(t)}} = \sqrt{\frac{\underline{K}}{K}} \quad (\text{A2.10})$$

En lugar de forzar a que la energía cinética sea exactamente igual a  $\underline{K}$ , seleccionamos su valor objetivo  $K_t$  con un procedimiento estocástico destinado a obtener el conjunto deseado [14].

$$\lambda = \sqrt{\frac{K_t}{K}} \quad (\text{A2.11})$$

Donde  $K_t$  extraída de la distribución canónica de energía cinética

$$\underline{P}(K_t)dK_t \propto K_t^{\left(\frac{N_f}{2}-1\right)} e^{-\beta K_t} dK_t \quad (\text{A2.12})$$

La elección de  $K_t$  puede basarse en el valor anterior de  $K$  para obtener una evolución más suave y no necesariamente de la ecuación (2.22), una forma general de hacer esto es aplicando las siguientes prescripciones [15]:

1. Evolución del sistema para un solo paso de tiempo con las ecuaciones de Hamilton, utilizando un integrador como la velocidad Verlet
2. Calcular energía cinética.
3. Evolucione la energía cinética durante un tiempo correspondiente a un solo paso de tiempo utilizando una dinámica estocástica continua auxiliar.
4. Volver a escalar las velocidades para reforzar este nuevo valor de la energía cinética.

Para la elección de la dinámica estocástica la única restricción es que debe dejar la distribución canónica en la ecuación (2.22) invariante [15],

$$dK = \left( D(K) \frac{\partial \log \underline{P}}{\partial K} + \frac{\partial D(K)}{\partial K} \right) dt + \sqrt{2D(K)} dW \quad (\text{A2.13})$$

donde  $D(K)$  es una función definida positiva arbitraria de  $K$ ,  $dW$  ruido de Wiener, y se emplea la convención Itoh [15]. Al sustituir la distribución de la ecuación (2.22):

$$dK = \left( \frac{N_f D(K)}{2KK} (K - K) - \frac{D(K)}{K} + \frac{\partial D(K)}{\partial K} \right) dt + \sqrt{2D(K)} dW \quad (\text{A2.14})$$

Este resultado es independiente de la elección de la función  $D(K)$ , pero diferentes opciones pueden llevar a diferentes velocidades de equilibrio [14]. por lo que se emplea,

$$D(K) = \frac{2KK}{N_f \tau} \quad (\text{A2.15})$$



donde el parámetro arbitrario  $\tau$  tiene la dimensión de un tiempo y determina la escala de tiempo del termostato:

$$dK = (\underline{K} - K) \frac{dt}{\tau} + 2 \sqrt{\frac{K\underline{K}}{N_f}} \frac{dW}{\sqrt{\tau}} \quad (\text{A2.16})$$

### A2.3 Acoplamiento de presión Berendsen

Al emplear un ensamble isotérmico-isobárico las simulaciones requieren mantener constante la presión mientras lo que varía es el volumen del volumen de simulación, de manera muy similar al acoplamiento de temperatura Berendsen. En este caso el sistema se mantiene a presión constante con un baño de presión externa, rescatando el volumen en cada paso de tiempo [13],

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau} \quad (\text{A2.17})$$

siendo  $\tau$  una constante de acoplamiento dependiente del sistema en estudio.

El factor de escala es encontrado a partir de la ecuación (2.16) y la definición de compresibilidad isotérmica,

$$\kappa = -\frac{1}{V} \left( \frac{\partial V}{\partial P} \right)_T \quad (\text{A2.18})$$

teniendo así el factor de escala para el volumen,

$$\lambda = 1 - \kappa \frac{dt}{\tau} (P - P_0) \quad (\text{A2.19})$$

este acoplamiento permite ser aplicado isotrópicamente o anisotrópicamente.

### A2.4 Acoplamiento de presión Parrinello-Rahman

El enfoque Parrinello-Rahman es similar al acoplamiento de temperatura Nosé-Hoover, y en teoría da el verdadero conjunto NPT. Con el baróstato Parrinello-Rahman, los vectores de caja representados por la matriz  $b$  obedecen la ecuación matricial de movimiento [16].

$$\frac{db^2}{dt^2} = VW^{-1}b'^{-1}(P - P_{ref}) \quad (\text{A2.20})$$

El volumen de la caja se denota como  $V$  y  $W$  es un parámetro de matriz que determina la fuerza del acoplamiento. Las matrices  $P$  y  $P_{ref}$  son las presiones actuales y de referencia, respectivamente [16].

En la mayoría de los casos, combinaría el baróstato Parrinello-Rahman con el termostato Nosé-Hoover, pero para mantenerlo simple solo mostramos la modificación Parrinello-Rahman [16]:

$$\frac{d^2r_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i} - M \frac{dr_i}{dt} \quad (\text{A2.21})$$

$$M = b^{-1} \left[ b \frac{db'}{dt} + \frac{db}{dt} b' \right] b'^{-1} \quad (\text{A2.22})$$

La matriz de parámetros de masa (inversa)  $W^{-1}$  determina la resistencia del acoplamiento y cómo se puede deformar la caja. Dado que la resistencia del acoplamiento también depende del tamaño de su caja, solo tiene que proporcionar las compresibilidades isotérmicas aproximadas  $\beta$  y la constante de tiempo de presión  $\tau_p$  ( $L$  es el elemento de matriz de caja más grande) [16]:

$$(W^{-1})_{ij} = \frac{4\pi^2\beta_{ij}}{3\tau_p^2L} \quad (\text{A2.23})$$

Al igual que para el termostato Nosé-Hoover, debe darse cuenta de que la constante de tiempo Parrinello-Rahman no es equivalente al tiempo de relajación utilizado en el algoritmo de acoplamiento de presión de Berendsen [16].