



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS**

**EFFECTO DE ERGOSTEROL Y COLESTEROL SOBRE LA MORFOLOGÍA Y  
DINÁMICA DE DOMINIOS PRESENTES EN BICAPAS LIPÍDICAS Y SUS  
IMPLICACIONES SOBRE LA ACCIÓN DE ANTIMICÓTICOS POLIÉNICOS.**

**TESIS DE INVESTIGACIÓN  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS (FÍSICAS)**

**PRESENTA:**

**M. EN C. ARTURO GALVÁN HERNÁNDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL  
DR. IVÁN ORTEGA BLAKE  
INSTITUTO DE CIENCIAS FÍSICAS  
UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. HUMBERTO SAINT-MARTIN POSADA  
DR. ROBERTO CARLOS MUÑOZ GARAY  
POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS**

**CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2020**



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.

## Abstract

The effect of cholesterol and ergosterol on supported lipid bilayers composed of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) and egg sphingomyelin (eSM) in a 1/1 molar ratio was studied using atomic force microscopy. The addition of ergosterol or cholesterol to these membranes considerably modifies both the structure and the dynamics of the domains present in them. The height of the eSM enriched domains increases with concentration of both sterols, but more markedly with ergosterol. The height of the POPC enriched domains increases with concentration in a similar manner for both sterols. This thickening effect is larger for eSM than for POPC when ergosterol, not cholesterol, is present. Domain area coverage increases with both sterols at 5 mol% but decreases at 20 mol% and almost disappears at 40 mol%. The size of the eSM enriched domains decreases with sterol concentration, more markedly with cholesterol. Bilayer rupture forces show that overall stiffness increases with the addition of 5 mol% cholesterol, but only for the eSM enriched domains with ergosterol at the same concentration. At larger sterol concentrations the stiffness of both regions becomes reduced. At 40 mol% sterol concentration, both membranes present the same rupture force value. To gain mechanistic insight into these observations we performed Quantum Mechanical calculations and Molecular Dynamics simulations of the sterol molecules. We found that conformational freedom for the sterol molecules is quite different. This difference might be behind the observed phenomena. Finally, the different action of sterols on membrane properties is related to the sterol-dependent ionophoretic activity of polyene antibiotics by adsorption studies of polyenes on supported bilayers made of POPC/eSM 1:1 mol:mol with and without 20 mol% sterol. AmB and its derivative A21 were studied. Both polyenes show similar adsorption on sterol-free and ergosterol containing bilayers. On these bilayers the polyenes affect the liquid phase by either a thinning or a detergent effect. A21 seems to aggregate on the borders and interior of the gel phase domains for both 0 and 20 mol% ergosterol while AmB only presents this effect on the latter bilayer. On the cholesterol containing bilayer, which is in a liquid phase, AmB has a detergent effect while A21 aggregates and does not present detergent or other type of effect at the concentrations studied. We conclude that sterol presence affects phase segregation on lipid bilayers composed of equimolar ratios of POPC and eSM resulting in a more homogeneous surface at higher sterol concentrations. This effect is sterol dependent and the required concentration to achieve a single-phase bilayer is lower for cholesterol. This sterol dependence seems to be a product of the different conformational freedoms between ergosterol and cholesterol. The lack of phase segregation affects polyene adsorption and we believe this will affect their ionophoretic activity responsible for their antimycotic effect as well as their toxic side effects on human patients. Finally, this work lays the ground for the systematic study of lipid bilayers by means of Atomic Force Microscopy and Molecular Dynamics simulations as complementary tools that yield reliable and groundbreaking molecular information as is the case for the action of biological molecules like polyenes.

## Resumen

El efecto de los esteroides sobre membranas lipídicas ha sido estudiado para los casos particulares de ergosterol y colesterol en una membrana compuesta de sn-1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina (POPC) y esfingomielina de huevo (eSM) a una razón equimolar. Existen muchos estudios previos utilizando diversas técnicas y herramientas tanto experimentales como teóricas de los efectos de esteroides sobre membranas lipídicas, en particular para colesterol y sus derivados como 7-dehidrocolesterol. Sin embargo, no existen estudios sobre el efecto de ergosterol en membranas que presentan formación de dominios y su comparación con el efecto de colesterol son escasos, particularmente mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). Los resultados presentados muestran una diferencia bastante marcada entre la acción de ergosterol en comparación con colesterol sobre la morfología de los dominios y fuerza de penetración que está relacionado con la presión lateral de la membrana. En particular el colesterol parece ordenar regiones de la membrana enriquecidas en POPC mientras que desordena regiones enriquecidas en eSM, que se supone se encuentran en una fase gel. El ergosterol por su parte ordena en menor medida las zonas enriquecidas en POPC y no desordena las zonas enriquecidas en eSM. Este orden se puede inferir de la altura de la membrana a diferentes concentraciones de esteroles. Los resultados obtenidos muestran que el ergosterol incrementa el grosor de la membrana en la zona enriquecida en eSM, lo que sugiere un mayor ordenamiento. El colesterol presenta este efecto en menor medida. El grosor de la membrana enriquecida en POPC también incrementa al agregar esteroles, aunque de forma no monótona, a 20 mol% de contenido de esteroles el grosor de la membrana parece llegar a su valor máximo. Por otro lado, la segregación de fase desaparece, i.e. la presencia de dominios, al incrementar el contenido de esteroles. Este efecto se ve más marcado en el caso de colesterol que a 20 mol% presenta muy poca cobertura de dominios. Mientras que ergosterol a 40 mol% muestra dominios de escalas pequeñas, nanodominios. El cambio en la fuerza de ruptura, la fuerza a la cual la membrana se rompe bajo la acción de una micropalanca, sugiere que ergosterol no produce un efecto de condensación, o empacamiento, tan marcado como en el caso de colesterol para la región enriquecida en POPC. En el caso de la región enriquecida en eSM los resultados sugieren un efecto de condensación tanto para ergosterol como para colesterol, aunque en este último caso el efecto es menor. El efecto de condensación de la zona de dominio se comporta de forma no monótona. Adicionalmente, se realizaron simulaciones de dinámica molecular para evaluar el espacio conformacional de ergosterol y colesterol en busca de una posible explicación molecular a los resultados observados con AFM. Se encontró que ergosterol tiene una preferencia por geometrías planas. Colesterol es más flexible. Esto sugiere que ergosterol tendrá interacciones favorables con moléculas planas y rígidas mientras que colesterol tendrá interacciones igualmente favorables con moléculas planas y rígidas, así como con moléculas más flexibles. Para relacionar de manera directa el efecto de la estructura de la membrana con la acción de polipéptidos se estudió la adsorción de AmB y A21 en bicapas soportadas compuestas de POPC/eSM 1:1 mol:mol sin y con 20 mol% de esteroles. A21 se agrega en los dominios, tanto en los bordes como su interior. En el caso de 0 y 20 mol% ergosterol se observa que A21 tiene un efecto de detergente en la región líquida y un efecto de ensanchamiento de la zona gel. En el caso de 20 mol% colesterol, A21 no presenta efecto sobre la bicapa, sino que forma agregados sobre ésta. Por otro lado, AmB tiene un efecto sobre los tres tipos de bicapa. Para 0 y 20 mol% de ergosterol tiene un efecto sobre la región líquida. En el primer caso reduce el

grosor de la bicapa y en el segundo presenta un efecto de detergente, además en este caso con ergosterol, AmB se agrega en los bordes entre la fase gel y la fase líquida. Para bicapas con 20 mol% de colesterol AmB tiene también un efecto de detergente. Se concluye que la presencia de esterol afecta la segregación de fases pasando a un estado homogéneo, es decir de una sola fase, al incrementar la concentración de esterol. Además, este efecto es dependiente del esterol presente en la membrana, colesterol o ergosterol. Esta diferencia provoca una unión de polienos diferente sobre la membrana, favorecida por la presencia de dominios, así como por la diferencia relativa de alturas entre las fases. Es por ello por lo que se propone que la acción ionofórica de polienos sobre membranas celulares es dependiente no sólo de la composición de ésta última pero también de su estructura y dinámica, e. g. segregación de fases. Esta propuesta sobre la unión de polienos sobre la membrana aportará para lograr un mejor entendimiento del mecanismo molecular de acción de estas moléculas cuya acción farmacológica es muy importante pero limitada y así proponer nuevos fármacos o formulaciones con mayores beneficios para su uso clínico. Por último, este trabajo sentó las bases para el estudio de bicapas lipídicas mediante microscopía de fuerza atómica y simulaciones de dinámica molecular de manera simultánea y complementaria como plataforma de investigación. Esta herramienta permite la obtención de información valiosa del comportamiento a nivel molecular del sistema, cuya importancia se ve reflejada al estudiar moléculas con acción biológica, como el caso de polienos.

## Dedicatoria

*Para Tammy:  
No podría ser de otra manera, todo siempre es por y para ti.*

*Para mis hijos Arturo, Iván, Ricardo y Esteban.*

*Para mi madre Gricel.*

*Para mi padre Arturo*

*Para mis suegros, Tammy y Pablo.*

# Índice general

<b>Abstract</b>	<b>1</b>
<b>Resumen</b>	<b>2</b>
<b>Índice general</b>	<b>5</b>
<b>Prefacio</b>	<b>8</b>
Planteamiento Del Problema	8
Motivación y propósito del estudio	9
Organización de la tesis	10
<b>Capítulo 1: Introducción</b>	<b>11</b>
1.1. Infecciones Fúngicas	11
1.2. Anfotericina B y Nistatina	12
1.2.1. Mecanismo de acción	13
Modelo estándar	13
Extensión del modelo estándar y nuevos modelos de acción	14
Derivados de polienos: A21	17
Importancia de la estructura de la membrana celular	17
1.3. La Membrana Celular	18
1.3.1. Modelos para el estudio de la membrana celular	20
1.3.2. Bicapas soportadas sobre un sustrato sólido	20
1.4. Estudio de bicapas lipídicas mediante microscopía de fuerza atómica.	24
1.4.1. Uso para el estudio de segregación de fases en bicapas lipídicas.	24
1.4.2. Medición de la fuerza de ruptura en bicapas soportadas.	25
1.5. Microscopía de fuerza atómica	25
1.5.1. Funcionamiento	26
Fuerzas entre la punta y la muestra	26
Fuerzas punta-muestra	27
Mecánica del contacto punta-muestra	29
Modos de obtención de imágenes topográficas	30
Modo de contacto	31
Modo de no-contacto	31
Modo intermitente	36
1.5.2. Curvas de fuerza contra distancia y micropalancas	37
1.5.3. Calibración de las micropalancas	39
1.5.4. Sustratos	41
Mica	41
Vidrio	41
Grafito	41
1.5.5. Problemas	41
Deriva térmica	41
Efectos de punta	42

Interferencia óptica	42
Rugosidad de muestra	42
Movilidad de la muestra	43
Imágenes en condiciones acuosas	43
1.5.6. Uso de AFM en este trabajo	43
1.5.7. Limitaciones	45
1.6. Cálculos Cuánticos y Simulaciones De Dinámica Molecular	47
1.6.1 Dinámica Molecular ab initio	47
1.6.2. Método de Hartree-Fock	48
1.6.3. Teoría de perturbaciones Möller-Plesset	49
1.6.4. Teoría del Funcional de la Densidad	49
B3LYP	50
1.6.5. Simulaciones de Dinámica Molecular	50
CHARMM36	52
Slipids	52
<b>Capítulo 2: Justificación</b>	<b>54</b>
<b>Capítulo 3: Hipótesis y objetivos</b>	<b>55</b>
3.1 Hipótesis	55
3.2 Objetivo general	55
3.3 Objetivos particulares	55
<b>Capítulo 4: Materiales y métodos</b>	<b>56</b>
4.1. Materiales	56
4.2. Obtención de vesículas	57
4.3. Formación de bicapas soportadas	57
4.4. Obtención de imágenes topográficas	58
4.5. Obtención de curvas de fuerza contra distancia	59
4.6. Cálculos cuánticos de conformaciones de mínima energía	59
4.7. Simulaciones de Dinámica Molecular	60
<b>Capítulo 5: Resultados</b>	<b>61</b>
5.1. Morfología y dinámica de bicapas soportadas	61
5.1.2. Efecto de los esteroides sobre la morfología de los dominios	61
5.1.3. Efecto de los esteroides sobre la respuesta mecánica de la membrana	67
5.1.4. Nanodominios en bicapas de POPC/eSM y 40 mol% de ergosterol	69
5.2 Adsorción de AmB y A21 sobre bicapas soportadas. Resultados preliminares.	70
5.3. Libertades conformacionales de ergosterol y colesterol	76
5.3.1. Conformaciones de mínima energía de colesterol, ergosterol y coprosterol	76
5.3.2. Espacio conformacional de colesterol y ergosterol	80
<b>Capítulo 6: Discusión</b>	<b>82</b>
6.1. Efecto de ergosterol y colesterol en la morfología de dominios en bicapas equimolares de POPC/eSM.	82

6.2. Los esteroides incrementan el grosor de la membrana de manera no-monotónica.	83
6.3. Respuesta mecánica de las bicapas: Ergosterol afecta principalmente a eSM; Colesterol modifica la respuesta de toda la membrana, POPC y eSM.	85
6.4 Ergosterol mantiene la segregación de fases a concentraciones altas: nanodominios.	85
6.5. AmB y A21 se agregan alrededor y dentro de los dominios.	86
6.6. Espacio conformacional de ergosterol y colesterol	87
6.7. Predicciones de los campos de fuerza	88
6.8. Importancia de la estructura química de los esteroides	89
<b>Capítulo 7: Conclusiones</b>	<b>91</b>
7.1. Conclusiones	91
7.2. Perspectivas	93
<b>Agradecimientos</b>	<b>94</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>96</b>
<b>Apéndice A. Grosor de la región gel de la bicapa POPC/eSM con 20 mol% de ergosterol.</b>	<b>111</b>

# Prefacio

## Planteamiento del problema

La membrana celular es un elemento indispensable en todos los organismos vivos ya que permite a la célula mantener un ambiente interno diferente a su entorno, contribuyendo así a lograr un estado de homeostasis<sup>1</sup>. Un proceso celular que involucra directamente a la membrana celular es el transporte transmembranal que permite el ingreso y salida de iones y nutrientes de manera regulada. El transporte se da principalmente por dos formas: i) Transporte pasivo como difusión simple a través del medio hidrofóbico de la membrana o difusión asistida mediante poros acuosos que se forman a través de la membrana; ii) Transporte activo mediante bombas que van en contra de gradientes de concentración y mediante co-transportadores que sirven de vehículo a través de la membrana. Existen fármacos como hemolisina E, gramicidina D o anfotericina B cuya acción antibiótica/antimicótica es gracias a la formación de poros desregulados en la membrana celular que provocan la muerte celular. De particular interés es la anfotericina B (AmB) que posee una acción selectiva hacia patógenos fúngicos con un alto grado de efectividad antimicótica. Además de la acción selectiva y su potencia, AmB genera muy baja resistencia en los patógenos fúngicos (Sterling y Merz, 1998; Ellis, 2002). En el contexto actual en el cual existe una gran población de pacientes inmunodeprimidos como consecuencia de VIH/SIDA, tratamiento quimioterapéutico contra cáncer o una enfermedad autoinmune (Bongomin et al., 2017), los patógenos fúngicos que son mayormente oportunistas, infectan fácilmente a esta población inmunodeprimida. La principal línea de defensa en estos pacientes son fármacos antimicóticos. A pesar de que AmB es el fármaco más potente, sus efectos tóxicos colaterales (Fanos y Cataldi, 2001; Wilcock et al., 2013) limitan su uso a casos de extrema urgencia. En los últimos 20 años se han buscado y desarrollado alternativas a AmB que sean igual de potentes, pero con menos toxicidad colateral. Estos incluyen derivados o formulaciones nuevas de AmB (Myint, 1999; Palacios et al., 2011; Wilcock et al., 2013; Kamiński, 2014; Antillón et al., 2016; Stewart et al., 2018). El éxito o fracaso de estas alternativas depende de las interacciones entre AmB y la membrana lipídica, algunas más favorables que otras. Estas interacciones siguen siendo un tema de debate y no se comprenden del todo. El modelo de acción ionofórica más aceptado, y propuesto hace 50 años, sugiere que la interacción AmB-esterol favorece la formación de poros hidrofílicos que atraviesan la membrana y modifican drásticamente su permeabilidad (Holz y Finkelstein, 1970; Andreoli, 1973; Finkelstein y Holz, 1973; de Kruijff y Demel, 1974). Además, esta interacción binaria (AmB-esterol) es más favorable para el dímero AmB-ergosterol, esterol presente en hongos, en comparación con el dímero AmB-colesterol, esterol presente en mamíferos. Aunque el modelo de poro de barril compuesto por dímeros AmB-esterol, el cual propone que varios dímeros AmB-esterol se acomodan a modo de barril dentro de la membrana para formar un poro, ha llevado a la elaboración de nuevos derivados de AmB con potencial terapéutico (Palacios et al., 2011; Gray et al., 2012; Wilcock et al., 2013; Anderson et al., 2014), existe evidencia de que el mecanismo de acción

---

<sup>1</sup> "Homeostasis - Facultad de Medicina UNAM." <http://www.facmed.unam.mx/Libro-NeuroFisio/FuncionesGenerales/Homeostasis/Homeostasis.html>. Fecha de acceso 9 ago.. 2019.

ionoforético de nistatina (Nys), otro antibiótico poliénico muy similar a AmB, es modulado por la estructura fisicoquímica de la membrana en su totalidad y no solo por la presencia de esterol (González-Damián y Ortega-Blake, 2010; Dos Santos et al., 2017). Los resultados de González-Damián y Ortega-Blake muestran que la actividad ionoforética de Nys en bicapas lipídicas compuestas por sn-1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina (POPC)/colesterol o POPC/ergosterol no es monótona a lo largo del diagrama de fase propuesto por el grupo de Manuel Prieto (de Almeida et al., 2003; Silva et al., 2006) para dichas mezclas lipídicas. Sus resultados muestran claramente que, en la presencia de ambos esteroides, la mayor actividad ionoforética sucede en la región en que se propone una coexistencia de fases de líquido desordenado y líquido ordenado ( $l_d+l_o$ ). Un estudio reciente de dinámica molecular de la bicapa lipídica de POPC/colesterol (Favela-Rosales et al., 2019) propone una explicación para los resultados observados por González-Damián y Ortega-Blake. Al estudiar las propiedades de orden, empaquetamiento y grosor de la membrana a lo largo del diagrama de fase propuesto para POPC/colesterol, encontraron que en la región de supuesta coexistencia de fases  $l_d+l_o$ , surge una heterogeneidad de naturaleza estadística que sugiere la formación de nanodominios. Estos nanodominios presentan una heterogeneidad similar a una segregación de fases, aunque con propiedades distintas. Estos resultados están en concordancia con las observaciones de Dos Santos y colaboradores sobre la inserción y mayor actividad de Nys en bicapas que presentan mayor segregación de fases líquido-gel (Dos Santos et al., 2017). Además, existe evidencia experimental de la presencia de dominios de esfingolípidos en fase gel en levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, (Aresta-Branco et al., 2011a) que sugiere que las diferencias estructurales y fisicoquímicas entre membranas de células de mamífero y de hongo son las causantes de la acción ionoforética diferenciada de AmB y Nys, concretamente la existencia de dominios de fase gel. Esta idea ha sido fortalecida por estudios de la permeabilidad de potasio a través de la membrana de liposomas medidos mediante fluorescencia, en donde se encontró que Nys tiene mayor actividad ionoforética en membranas con mayor presencia de dominios de fase gel (Dos Santos et al., 2017). Sin embargo, hasta ahora no se han estudiado estas diferencias estructurales y fisicoquímicas a detalle, en particular el efecto de los esteroides colesterol y ergosterol. Este trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto de ergosterol y colesterol sobre bicapas que presentan segregación de fase, líquido-gel, además de encontrar diferencias a nivel de membrana y a nivel molecular de dichos efectos que pudieran explicar la selectividad de los antimicóticos polienos.

### **Motivación y propósito del estudio**

La microscopía de fuerza atómica (AFM) se ha convertido en una herramienta muy poderosa para el estudio de sistemas biológicos (Lawrence et al., 2003; Cross et al., 2007; Maté et al., 2014; Yoshida, 2015). Esta técnica permite la obtención de información topográfica de superficies de muestras biológicas a una escala de nanómetros y al mismo tiempo permite obtener información de las propiedades mecánicas de dichas muestras. Esta versatilidad es la razón por la cual se escogió la AFM como la técnica principal de este estudio. Adicionalmente, el desarrollo de modelos de membrana mediante bicapas lipídicas soportadas en un sustrato sólido (SLB) (Mou et al., 1994a; Richter et al., 2003; Shinozaki et al., 2008; Jackman et al., 2016) ha permitido su estudio rutinario mediante AFM. Aunque existen estudios de AFM sobre sistemas de SLB de diferentes mezclas lipídicas hay muy pocos trabajos dirigidos a estudiar las diferencias de estas bicapas al agregar ergosterol o

colesterol, y los que existen no investigan sus propiedades estructurales o fisicoquímicas (Huang et al., 2002).

Por ello, este trabajo de tesis busca caracterizar y cuantificar mediante AFM el efecto de colesterol y ergosterol sobre bicapas soportadas formadas por una mezcla equimolar de sn-1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina y esfingomiélinea de huevo (POPC/eSM), la cual presenta segregación de fases también llamada formación de dominios. Se utilizarán ergosterol y colesterol para modelar la membrana fúngica y mamífera respectivamente y se estudiarán sus diferencias morfológicas, estructurales y dinámicas. Para complementar y tener mayor certeza de los resultados experimentales, se utilizan cálculos cuánticos y simulaciones de dinámica molecular para dar una explicación a nivel molecular del fenómeno observado. Los resultados obtenidos ayudarán a avanzar el entendimiento de la acción diferenciada de polienos sobre la membrana celular, en particular el efecto de la estructura y dinámica de la membrana sobre dicha acción diferenciada.

### **Organización de la tesis**

La tesis está organizada de la siguiente manera: en el **Capítulo 1** se expone el problema de las infecciones fúngicas sistémicas, se presentan algunos de los antimicóticos más potentes y utilizados en la actualidad. Se profundiza en los polienos, en particular su toxicidad colateral y el papel que juega la membrana celular en su acción ionofórica sobre células. Asimismo, se mencionan los modelos para estudiar la membrana, en particular el modelo de bicapas soportadas sobre sustratos sólidos mediante microscopía de fuerza atómica que se utilizaron en este trabajo. Se explica con detalle el funcionamiento del microscopio de fuerza atómica y su uso para muestras biológicas. Se discuten las limitaciones de la microscopía de fuerza atómica y la necesidad de utilizar otras técnicas para complementar las observaciones. Se presenta una introducción de las simulaciones de dinámica molecular y los cálculos cuánticos como un complemento para los estudios por microscopía de fuerza atómica. El **Capítulo 2** presenta la justificación de este trabajo y el **Capítulo 3** la hipótesis y los objetivos de éste. En el **Capítulo 4** se presentan los materiales y métodos utilizados. El **Capítulo 5** expone los resultados obtenidos. Se presentan los resultados de la obtención de imágenes topográficas, así como las mediciones de fuerza obtenidas mediante microscopía de fuerza atómica sobre bicapas soportadas que contienen colesterol o ergosterol. También se presentan los resultados de estudiar las moléculas de ergosterol y colesterol con simulaciones de dinámica molecular y cálculos cuánticos, así como la información que brindan para proponer una explicación de nivel molecular a las observaciones obtenidas con microscopía de fuerza atómica. En el **Capítulo 6** se discuten las diferencias entre ergosterol y colesterol sobre los dominios presentes en estas membranas y la adsorción de polienos en ellas. Finalmente, en el **Capítulo 7** se presentan las conclusiones generales del trabajo, así como la dirección de futuros trabajos. Es importante mencionar que más allá de los resultados puntuales presentados, este trabajo tesis sienta las bases para el desarrollo de estudios de sistemas biológicos, como bicapas lipídicas, mediante el uso simultáneo y complementario de microscopía de fuerza atómica y simulaciones de dinámica molecular como una herramienta poderosa que permite la observación y entendimiento de algunos fenómenos biológicos y de sus bases moleculares.

# Capítulo 1: Introducción

## 1.1. Infecciones Fúngicas

Los patógenos fúngicos son responsables de diversos tipos de infecciones. Estas infecciones se pueden dividir de manera amplia en dos grupos: a) Infecciones recurrentes y que no representan un peligro para el paciente tales como candidiasis vaginal y oral o afecciones en la piel como pie de atleta; b) infecciones sistémicas que afectan órganos internos (Rautemaa-Richardson y Richardson, 2017). Las infecciones sistémicas generalmente se originan en los pulmones, al inhalar esporas de moho, por ejemplo, y de ahí se diseminan hacia otros órganos. Las infecciones más comunes son causadas por las especies *Candida* y *Aspergillus*, aunque hay más especies infecciosas. La mayoría de los patógenos fúngicos son oportunistas y atacan a pacientes que presentan inmunodepresión o que fueron sometidos a algún trasplante (Rolston, 2001), aunque existen patógenos fúngicos (dimórficos) capaces de infectar a un paciente que no presenta las predisposiciones relacionadas a un sistema inmune deficiente (Rolston, 2001; Rautemaa-Richardson y Richardson, 2017). En las últimas dos décadas se han desarrollado fármacos antifúngicos seguros y de fácil aplicación para combatir diversos tipos de patógenos, sin embargo, el uso generalizado de estos fármacos ha provocado el surgimiento de cepas resistentes (Perlin et al., 2017). La existencia de gran número de pacientes que presentan inmunodepresión debido a enfermedades como el SIDA-VIH, por tratamientos como quimioterapia y radioterapia (Bongomin et al., 2017; Campoy y Adrio, 2017), la existencia de patógenos fúngicos dimórficos y la creciente resistencia de los patógenos fúngicos a los fármacos utilizados para combatirlos (Britz y Govender, 2016) hace de los patógenos fúngicos un problema de salud.

Los fármacos más comunes para combatir las infecciones fúngicas son pocos e incluyen a los azoles, las equinocandinas, la flucitosina y los polienos (Odds et al., 2003; Carmona y Limper, 2017).

La flucitosina ataca la célula fúngica mediante la inhibición de la síntesis de ADN. Para lograrlo requiere de una permeasa particular de la citosina para ingresar al interior de la célula. No todos los patógenos fúngicos presentan las enzimas requeridas para el funcionamiento de la flucitosina, por lo que su uso se ve limitado a levaduras patogénicas.

Las equinocandinas actúan como inhibidores de la pared celular en hongos ya que bloquean la síntesis de 1,3 beta-D-glucano. Este modo de acción resulta particularmente interesante ya que las células en mamíferos no poseen pared celular ni el polisacárido objetivo. Su descubrimiento como agente antifúngico fue gracias a pruebas llevadas a cabo en la década de los 1970s. Han surgido nuevas formas de equinocandinas como posibles agentes antifúngicos (Bossche y Vanden Bossche, 2002) aunque siguen bajo estudio.

Los imidazoles y triazoles (azoles) interfieren con la síntesis de ergosterol mediante la inhibición de la demetilación de lanosterol. Son la clase de fármacos más ampliamente utilizados de manera terapéutica.

Los polienos, que incluyen a la anfotericina B (AmB) y a la nistatina (Nys), son moléculas que constan básicamente de un anillo compuesto de una cadena de enlaces dobles de carbono conjugados, por un lado, mientras que el otro lado se compone por una cadena que contiene múltiples enlaces hidroxilos. Tanto AmB como Nys poseen un anillo micosáminico. AmB ha sido por muchos años el único fármaco polieno antifúngico capaz de ser administrado sistémicamente. El mecanismo de acción de los polienos sigue siendo tema de debate aunque queda claro que la membrana juega un papel importante (Huang et al., 2002; Venegas et al., 2003; González-Damián y Ortega-Blake, 2010; Dos Santos et al., 2017). El modelo más aceptado hasta el momento propone que AmB se enlaza con los esteroides de la membrana, formando agregados que crean un poro hidrofílico que permite el flujo de iones y demás contenido celular (Cass et al., 1970; Andreoli, 1973; Finkelstein y Holz, 1973; de Kruijff y Demel, 1974; Matsumori et al., 2009). Se especula que la interacción AmB-ergosterol, el esteroide encontrado en células de hongos, es más favorable que la interacción AmB-colesterol, el esteroide presente en células de mamíferos. Sin embargo la presencia de poros en membranas de mamíferos causa problemas de toxicidad tales como nefrotoxicidad (Fanos y Cataldi, 2001; Wilcock et al., 2013). Esta toxicidad colateral limita el uso de AmB, mientras que en el caso de Nys la falta de una formulación apropiada impide su uso sistémico. Más adelante se hace una revisión de los diferentes modelos de acción.

Todos los fármacos antifúngicos siguen siendo objeto de estudio y, gracias a ellos, han surgido nuevos derivados, así como nuevas formulaciones para tratar las infecciones fúngicas de manera más eficaz y segura. Este trabajo está dirigido a entender el papel que juega la membrana lipídica, a nivel estructural, en la acción de antibióticos poliénicos, que incluyen AmB y Nys, los cuales son de gran interés dada su alta efectividad y baja propensión de generar cepas resistentes.

## 1.2. Anfotericina B y Nistatina

La anfotericina B (AmB) es un polieno macrólido que presenta 7 enlaces dobles (heptaeno) (Ganis et al., 1971; Gallis et al., 1990) como se observa en la figura 1. Por su parte nistatina (Nys) es muy similar a AmB, aunque consta de un anillo con 6 enlaces dobles (hexaeno) como se observa en la figura 2. AmB es sintetizada por la bacteria *Streptomyces nodosus* y Nys por la bacteria *Streptomyces noursei*, ambos son utilizados como agentes antimicóticos y antiprotozoarios y recientemente se estudia su posible acción antineoplásica. AmB se utiliza contra formas sistémicas de coccidioidomicosis, aspergilosis, candidiasis, criptococosis (Enoch, 2006) y en formas resistentes de leishmaniasis mucocutánea americana (Moss y Wilson, 1992) entre otras patologías. A pesar su alta acción antimicótica, AmB y Nys causan daños severos en los tejidos del paciente. Se presume que eso se debe a la existencia de una interacción Polieno-Colesterol (Wilcock et al., 2013), el esteroide presente en células de mamífero. Esta interacción es similar, aunque menos favorable que la interacción AmB-Ergosterol, esteroide presente en células de hongos. Se cree que la preferencia por ergosterol sobre colesterol es lo que permite su uso terapéutico, aunque sea de manera limitada. Para lograr minimizar o suprimir los daños colaterales es necesario entender el mecanismo de acción de AmB y Nys a un nivel molecular y a partir de este conocimiento proponer estrategias para reducir su acción nociva sobre en membranas de mamífero.

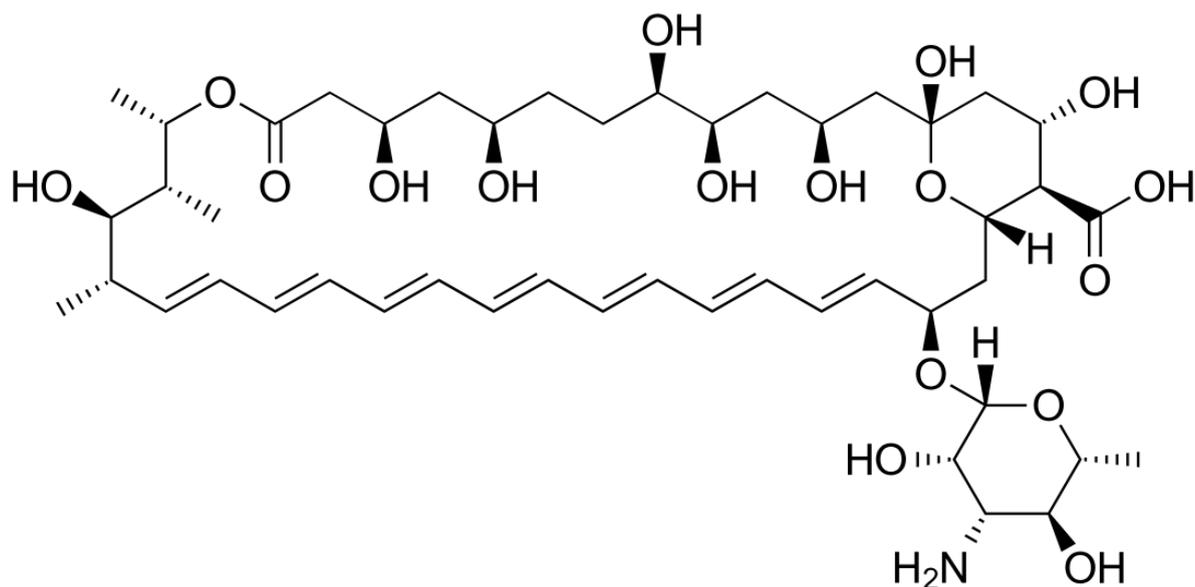


Figura 1. Estructura molecular en dos dimensiones de anfotericina B. Observamos un anillo que consta de dos cadenas diferentes. Un lado hidroxilado, el superior en la imagen, y un lado polieno (heptaeno) en la parte inferior. Además, tiene enlazado un anillo de micosamina de menor tamaño, parte inferior derecha.

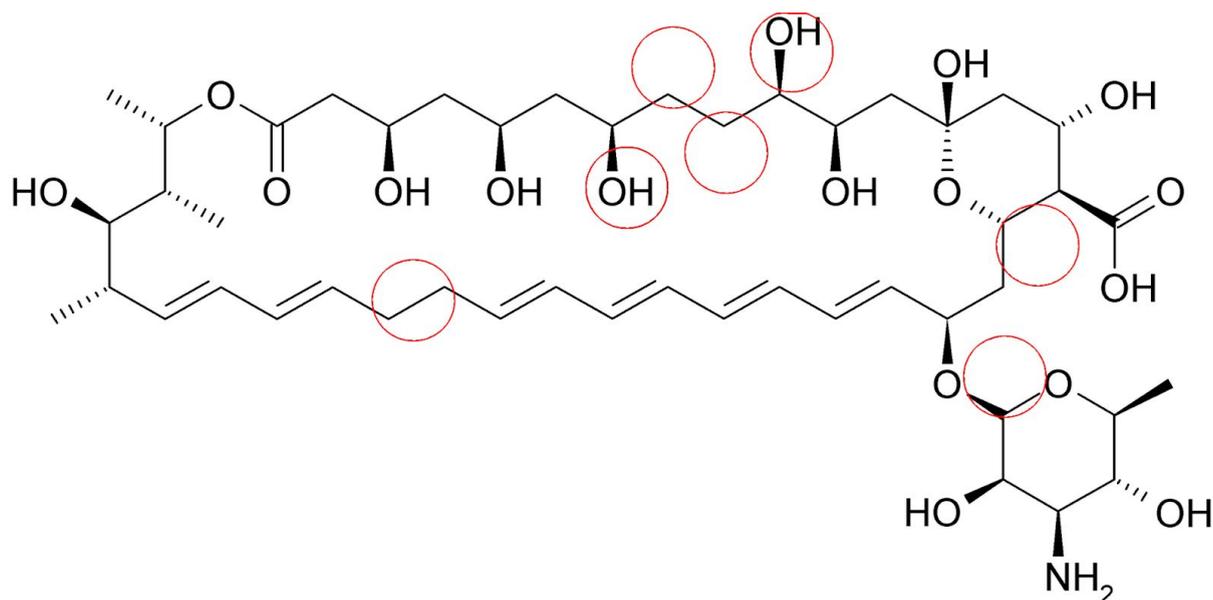


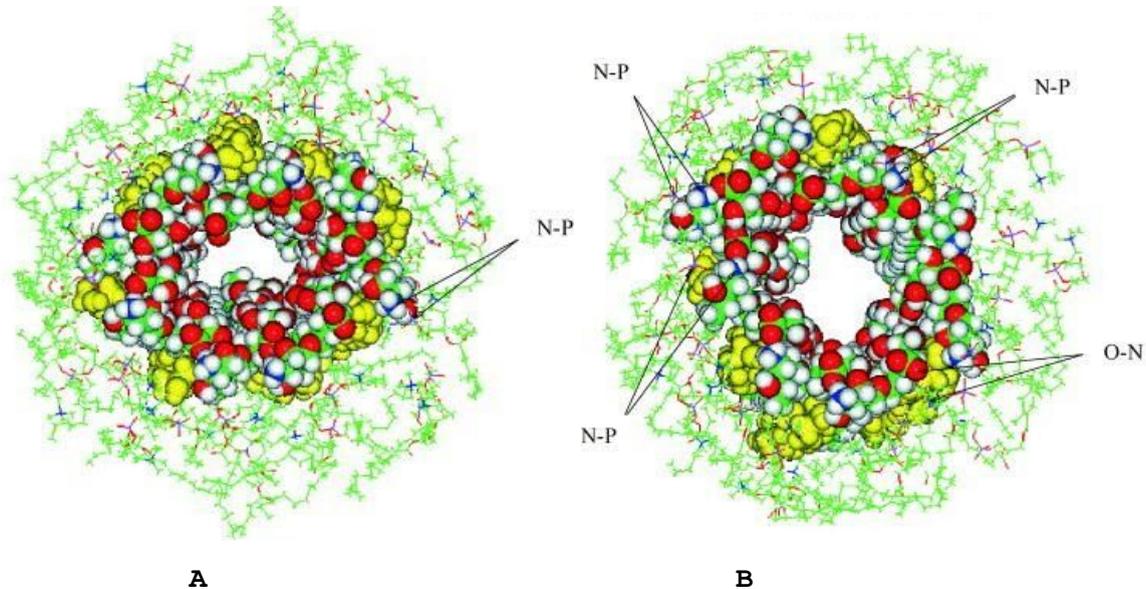
Figura 2. Estructura molecular en dos dimensiones de nistatina. Al igual que AmB observamos un anillo que consta de dos cadenas diferentes. Un lado hidroxilado, el superior en la imagen, y un lado polieno (hexaeno) en la parte inferior. Además, tiene enlazado un anillo de micosamina de menor tamaño, parte inferior derecha. Las diferencias entre AmB y Nys se muestran como círculos rojos.

### 1.2.1. Mecanismo de acción

#### Modelo estándar

El modelo de acción más aceptado hasta ahora propone que las moléculas de polieno interactúan con el ergosterol, presentes en células de hongos, y se enlazan en forma de barril, véase figura 3. Este barril forma un poro hidrofílico (Andreoli, 1973; Finkelstein, 1973; de Kruijff y Demel, 1974), con las cadenas polihidroxiladas hacia el centro del poro y la

cadena poliénica hacia afuera, que modifica la permeabilidad de la membrana del hongo y permite el flujo de iones como  $K^+$ ,  $Cl^-$  y  $H^+$  causando muerte celular (Brajtburg et al., 1985; Kamiński, 2014).



**A** **B**  
 Figura 3. Imagen de Dinámica Molecular de un canal de AmB-Colesterol (A) y de AmB-ergosterol (B) en una membrana de dimistiroilfosfatidilcolina (DMPC). Los esteroides y AmB se muestran en una representación de esferas de Van der Waals (esteroides en amarillo) mientras que las moléculas de DMPC se muestran en su representación de estructura molecular. Se observa que el poro se forma de dímeros AmB-esterol dispuestos de manera intercalada, esteroides marcados con amarillo. La Dinámica Molecular permite calcular interacciones entre los nitrógenos de la amina de AmB y los fosfatos del DMPC (N-P) así como de los nitrógenos de la amina del DMPC y el oxígeno del carboxilo de AmB (O-N). El modelo propone que la cara hidroxilada de AmB queda orientada hacia el centro del poro lo que permite el flujo de agua. Imagen obtenida de (Baginski et al., 2002).

Los poros se pueden formar con diferente número de monómeros de AmB, se ha calculado que este número puede ser entre 4 y 12 (Cass et al., 1970; Gruszecki et al., 2003). Esto da lugar a la variedad de conductancias que se observan en experimentos de canal unitario (Brutyan y McPhie, 1996; Cotero et al., 1998; Venegas et al., 2003; González-Damián y Ortega-Blake, 2010). Este es primer modelo aceptado ampliamente y el más estudiado hasta el día de hoy y se le conoce como modelo estándar.

#### Extensión del modelo estándar y nuevos modelos de acción

Nueva evidencia experimental ha modificado y extendido el modelo estándar. La obtención de poros de AmB en bicapas lipídicas que no contienen esteroles (HsuChen y Feingold, 1973; Hsuchen et al., 1973; Whyte et al., 1989; Cotero et al., 1998; Venegas et al., 2003) condujo a replantear la necesidad de esteroides para la formación de poros de AmB. Se demostró que estos poros son los mismos que se observan cuando hay esteroles presente en la membrana y no proto-canales o pseudo-canales como se les había considerado anteriormente (Cohen, 1998). En experimentos de electrofisiología realizados con Nys, González-Damián y Ortega-Blake (González-Damián y Ortega-Blake, 2010) observaron que la conductancia promedio de los canales de Nys muestra una correlación con el diagrama de fase de las mezclas sn-1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina (POPC) con colesterol y ergosterol propuesto por Silva y colaboradores (Silva et al., 2006). En ambos casos la fase mixta, mezcla de fase líquido ordenado ( $l_o$ ) y líquido desordenado ( $l_d$ ), muestra la mayor actividad

ionoforética de Nys, lo que lleva a suponer que esta estructura mixta de la bicapa lipídica favorece la formación de poros de Nys. De hecho, en este estudio se observan dos fenómenos contradictorios al modelo estándar de interacción polieno-esterol. Uno es la mayor actividad ionoforética de Nys, bajo las mismas concentraciones y temperatura, en una bicapa que contiene colesterol comparada con la misma bicapa que contiene ergosterol, ver figura 4 para los valores de 15°C y ~40 mol% de esterol. El segundo resultado de interés obtenido por González-Damián es la caída en la acción de Nys al incrementar la concentración de ergosterol, ver figura 4 (B), esto concuerda con lo observado por Hsuchen y Feingold en la caída de actividad al agregar esterol a liposomas de compuestos por lecitina de diferentes tipos (HsuChen y Feingold, 1973; Hsuchen et al., 1973).

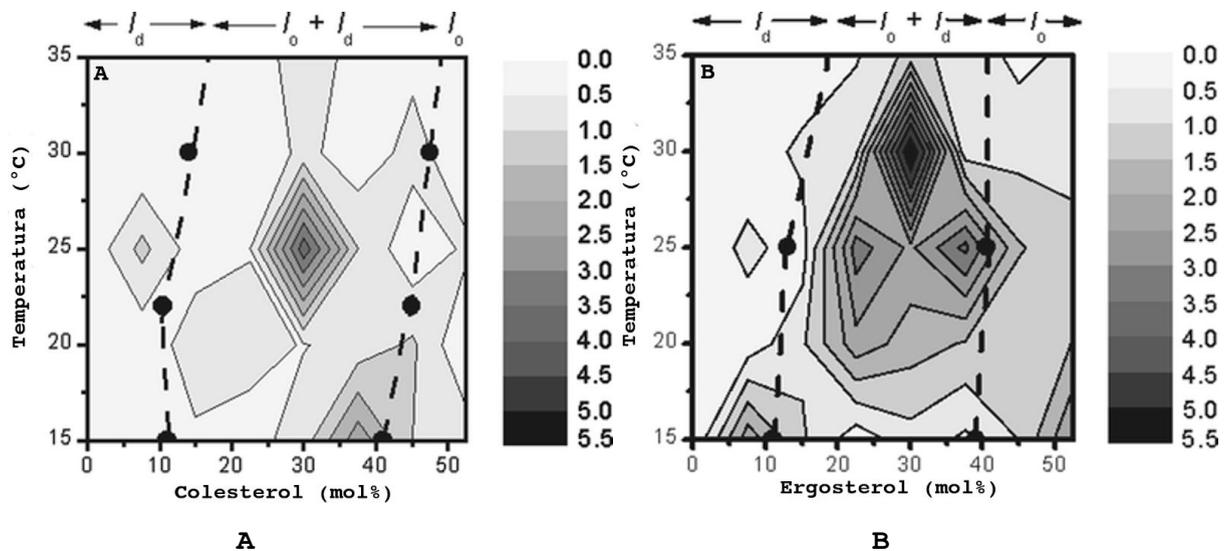


Figura 4. Diagrama de fase de la actividad ionoforética de Nys en bicapas de POPC/colesterol (A) o POPC/ergosterol (B) a distintas concentraciones molares de esterol. Los diagramas muestran la conductancia promedio para cada región. Regiones oscuras indican mayor conductancia promedio mientras regiones claras indican menor conductancia promedio. Imagen adaptada de figuras 3 y 4 de (González-Damián y Ortega-Blake, 2010)

Por su parte Huang y colaboradores (Huang et al., 2002) observaron que AmB logra formar canales iónicos en bicapas lipídicas con ergosterol desde un estado de agregación monomérico. Sin embargo, en el caso de bicapas lipídicas que contienen colesterol, AmB logra la formación de canales cuando se encuentra en un estado de agregación dimérico. Para bicapas lipídicas sin esterol se requiere de estados agregados mayores para observar un flujo a través de la bicapa. Esto está en acuerdo con las observaciones de Cotero y colaboradores (Cotero et al., 1998) de que existe actividad ionoforética en bicapas sin esterol, pero sólo a concentraciones muy altas, cuando AmB presenta agregados de mayor grado. Esto sugiere que el efecto modulador de los esteroides sobre la acción ionoforética de polienos se debe a una modificación de la estructura de la membrana y que modifica la interacción Polieno-membrana. En la literatura existen diagramas de fase para las mezclas POPC/ergosterol y POPC/colesterol propuestos por el grupo de Manuel Prieto (de Almeida et al., 2003; Silva et al., 2006). Aunque estos diagramas han sido cuestionados en mayor medida que para mezclas binarias de esterol y lípidos saturados como dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), hay evidencia que sugiere la existencia de una región mixta ( $l_d+l_o$ ). Favela-Rosales y colaboradores encontraron la aparición de una heterogeneidad de naturaleza estadística en la misma región en la que se observa mayor

actividad de Nys (González-Damián y Ortega-Blake, 2010; Favela-Rosales et al., 2019). Este trabajo es muy importante ya que muestra que en efecto hay una coexistencia de fases de naturaleza estadística.

En un trabajo reciente dos Santos y colaboradores (Dos Santos et al., 2017) mostraron que la acción ionofórica del antimicótico Nys incrementa al aumentar los dominios de fase gel presentes en una bicapa formada por un fosfolípido insaturado y otro lípido saturado. Además, demostraron que la formación y estabilización de poros acuosos causantes de la acción ionofórica varía al cambiar de lípido saturado, DPPC o esfingomiélna de huevo (eSM). Utilizando microscopía de fuerza atómica y espectroscopía de fluorescencia demostraron que ante la presencia de dominios de fase gel compuestos por DPPC, Nys se inserta y agrega dentro de los dominios de fase gel y a su vez éstos se expanden. Dominios de fase gel formados por eSM son desestabilizados por Nys. Nuevamente, se tiene evidencia que sugiere que la estructura de la membrana juega un papel importante en el mecanismo de acción de antimicóticos poliénicos, incluso sin la presencia de esteroles. Además, la evidencia sugiere que los polienos ven favorecida su inserción en la membrana y su actividad ionofórica en membranas lipídicas que presentan una coexistencia de fases de una fase desordenada y otra ordenada ( $l_o+l_d$  o líquido-gel), incluso sin la presencia de esteroides. Todo lo anterior sugiere un claro efecto de la estructura de la membrana en la inserción y actividad ionofórica de polienos que debe ser estudiada más a fondo.

Existen otras propuestas del mecanismo de acción de polienos, en particular de AmB, alternativos al modelo estándar. El más reciente propuesto por el grupo de Burke (Palacios et al., 2011; Gray et al., 2012; Wilcock et al., 2013; Anderson et al., 2014) propone que AmB forma agregados de gran tamaño que se adsorben sobre la superficie de la membrana y actúan como una esponja de esteroles. El agregado retira el esteroles de la membrana y lo almacena dentro del mismo agregado. La falta de esteroles provoca una desestabilización de la membrana que resulta en su ruptura. Otro modelo similar es el denominado de secuestro de esteroles (Mouri et al., 2008). En este modelo monómeros de AmB se adsorben sobre la superficie de la membrana y la gran afinidad entre AmB y el esteroles resulta en una interacción entre ellos. De manera similar al modelo de esponja, la interacción entre AmB y el esteroles causa una ruptura en la membrana por falta de esteroles. La diferencia entre estos modelos es la capacidad de extraer el esteroles, en el modelo de esponja, lo cual implica un alto costo energético. En ambos casos la afinidad AmB-esteroles y la especificidad particular por ergosterol es crucial. Un último modelo de acción que vale la pena mencionar propone que AmB induce la acumulación de especies reactivas de oxígeno que provocan daño oxidativo en la membrana lipídica y que interfieren con funciones celulares. Además, este daño oxidativo provoca lisis tanto en células de hongo como en glóbulos rojos (Sangalli-Leite et al., 2011; Mesa-Arango et al., 2014; Chudzik et al., 2015; Guirao-Abad et al., 2017; Shekhova et al., 2017).

En este trabajo se considera el modelo estándar con un mayor énfasis en la estructura de la membrana sobre la composición, aunque no se descartan los modelos antes mencionados. La evidencia presente en la literatura sugiere que los polienos no actúan de un único modo y finalmente el efecto antifúngico es el resultado de una acción cooperativa de los diferentes fenómenos. Sin embargo, a juicio de este trabajo de tesis el modelo estándar,

con mayor énfasis en la estructura membranal, explica de mejor manera la acción antifúngica y sus efectos colaterales.

#### Derivados de polienos: A21

En la búsqueda de un nuevo fármaco antimicótico con menos daño colateral, se han probado diferentes estrategias. Una de ellas es la síntesis de fármacos a partir de la molécula original, ya sea AmB o Nys. En la última década se han sintetizado derivados que prometen ser una mejor alternativa que las moléculas madre (Baginski y Czub, 2009; Castelli et al., 2017). En el laboratorio de biofísica del Instituto de Ciencias Físicas de la UNAM en colaboración con grupos de la UAEM y del Cinvestav, sintetizaron un derivado de AmB con base en la idea de que la estructura de la membrana es un factor determinante en la acción ionofórica de los antibióticos poliénicos (Antillón et al., 2016). Este fármaco denominado (L)-metil éster de histidina de anfotericina B o A21, ver figura 5, demostró ser menos tóxico en pruebas in vitro e in vivo. La transferencia del conocimiento está en proceso de realizarse con la participación de una empresa farmacéutica, Neolpharma de México, y actualmente se trabaja en una formulación que permita el uso de este fármaco para beneficio de la población. A pesar de su mayor seguridad y misma potencia comparado con la molécula madre, aún se investigan las causas de su mayor selectividad. La comparación entre el comportamiento de A21 contra AmB ayudará a encontrar las razones detrás de la mayor selectividad.

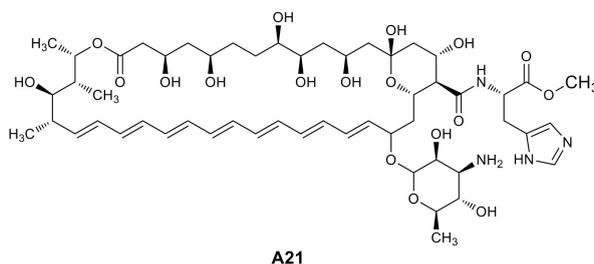


Figura 5. Esquema de la estructura 2D de (L)-metil éster de histidina de anfotericina B sintetizado a partir de anfotericina B en el Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM. Imagen adaptada a partir de la publicada por Antillón y colaboradores (Antillón et al., 2016).

#### Importancia de la estructura de la membrana celular

La evidencia mencionada hasta ahora hace pensar que la estructura de la membrana es un factor importante que considerar al estudiar la acción de polienos. Sin embargo, esta evidencia es en membranas modelo. En 2011, Aresta-Branco y colaboradores (Aresta-Branco et al., 2011b) encontraron una diferencia importante entre en las membranas celulares de mamífero y de hongo. La membrana de *Saccharomyces cerevisiae* presenta formación de dominios en fase gel de gran tamaño (micras) enriquecidas en esfingomiolina y en proteínas con anclaje GPI, pero no en ergosterol. En contraste, se presume que las membranas de mamífero forman balsas lipídicas enriquecidas en esfingomiolina y colesterol. Las balsas se postulan como dominios de lípido ordenado o incluso en fase gel de tamaños nanométricos y que tienen un tiempo de vida del orden de nanosegundos (Lichtenberg et al., 2005; Goñi, 2019). Esto nos lleva a preguntarnos si la formación, morfología y dinámica de los distintos dominios presentes en hongos favorece la acción de antibióticos poliénicos como lo son AmB y Nys. Recordemos que Dos Santos y

colaboradores (Dos Santos et al., 2017) encontraron que Nys tiene actividad ionofórica en bicapas sin esterol, pero con presencia de dominios de fase gel. Es por eso por lo que este trabajo tiene como objetivo ahondar en la estructura de membranas con formación de dominios, como lo es una bicapa compuesta por POPC y eSM, y estudiar el efecto que presenta tanto ergosterol como colesterol sobre los dominios y la membrana en general. Se busca determinar las diferencias estructurales y mecánicas generada por colesterol y ergosterol. Además, se busca relacionar dichas diferencias a la acción diferenciada de antimicóticos poliénicos sobre membranas celulares de hongo y de mamífero. Para ello es necesario comprender las diferencias entre las membranas de interés y cómo estudiarlas.

### **1.3. La Membrana Celular**

La célula es capaz de mantener un ambiente diferente a su alrededor. Esta capacidad, denominada homeostasis, se debe a muchos factores entre los cuales uno muy importante es la membrana celular que divide el interior de la célula del exterior. La membrana celular también cumple una función como punto de anclaje de algunas proteínas de membrana, las cuales a su vez cumplen funciones vitales para la célula. En años recientes se ha sugerido que la membrana no es solo una barrera pasiva, sino que juega un papel activo en funciones vitales para la célula. Por ejemplo la dinámica del citoesqueleto de actina, la cual es indispensable para la motilidad de la célula (Sens y Plastino, 2015). Es por eso por lo que en los últimos años ha surgido un renovado interés por estudiar las propiedades composicionales, estructurales y fisicoquímicas de la membrana celular como parte activa del sistema celular.

La membrana celular está compuesta por lípidos y proteínas, en proporciones por masa de aproximadamente 40% y 60% respectivamente, aunque estas proporciones varían entre diferentes tipos de células. El mayor componente en número son los lípidos y éstos pueden formar una bicapa sin la presencia de las proteínas, por lo cual se les considera el andamio para la formación de la membrana celular. Los lípidos se auto-ensamblan en una bicapa en presencia de agua. Esto se debe al carácter anfipático de los lípidos (ver figura 6) es decir, que posee una zona polar también conocida como cabeza, y una zona no polar, denominada cola. Al formar una bicapa la cabeza polar queda en contacto con el agua. Por el contrario, la cola hidrofóbica se orienta de manera que tenga un área de contacto mínima con el agua. Este efecto conocido como efecto hidrofóbico, descrito inicialmente por Tanford (Tanford, 1980), es el que permite a los lípidos auto-ensamblarse en distintas estructuras moleculares como micelas, monocapas, bicapas y liposomas y se debe a un equilibrio muy sutil entre las energías y entropías intermoleculares (Gelbart et al., 2012).

El modelo de membrana aceptado actualmente es el de mosaico fluido de Singer y Nicolson de 1972 (Singer y Nicolson, 1972) y considera a la membrana como una estructura bidimensional de proteínas en una bicapa viscosa formada de lípidos. Es decir, que las proteínas y los lípidos se mueven libremente en dos dimensiones, tanto de manera traslacional como rotacional (a lo largo del eje normal al plano de la membrana). Este modelo se ha enriquecido enormemente a través del estudio y caracterización de membranas con múltiples técnicas experimentales y teóricas como los distintos modelos de membrana y las simulaciones de Dinámica Molecular (Israelachvili, 1977; Escribá y Nicolson, 2014; Goñi, 2014; Nicolson, 2014; Bennett et al., 2018).

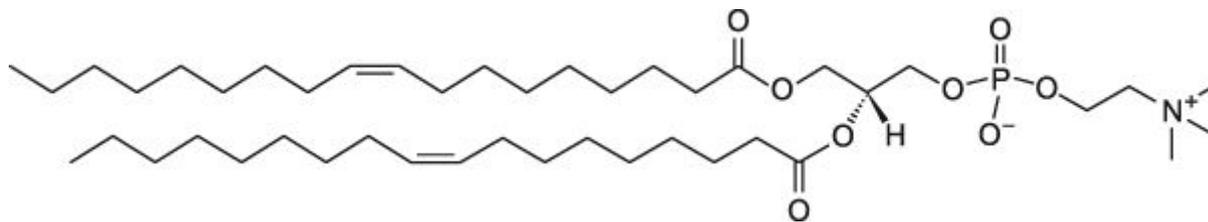


Figura 6. Estructura molecular en dos dimensiones del dioleoilfosfatidilcolina (DOPC). El fosfolípido está compuesto por una fosfocolina, un glicerol y dos ácidos grasos. La fosfocolina se denomina cabeza y es una zona polar mientras que los ácidos grasos se denominan colas y son no-polares. El glicerol ( $\text{HOCH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$ ) es la parte central ya que une la cabeza con las colas. Se observa que ambas colas presentan una insaturación.

En la última década se ha observado un fenómeno que complementa el modelo de mosaico fluido es la existencia de balsas lipídicas en células (Simons y Ikonen, 1997; Lichtenberg et al., 2013; Nicolson, 2014). Las balsas lipídicas siguen siendo tema de discusión, aunque hasta ahora se acepta que son nanodominios enriquecidos en esfingolípidos y colesterol dentro de la membrana celular (*in vivo*) y que tienen un tiempo de vida muy corto (McMullen et al., 2004; Goñi, 2019). La composición exacta sigue siendo tema de debate, en particular el enriquecimiento en colesterol (Frisz et al., 2013; Kraft, 2013), así como el tiempo de vida y las dimensiones de estos nanodominios. Se cree que estas estructuras fugaces tienen un papel importante en diversos procesos biológicos favoreciendo la inserción de ciertas moléculas como proteínas (Sezgin et al., 2017).

Las balsas lipídicas hasta el momento son propias de células de mamífero, las cuales tienen colesterol como su principal esteroide. Sin embargo, en células de hongos se ha observado un fenómeno parecido. En la membrana de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, se han observado dominios enriquecidos en esfingolípidos. La presencia o ausencia de ergosterol dentro de los dominios sigue siendo debatida ya que hay evidencia en favor de ambos casos (Klose et al., 2010; Aresta-Branco et al., 2011b). Además, hay evidencia de que ergosterol favorece la formación de este tipo de dominios, enriquecidos en lípidos saturados, en mayor medida de lo que lo hace colesterol (Xu et al., 2001).

La aparición o formación de dominios también se observa en membranas modelo en donde se tiene un lípido saturado y otro insaturado, por ejemplo, DPPC y DOPC. La diferencia en la temperatura de transición líquido-gel de estos lípidos genera una segregación de fases. La aparición de segregación de fases en diferentes mezclas lipídicas ha suscitado interés en su estudio. En particular se estudian los posibles efectos que esta segregación podría tener en procesos de relevancia biológica como por ejemplo la inserción de proteínas en la membrana, en analogía a la probable función de las balsas lipídicas en células. Aunque las mezclas que presentan segregación o coexistencia de fases son aquellas que tienen un lípido con temperatura de transición alta ( $>35^\circ\text{C}$ ) y otro con temperatura de transición baja ( $<0^\circ\text{C}$ ) se conoce y acepta la coexistencia de fases en algunas mezclas binarias. En particular para lípidos cuya temperatura de transición es alta en conjunto con esteroides como colesterol. Una mezcla muy estudiada es DPPC/colesterol. El colesterol licúa el DPPC de manera que la bicapa presenta coexistencia de fases gel-líquido ordenado (de Lange et al., 2007; Suga y Umakoshi, 2013). En mezclas binarias de lípidos de baja temperatura de transición y esteroide, la idea de coexistencia de fases es aún tema de debate. Sin embargo,

hay evidencia tanto experimental como de simulaciones que proponen que pudiera existir. El grupo de Manuel Prieto propone un diagrama de fase para las mezclas POPC/colesterol y POPC/ergosterol en donde se observa una región de coexistencia de  $l_d+l_o$  para ambas mezclas (de Almeida et al., 2003; Silva et al., 2006). El diagrama de fase fue estudiado mediante simulaciones de dinámica molecular para la mezcla POPC/colesterol y los autores encontraron en la región de coexistencia propuesta aparece una heterogeneidad en la membrana cuya naturaleza es estadística (Favela-Rosales et al., 2019). Esta heterogeneidad no se observa en las otras regiones del diagrama de fase propuesto. La posible existencia de una fase mixta en mezclas binarias de colesterol con lípidos de baja temperatura de transición abre el debate sobre el origen de la formación de nanodominios y balsas lipídicas.

### ***1.3.1. Modelos para el estudio de la membrana celular***

Existen diversos modelos que permiten el estudio de las propiedades de las membranas lipídicas simples. Entre estos modelos destacan las vesículas, la monocapas de Langmuir-Blodgett, bicapas pintadas o flotadas (bicapas formadas sobre un poro) y las bicapas soportadas (bicapas formadas sobre un sustrato sólido).

La obtención de vesículas de diferentes composiciones sirve como modelo de una membrana celular en una geometría similar, una esfera. Para su preparación se aprovecha el efecto hidrofóbico y en general estas técnicas recurren a hidratar capas de lípido que se auto-ensamblan en bicapas y se cierran en forma de esferas. Se pueden obtener vesículas de diferentes tamaños, así como de una o varias bicapas (unilamelares o multilamelares). Dependiendo de su tamaño, las vesículas unilamelares se pueden clasificar en vesículas pequeñas (SUV), grandes (LUV) y gigantes (GUV). Las SUVs poseen diámetros menores a 100 nm, las LUV entre 100 nm y 1  $\mu\text{m}$  y las GUV mayores a 1  $\mu\text{m}$ . Las vesículas gigantes se pueden observar mediante microscopía de fluorescencia (Veatch y Keller, 2002; Bagatolli, 2006; Morales-Pennington et al., 2010). Mediante Microscopía de Fuerza Atómica se pueden medir las propiedades elásticas de las vesículas (Schäfer et al., 2015).

Las bicapas soportadas sobre sustrato sólido (SLB) (Brian y McConnell, 1984; Richter et al., 2006) consisten en depositar una bicapa lipídica sobre un sustrato como vidrio o mica. Este modelo se ha vuelto muy popular para estudiar formación de dominios (Mou et al., 1995b), interacción entre membranas (Kaizuka y Groves, 2004) y adsorción de proteínas (Andree et al., 1992) entre otros. En las últimas dos décadas han surgido variaciones como bicapas soportadas por polímeros (Goennenwein et al., 2003), bicapas flotadas (Römer et al., 2004), bicapas híbridas (Silin et al., 2002) y vesículas soportadas (Yoshina-Ishii y Boxer, 2003). Este trabajo utilizará el modelo de bicapas soportadas sobre mica ya que se pretende evaluar el efecto de colesterol o ergosterol sobre la morfología de dominios.

### ***1.3.2. Bicapas soportadas sobre un sustrato sólido***

Las bicapas soportadas son estructuras lipídicas formadas o depositadas sobre un sustrato sólido como vidrio o mica, ver figura 8. Este sistema modelo ofrece la ventaja de observar la

interacción de la bicapa con moléculas de interés como proteínas o toxinas (Andree et al., 1992; Maté et al., 2014).

Existen dos métodos básicos para formar bicapas soportadas. Uno es por deposición o transferencia de una monocapa de lípidos a un sustrato sólido. Para este método se sumerge (retira) el sustrato a través de una monocapa de Langmuir de la composición deseada de manera que la monocapa se transfiere al sustrato y posteriormente se vuelve a cruzar la interfase en sentido inverso (retirar/sumergir), transfiriendo una nueva monocapa. El resultado es una bicapa sobre el sustrato. La transferencia se puede hacer con el sustrato en posición vertical respecto a la monocapa, método de Langmuir-Blodgett (Tamm y McConnell, 1985), o de manera horizontal, método de Langmuir-Schaefer (Li et al., 2008). La figura 7 muestra un esquema de este proceso. Otro método es por fusión de vesículas (Kalb et al., 1992; Mou et al., 1994a; Richter et al., 2003). En este método se prepara una suspensión liposomal con la mezcla de lípidos deseada. Se deposita una gota de suspensión sobre el sustrato sólido y se deja incubar. Las vesículas se adsorben sobre la superficie del sustrato y posteriormente se rompen, formando una bicapa sobre la superficie como se observa en la figura 8.

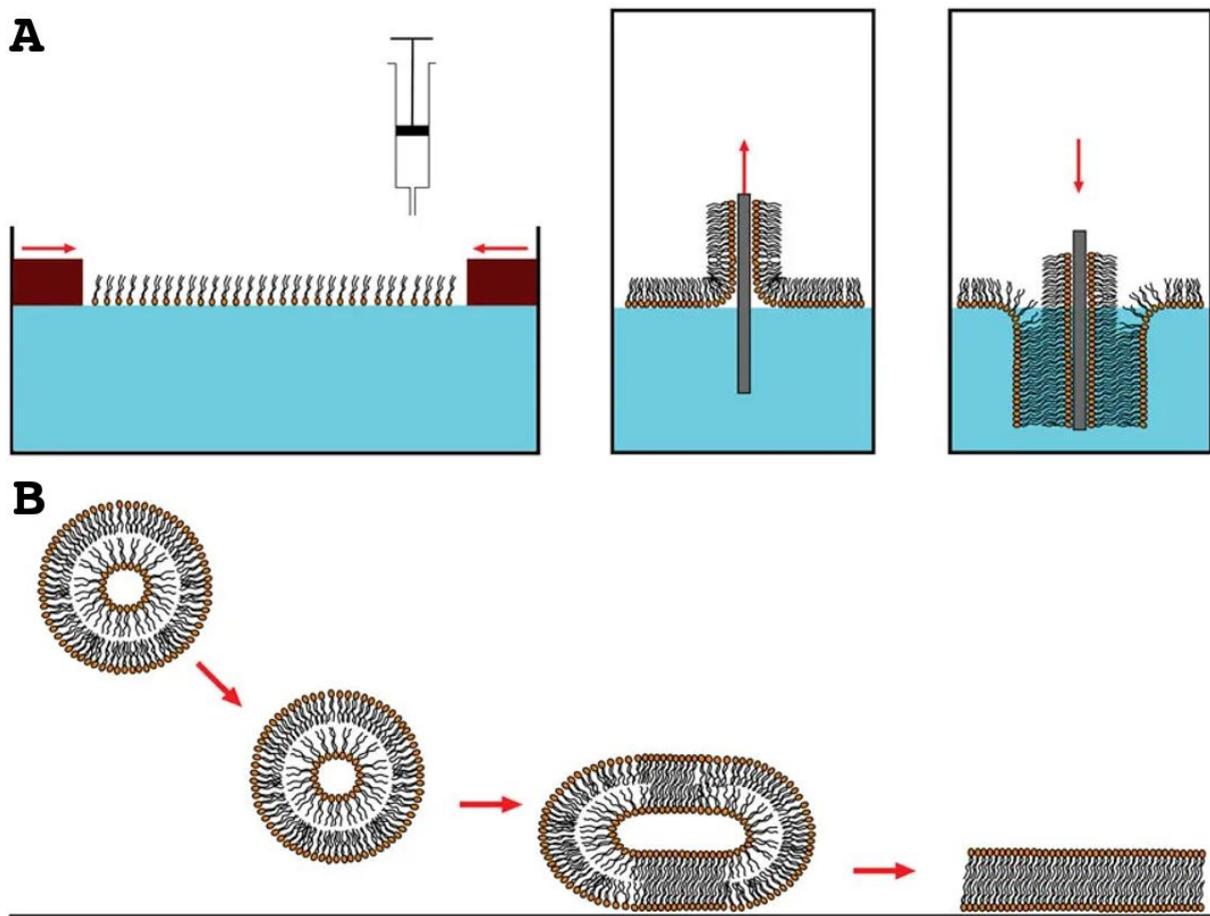


Figura 7. Esquema representativo de la obtención de bicapas soportadas sobre un sustrato sólido mediante (A) monocapas de Langmuir (Langmuir-Blodgett) y (B) fusión de vesículas. Imagen adaptada a partir de la publicada por Mingeot-Leclercq y colaboradores (Mingeot-Leclercq et al., 2008)

Para lograr una buena fusión de las vesículas sobre la mica es necesario controlar la cantidad de lípidos que se utilizan, la salinidad de las soluciones a usarse y la temperatura de incubación de las vesículas sobre la mica. Hasta ahora no se sabe el mecanismo exacto que logra fusionar una vesícula que está flotando libremente en el medio y de la cual se obtiene una bicapa sobre un sustrato sólido. Existen varias hipótesis sobre este mecanismo que es dependiente de los lípidos involucrados, el tipo de sustrato y el medio de incubación (Jass et al., 2000; Richter et al., 2003; Lind et al., 2014; Lind y Cárdenas, 2016). La figura 9 muestra los diferentes mecanismos que podría seguir una vesícula para formar una bicapa sobre el sustrato.

Una vez que se obtiene una bicapa soportada se puede observar mediante microscopía de fluorescencia (Lin et al., 2006), electrónica (Mornet et al., 2005) o de fuerza atómica (Mou et al., 1994a; Rinia et al., 2001; Richter et al., 2003). Esta última es la herramienta que se usará en este trabajo para observar y obtener mediciones de las bicapas soportadas de interés y poder observar su morfología y medir sus propiedades mecánicas gracias a la resolución que se obtiene mediante AFM. Aunque existe una dura crítica al uso de bicapas soportadas sobre sustratos sólidos debido a la influencia que podría ejercer este último sobre las propiedades estructurales de la membranas, un estudio reciente de dinámica molecular encontró que los dominios presentes en bicapas soportadas y bicapas flotadas son bastante similares (Ranz, 2015). Aunque la difusión se ve reducida en gran medida en la bicapa soportada, otros parámetros como ordenamiento y grosor no. La mayor diferencia observada es el orden de la monocapa en contacto con el sustrato, ya que en esta región intermedia se encuentra agua atrapada. A temperaturas menores a 310 K estas moléculas están ordenadas, pero a 310 K las moléculas se desordenan y provocan corrugación de la bicapa. Aun así, se puede concluir que los dominios presentes en la bicapa soportada se comportan de manera muy similar a una bicapa flotada.

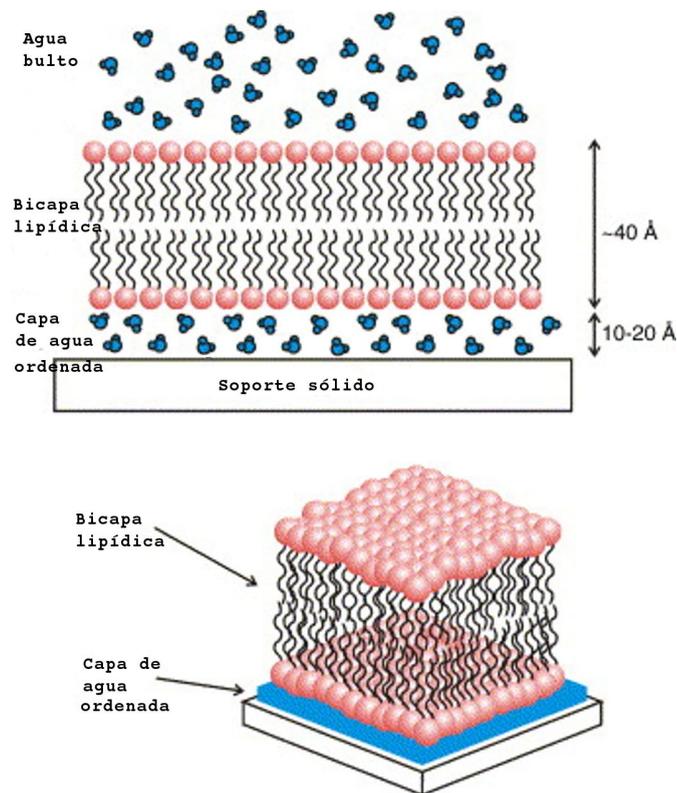


Figura 8. Caricatura representativa de la estructura de una bicapa soportada sobre un sustrato sólido. La bicapa no está en contacto directo con el sustrato, existe una capa de agua de una o dos moléculas de espesor. Imagen adaptada a partir de la publicada por Catellana y Cremer (Castellana y Cremer, 2006)

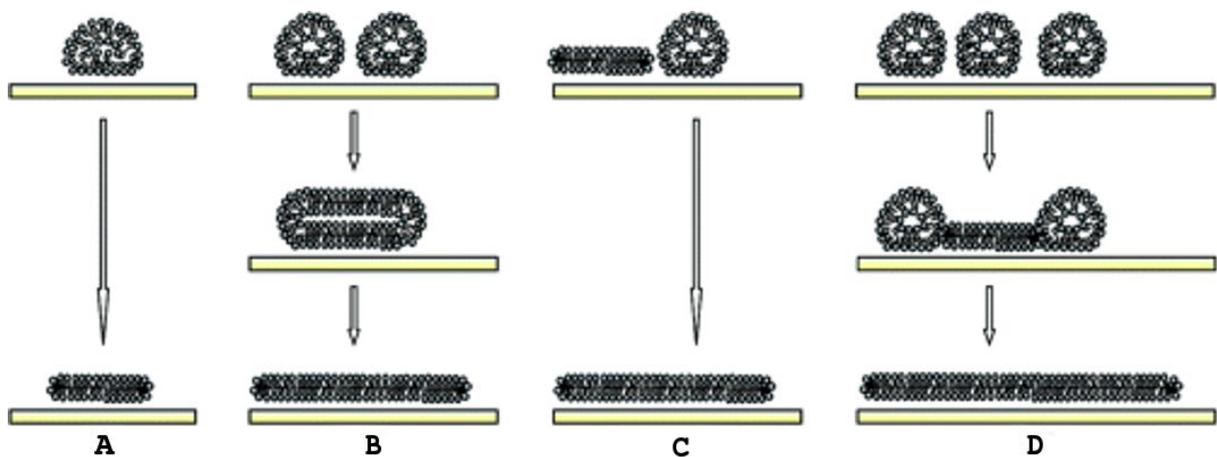


Figura 9. Posibles rutas que sigue una vesícula para formar una bicapa soportada. A) Una vesícula adsorbida rompe espontáneamente debido a la interacción con el sustrato; B) se adsorben las vesículas al sustrato, se fusionan y eventualmente rompen por la tensión en los bordes; C) una vesícula adsorbida rompe debido a la interacción con el borde de una bicapa; D) la tensión ejercida por varias vesículas provocan que una vesícula vecina rompa (cobertura vesicular crítica) como consecuencia de la formación de una bicapa las demás vesículas rompen por la interacción con el borde, como en el caso (C). Imagen adaptada a partir de la publicada por Richter y colaboradores (Richter et al., 2006)

Con el concepto de balsa lipídica en células y la observación de segregación de fases en membranas modelo, se refuerza la idea del papel activo de la membrana en los procesos biológicos. En este rol activo se cree que las propiedades estructurales de la membrana determinan fenómenos biológicos y además la célula es capaz de modular la estructura mediante composición. Como ya se mencionó en la sección anterior, un fenómeno que se sospecha es regulado por la membrana es la acción diferenciada de los antibióticos poliénicos sobre bicapas modelo de POPC y ergosterol contra bicapas compuestas de POPC y colesterol (González-Damián y Ortega-Blake, 2010). Las causas por las cuales esto sucede siguen sin ser esclarecidas. Este trabajo busca obtener más información y proponer un mecanismo molecular por el cual sucede la selectividad de los polienos. Para ello, se extendió el estudio de bicapas de POPC con ergosterol o colesterol a mezclas que presenten segregación de fases y por lo tanto presencia de dominios. Se utilizó la mezcla POPC/esfingomielina de huevo (eSM) en una proporción molar 1/1 que se sabe presenta segregación de fases para preparar bicapas soportadas sobre mica. Esta mezcla se preparó con diferentes concentraciones molares de ergosterol o colesterol en busca de diferencias en el efecto de cada esteroide sobre la morfología y propiedades de los dominios. Las distintas bicapas obtenidas se estudiaron mediante microscopía de fuerza atómica, una herramienta muy versátil que se ha vuelto muy útil para estudiar muestras biológicas.

#### **1.4. Estudio de bicapas lipídicas mediante microscopía de fuerza atómica.**

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una técnica basada en el barrido de una superficie de interés mediante una sonda. Entre sus ventajas se encuentra una resolución que sobrepasa el límite de resolución de la microscopía óptica convencional (~200 nm). Al usarse para barrer muestras sólidas en alto vacío se puede obtener una resolución de ángstroms. En muestras en aire o incluso en agua la resolución es de algunos nanómetros, lo cual sigue siendo bastante aceptable para muchas aplicaciones.

Las bicapas soportadas fueron de los primeros sistemas biológicos que estudiaron mediante esta AFM ya que permite la obtención de imágenes de alta resolución, tanto de las bicapas como de moléculas de interés que se adsorben a ellas (Mou et al., 1994a, 1994b, 1995a). El manejo del AFM en condiciones acuosas que, aunque tiene ciertas complicaciones, no es tan complejo y la fácil preparación de bicapas soportadas sobre mica o vidrio hacen de este sistema uno muy atractivo. En los últimos años este modelo de membrana ha sido muy útil para el estudio de la interacción de biomoléculas con la bicapa, como toxinas o ADN (Maté et al., 2014; Nelson y Schwartz, 2018; Sudhakar et al., 2019), así como el estudio de la estructura y coexistencia de fases en bicapas dependiendo de su composición (Ip et al., 2010; Alessandrini y Facci, 2014; Borrell et al., 2017; Maekawa et al., 2019). Debido a estas ventajas y facilidades, en este trabajo se utilizó este modelo de membrana y la técnica de AFM.

##### ***1.4.1. Uso para el estudio de segregación de fases en bicapas lipídicas.***

La segregación de fases es un fenómeno que se observa en bicapas lipídicas al mezclar un lípido cuya temperatura de transición de fase principal es alta (> 30°C) con uno cuya temperatura de transición es baja (< 10°C). Por ejemplo, la temperatura de transición de DOPC es de -17°C mientras que para DPPC es de 41°C. Una bicapa compuesta de

DOPC/DPPC en una razón equimolar presentará una segregación de fase a temperatura ambiente simplemente porque a esta temperatura DOPC se encuentra en estado líquido y DPPC se encuentra en un estado de gel. A esta segregación de fases también se le conoce como formación de dominios (referente a las regiones de gel) o coexistencia de fases.

Debido a la diferente fase de cada lípido, en la bicapa surgen zonas de grosores diferentes, siendo la región en fase gel más gruesa que la región en fase líquido. La diferencia de grosor entre estas regiones es del orden de 1 nm, lo que hace su estudio mediante AFM muy adecuado. Para lograr observar estas diferencias de grosor, o de altura en el caso del AFM, es necesario que la muestra sea plana y esté inmóvil. Es por eso por lo que las bicapas SLB son un modelo perfecto para ser estudiado mediante AFM. Como se mencionó antes, el grosor de la bicapa se traduce en altura al medir con AFM y por lo tanto las imágenes que se obtienen muestran regiones que se encuentran ~ 1 nm por encima del resto de la muestra. Este fenómeno se ha estudiado mucho en las últimas dos décadas, tanto las causas como sus efectos sobre procesos de relevancia biológica (McKiernan et al., 2000; Ratto y Longo, 2002; Lin et al., 2006; García-Arribas et al., 2015, 2016a, 2016b).

El acceso a un equipo de AFM y la gran utilidad de SLB como modelo de membrana motivó su uso en este trabajo en el cual se busca determinar el efecto de agregar colesterol o ergosterol a una bicapa equimolar de POPC/eSM.

#### ***1.4.2. Medición de la fuerza de ruptura en bicapas soportadas.***

Otra ventaja que ofrece la AFM es el estudio de propiedades mecánicas de la muestra mediante curvas de fuerzas contra distancia (FvD). De ahí se pueden obtener parámetros como constante de resorte, módulo de Young o energía de adhesión entre otros. En el caso de bicapas soportadas un parámetro muy útil para caracterizar sus propiedades mecánicas es la fuerza de ruptura, esto es la fuerza que se requiere aplicar con la punta de la micropalanca para atravesar la bicapa, o una monocapa (Alessandrini et al., 2011; Kaufmann et al., 2011). Se ha encontrado que la fuerza de ruptura cambia con la composición de la bicapa. Asakawa y Fukuma encontraron que una bicapa de DPPC tiene una fuerza de ruptura mayor que una compuesta por DPPC/colesterol (Asakawa y Fukuma, 2009). Además, otros factores como iones en solución pueden afectar esta medición (Fukuma et al., 2007). En este trabajo se busca medir la fuerza de ruptura de bicapas compuestas por una mezcla equimolar de POPC/eSM con y sin esteroides (ergosterol o colesterol) en busca de diferencias. A continuación, se describe con mayor detalle el funcionamiento del microscopio de fuerza atómica.

### **1.5. Microscopía de fuerza atómica**

La microscopía de fuerza atómica o AFM por sus siglas en inglés, se utiliza para estudiar propiedades estructurales de superficies a nivel nanométrico o incluso de ángstroms (Å). La microscopía de fuerza atómica forma parte de las técnicas conocidas como SPM (Scanning Probe Microscopy) que incluyen entre otros a la microscopía de escaneo por efecto túnel (STM), la microscopía de fuerza electrostática (EFM) y la microscopía por barrido de conductancia iónica (SICM). Las técnicas SPM obtienen imágenes de superficies

utilizando una sonda física que escanea la muestra deseada. La sonda utilizada para AFM se denomina **micropalanca** y obtiene información topográfica de la superficie que posteriormente convierte en una imagen digital. El éxito de este tipo de técnica es el circuito de retroalimentación, en donde se mantiene constante alguno de los parámetros medibles (deflexión, fuerza o inclinación) mediante desplazamientos verticales de la sonda. Además de la obtención de imágenes AFM es capaz de obtener datos de las propiedades elásticas de un material mediante curvas de fuerza contra distancia (FvD) siguiendo la ley de Hooke y el modelo de Hertz en una aproximación lineal o modelos más complejos como los de Johnson-Kendall-Roberts (JKR), Derjaguin-Muller-Toporov (DMT) y el de Canham-Helfrich.

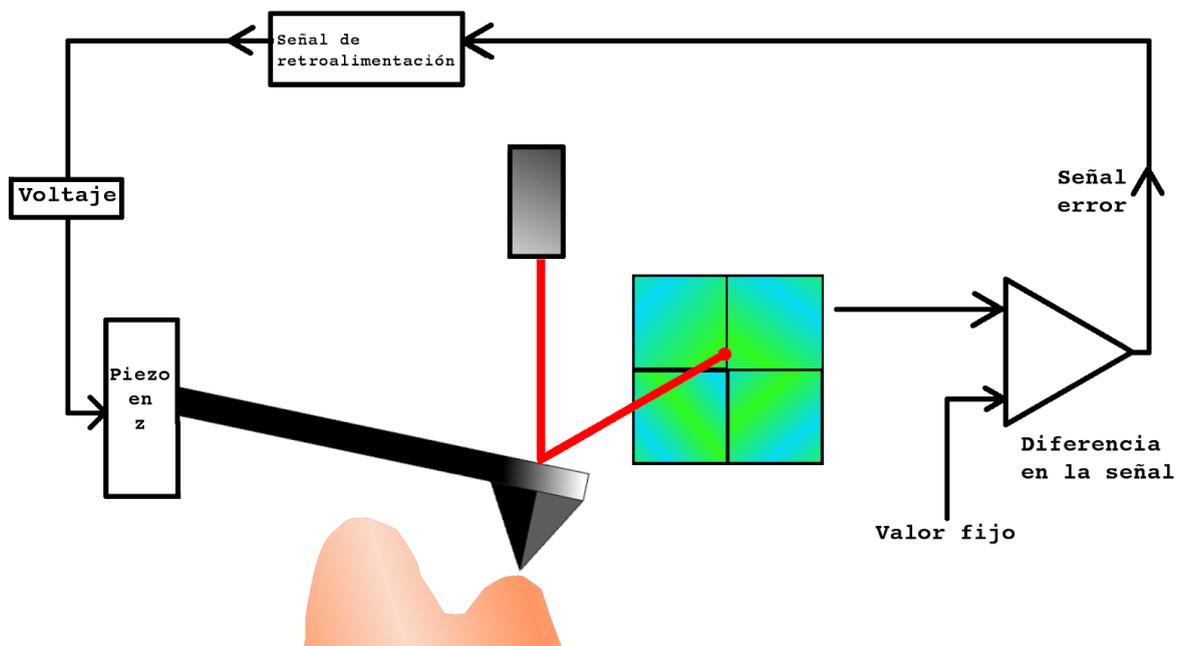


Figura 10. Esquema de la configuración del AFM. El láser se dirige a la micropalanca, este lo refleja hacia el fotodetector. El circuito compara la señal con el valor fijo definido por el usuario (fuerza, amplitud o frecuencia de referencia). Se genera una señal error y el sistema de retroalimentación envía una señal al piezo eléctrico para corregir esta señal error.

### 1.5.1. Funcionamiento

#### Fuerzas entre la punta y la muestra

La técnica de AFM utiliza una sonda llamada micropalanca, la cual consiste en una palanca de dimensiones micrométricas que cuenta con una punta de diámetro entre 5 y 30 nm en su extremo. La geometría de la punta varía dependiendo la aplicación buscada. Existen geometrías de pirámide invertida, cónicas y esféricas, estas últimas con diámetros de micrómetros. La técnica de AFM se basa en medir las fuerzas de interacción entre la punta y la superficie de la muestra para obtener información de la topografía de dicha superficie gracias a un circuito de retroalimentación y un sistema de posicionamiento compuesto de piezoeléctricos que permiten desplazamientos muy finos, del orden de ángstroms, ver figura 10.

## Fuerzas punta-muestra

En la figura 11 se presenta una curva que muestra cualitativamente las fuerzas que rigen la interacción entre la punta y la superficie que incluyen tanto fuerzas de largo como de corto alcance. A distancia lejanas, mayores a 3 veces las distancias típicas del sistema, no hay interacción, las fuerzas tienden a cero. A medida que la distancia interatómica se reduce, surge una interacción atractiva gobernada por fuerzas de Van der Waals. Las fuerzas de Van der Waals son aquellas que se establecen entre átomos neutros o moléculas sin momento dipolar permanente, pero polarizable. Así las interacciones de Van der Waals son atractivas y se dan entre dipolos eléctricos. En esta región de la curva de fuerza contra distancia es en donde se realizan mediciones en el modo denominado de no contacto o dinámico que se trata más adelante. Cuando la distancia interatómica se reduce lo suficiente surge un traslape entre las funciones de onda electrónica de la capa de electrones más externa los átomos que implica una fuerza de corto alcance que puede ser atractiva o repulsiva. Al alcanzar una distancia crítica el traslape ya no es sólo de las capas electrónicas más externas sino de las capas internas que se encuentran en capa cerrada, por lo cual surge una repulsión electrónica más fuerte que la atracción de Van der Waals (ver línea punteada vertical color verde en la figura 11). Esta repulsión se debe no sólo a interacciones electrostáticas sino además al principio de exclusión de Pauli. Un tratamiento más profundo de estas interacciones implica necesariamente el uso de mecánica cuántica y la ecuación de Schrödinger, sin embargo, en este trabajo no se ahonda en el detalle de estas interacciones que ya han sido descritas en la literatura. Además, este tratamiento no es necesario para el estudio que se llevará a cabo en donde se obtendrán imágenes topográficas de superficies de gran tamaño sin detalle atómico. En esta región se barre la superficie de la muestra en lo que se denomina modo de contacto donde la punta y la muestra están en contacto físico.

Dada la dificultad para resolver la ecuación de Schrödinger para un sistema multi electrónico, se recurre a potenciales modelo. Uno de los más utilizados es el potencial de Lennard-Jones en donde las interacciones atractivas de largo alcance (Van der Waals) se modelan como proporcionales a  $1/r^6$  y las interacciones repulsivas de corto alcance proporcionales a  $1/r^{12}$ . De modo que el potencial es:

$$U_{LJ} = 4U_0 \left[ \left( \frac{R_0}{r} \right)^{12} - \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \right],$$

donde  $U_0$  es la profundidad del pozo de potencial,  $R_0$  es la distancia a la cual el potencial se vuelve cero y  $r$  es la distancia entre átomos o en el caso que nos compete, la distancia entre la punta y la muestra. La figura 11 muestra el potencial tipo Lennard-Jones y la fuerza asociada a este potencial ( $F = -dU(r)/dr$ ).

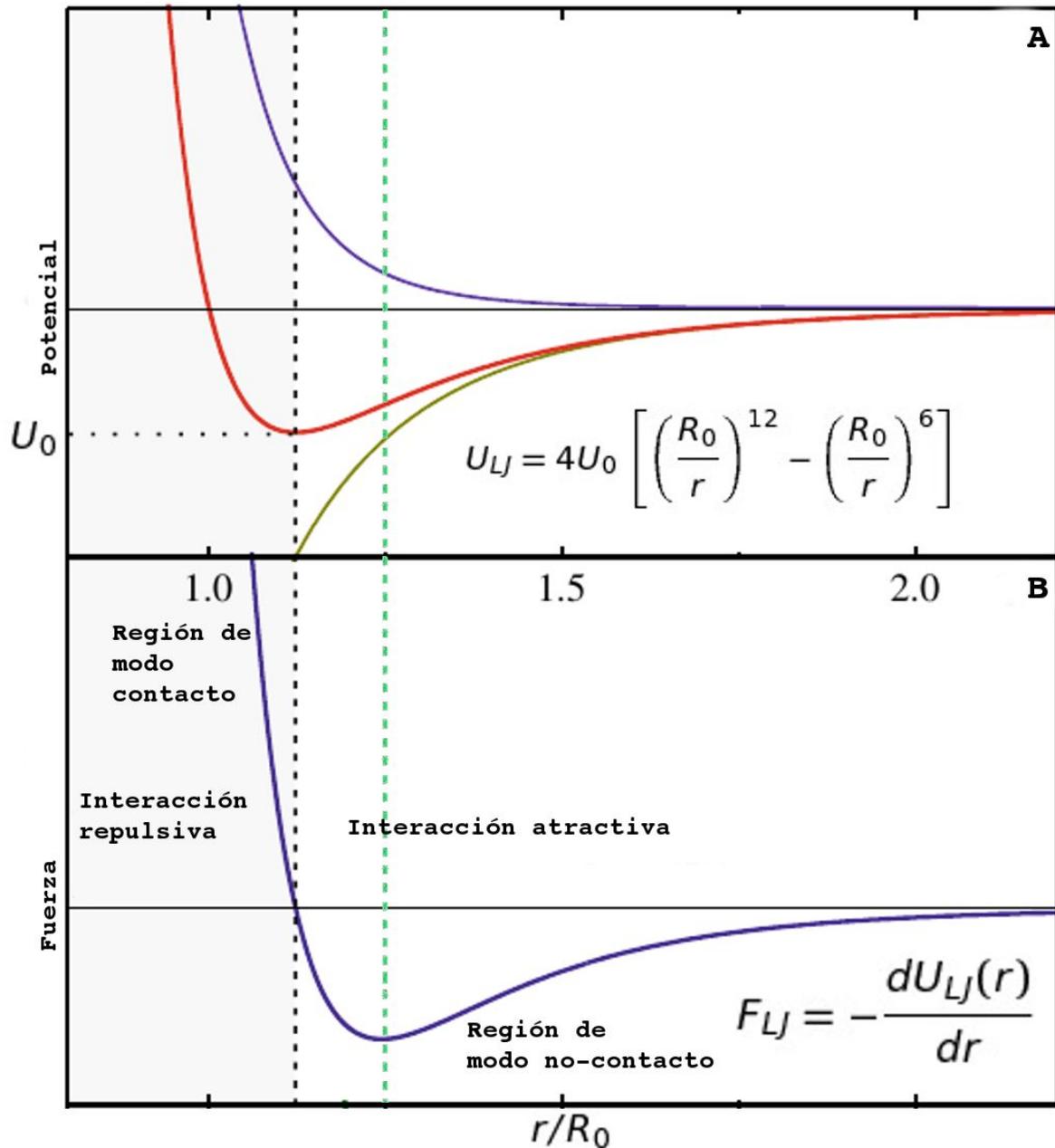


Figura 11. Representación gráfica del potencial de Lennard-Jones (A) y las fuerzas (B) que gobiernan la interacción entre átomos, en nuestro caso los de la punta de la micropalanca y la superficie de la muestra. Las fuerzas involucradas dependen de la distancia. En el panel (A) la línea color olivo y la línea azul corresponden a la parte atractiva y repulsiva del potencial respectivamente. A distancia largas dominan las fuerzas de Van der Waals, atractivas y de largo alcance, mientras que al llegar a una distancia crítica ( $dF_{LJ}/dr = 0$ ), línea punteada color verde, las fuerzas de corto alcance comienzan a dominar, repulsión electrostática y de Pauli. Al llegar el potencial al valor mínimo ( $U_0$ ), línea punteada color negro, la fuerza de interacción se vuelve completamente repulsiva. Figura adaptada a partir de la publicada por Voigtländer (Voigtländer, 2019a).

## Mecánica del contacto punta-muestra

Cuando la distancia entre la punta y la muestra es tal que las fuerzas de interacción son repulsivas, surge un efecto adicional a la repulsión de las funciones de onda electrónicas. Hay un reacomodo de los átomos dentro de la estructura sólida, es decir, hay una deformación. El grado de deformación depende de las propiedades elásticas del material en cuestión. En 1882, Hertz introdujo un modelo para describir el contacto y la deformación de dos cuerpos elásticos esféricos. El modelo contempla las siguientes suposiciones: i) Los esfuerzos son pequeños y dentro del límite elástico; ii) El área de contacto es pequeña con respecto al tamaño de los cuerpos, i.e. se considera que cada cuerpo es un semi-espacio; iii) No hay fricción, iv) Las superficies son continuas y no-conformantes (esto implica que el área de contacto es mucho menor que las dimensiones características de los cuerpos involucrados) y v) no hay adhesión entre los cuerpos. Este modelo permite determinar profundidades de indentación y área de contacto entre cuerpos de diferentes geometrías. Las cinco más utilizadas son: i) Contacto entre una esfera y un semi-plano elástico; ii) contacto entre dos esferas; iii) contacto entre dos cilindros con ejes paralelos; iv) contacto entre un cilindro rígido y un semi-plano elástico y v) contacto entre un indentador cónico y un semi-plano elástico. Para mediciones de AFM el primero y el último caso son los de interés. Aunque basta con estudiar el caso del contacto entre una esfera y un semi-plano ya que las puntas de AFM disponibles no tienen un extremo puntual, i. e. siempre se puede aproximar a una esfera.

Cuando una esfera de radio  $R$  entra en contacto con un semi-plano elástico el material se deforma una distancia  $z$  de su posición de equilibrio. Considerando el punto de equilibrio como  $z_0$  el modelo de Hertz predice una fuerza de respuesta por parte del material como:

$$F_{Hertz}(z) = \frac{4}{3} E^* \sqrt{R} (z_0 - z)^{3/2},$$

donde  $z < z_0$  y  $z_0 - z = \delta$  es la indentación y  $E^*$  es el módulo de Young del sistema punta-muestra:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \nu_{punta}^2}{E_{punta}} + \frac{1 - \nu_{muestra}^2}{E_{muestra}},$$

con  $E_i$  y  $\nu_i$  el módulo de Young y la razón de Poisson respectivamente. Recordemos que el módulo de Young es una medida de la rigidez de un material ya que relaciona la tensión ejercida sobre un cuerpo con su deformación en un régimen de deformación lineal. La razón de Poisson es aquella entre el esfuerzo longitudinal y transversal de un material. Para deformaciones pequeñas se puede obtener de la expansión transversal y la compresión longitudinal. Para material biológico se utiliza una razón de 0.5.

Derjaguin, Muller y Toporov extendieron el modelo de Hertz de manera que incluyó fuerzas atractivas (Van der Waals) y es conocido como el modelo DMT. La forma funcional de la fuerza queda definida para dos regiones: i) Dentro de la zona de contacto y ii) fuera de

ella. Así, cuando una punta esférica de radio  $R$  no ha entrado en contacto con la muestra ( $z \geq z_0$ ):

$$F_{DMT}(z) = F_{vdW} = -\frac{HR}{6z^2}.$$

Mientras que en la región de contacto ( $z < z_0$ ):

$$F_{DMT}(z) = F_{Herzt} + F_{vdW} = \frac{4}{3}E^*\sqrt{R}(z_0 - z)^{3/2} - \frac{HR}{6z_0^2}.$$

En estas ecuaciones  $H$  es la constante de Hamaker que está relacionada con la densidad atómica de la punta y del material ( $\rho$ ) así como con la constante de atracción por pares entre átomos del potencial de Van der Waals,  $U_{vdW}(r) = -C/r^6$ . De manera que  $H = \pi^2 C \rho_{punta} \rho_{muestra}$ . El modelo DMT es válido para materiales duros con energías de superficie bajas (esto es la energía en exceso de la superficie en comparación con la que tendría en bulto), radio de la punta pequeño y adhesión independiente de la profundidad de indentación (Tabor, 1977).

Existen otros modelos como el de Johnson-Kendall-Roberts (JKR) considera la fuerza de adhesión de corto alcance (Johnson et al., 1971). A diferencia del modelo DMT las fuerzas de adhesión sólo ocurren dentro del área de contacto. Aunque no se discutirá este ni otros con más detalle ya que no se requieren para el desarrollo de esta tesis. Sin embargo, conocer el régimen en el que se encuentra la interacción punta-muestra es muy útil para la obtención de imágenes topográficas, ya que dependiendo del régimen se pueden utilizar diferentes modos de operación.

#### Modos de obtención de imágenes topográficas

Existen diferentes modos de operar en AFM que permiten la obtención de imágenes topográficas de la superficie de la muestra bajo estudio. En general, y de manera más formal, estos modos se pueden dividir en dos grupos: i) modo estático y ii) modo dinámico. La principal diferencia es que en el modo dinámico la micropalanca es obligada a oscilar. En ambos casos la punta de la micropalanca puede encontrarse en un régimen atractivo o repulsivo, dependiendo de la distancia punta-muestra como se presentó en la figura 11. Cuando nos encontramos en un régimen repulsivo la punta y la muestra están en contacto, mientras que en el régimen atractivo no. Esta es la manera más común de describir los modos de operación de un equipo de AFM para la obtención de imágenes topográficas y será como se presenten en este trabajo.

### Modo de contacto

En el modo de contacto la punta de la micropalanca se encuentra en un régimen repulsivo respecto a la muestra. Además, este modo se lleva a cabo en modo estático, es decir la micropalanca no se encuentra oscilando.

Este modo funciona mediante la procuración de una fuerza constante entre la punta de la micropalanca y la muestra. Se escoge cierto valor fijo de la fuerza, que corresponde a un desplazamiento de la micropalanca,  $\Delta z$ . Electrónicamente, esto consiste en mantener cierto valor de la deflexión que se mide en el fotodetector PSPD,  $\Delta V$ . Este valor se mantiene mediante el circuito de retroalimentación, de manera que cuando la fuerza cambia, por ejemplo, en un escalón, la deflexión se ve modificada y el circuito de retroalimentación ajusta el valor de la posición vertical a modo de recuperar el mismo valor de deflexión. Una imagen topográfica se genera a partir de los desplazamientos en cada punto del barrido de la muestra.

En este modo, además de la topografía se puede registrar la señal del ángulo de torsión de la micropalanca, es decir, que tanto se desvía en la dirección x-y. Esto brinda información de la fricción o arrastre que existe entre la punta y la muestra y es muy útil cuando se sabe que la muestra consta de dos materiales con rugosidad diferente. Esta diferencia de rugosidad se verá reflejada como una diferencia en la inclinación de la micropalanca, ver figura 12.

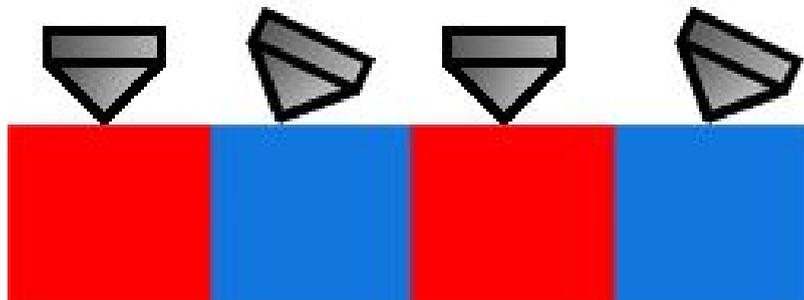


Figura 12. Esquema que representa el cambio en la inclinación de la micropalanca al escanear una muestra con dos regiones con rugosidad diferente. La dirección de escaneo rápido es de izquierda a derecha. Se observa que al barrer sobre la superficie azul la tracción es mayor y la micropalanca se inclina.

Los problemas más comunes de este modo es un límite de resolución lateral debido a las dimensiones de la punta de la micropalanca (no puntuales) que se encuentran entre 1 -10 nm. Otro problema es el posible daño tanto a la muestra o a la punta durante varios barridos, dependiendo cual es más suave, incluso a fuerzas de contacto del orden de pN.

### Modo de no-contacto

Otro modo para obtener imágenes topográficas es el modo de no-contacto. A diferencia del modo de contacto en este modo la micropalanca realiza un escaneo sin tocar la superficie mientras oscila cerca de su frecuencia de resonancia. En este modo se tiene control sobre la amplitud de la oscilación, por lo tanto, se denomina **AM-AFM (Amplitude Modulation AFM)**. Si la distancia entre el sustrato y la micropalanca varía, la amplitud de oscilación

también cambiará debido a un cambio en la fuerza de Van der Waals entre la punta y el sustrato, ver figura 11. Al cambiar la distancia entre la punta y la muestra hay un cambio en la fuerza entre la punta y la muestra que resulta en un cambio en la frecuencia de resonancia y a su vez en un cambio en la amplitud de oscilación a esa separación. El circuito de retroalimentación entra en acción para mantener una amplitud de oscilación constante. Para lograr esto se corrige el voltaje del piezoeléctrico vertical que controla la distancia punta-muestra. Este modo permite obtener imágenes topográficas de superficies con un riesgo menor de dañar al sistema. Sin embargo, en algunos medios acuoso con sales la resolución se ve afectada debido a cambios en la difracción del haz.

Una variación del modo de no contacto que será utilizado en este trabajo es el modo de no-contacto por **modulación de frecuencia o FM-AFM** por sus siglas en inglés. Una ventaja de este modo en comparación con el de modulación de amplitud es la obtención de imágenes topográficas de mayor resolución. El modo de FM-AFM, consiste en hacer oscilar la micropalanca cerca de su frecuencia de resonancia excitando foto-térmicamente la micropalanca mediante un láser y corregir el cambio en la frecuencia de resonancia debido al cambio en la distancia punta-muestra. La excitación con láser permite una amplitud de oscilación menor que con el modo de amplitud modulada,  $\sim 0.1$  vs  $\sim 1.0$  nm, lo que permite la detección de estructuras a nivel atómico (Kobayashi et al., 2010, 2018; Fukuma et al., 2012; Miyata y Fukuma, 2018).

En los casos de AM- y FM-AFM la micropalanca oscila sobre la superficie de la muestra con amplitudes de oscilación pequeña. Al realizar un análisis del movimiento de la punta a lo largo del eje vertical  $z$  como función del tiempo tenemos que por segunda ley de Newton y por ley de Hooke:

$$F = ma = -kz.$$

Donde  $k$  es la constante de resorte de la ley de Hooke asociada a la micropalanca.

Además, podemos escribir la velocidad y la aceleración de la punta como:

$$v(t) = \frac{dz}{dt},$$

$$a(t) = \frac{d^2z}{dt^2}.$$

Por lo que la ecuación de movimiento queda como:

$$m \frac{d^2z}{dt^2} = -kz.$$

Como la micropalanca se mueve en aire o en agua agregamos un término de amortiguamiento por fricción que también incluye las pérdidas de energía de la propia

micropalanca como un resorte real. En ambos casos las pérdidas de energía se aproximan proporcionales a la velocidad ( $bv$ ) por lo cual la ecuación de movimiento se modifica como:

$$F = ma = -kz - bv,$$

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} = -kz - bv,$$

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} = -kz - b \frac{dz}{dt}.$$

Reordenando obtenemos:

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + b \frac{dz}{dt} + kz = 0,$$

$$\frac{d^2 z}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dz}{dt} + \omega_0^2 z = 0,$$

donde:

$$b = \frac{m\omega_0}{Q},$$

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m}}.$$

El término  $\omega_0$  es la frecuencia natural o modo normal y  $Q$  se llama factor de calidad y se puede obtener experimentalmente, de ahí la conveniencia de usarlo.

Finalmente, cuando se llevan a cabo mediciones en estos modos la micropalanca es forzada a oscilar cerca de su frecuencia de resonancia,  $\omega \approx \omega_0$ . Por lo cual se debe agregar este término de forzamiento  $z_f(t) = B \cos \omega t$ . Ahora la fuerza de restitución del resorte será  $F = -k(z - z_f)$ , al agregar esto a la ecuación de movimiento tenemos:

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + \frac{m\omega_0}{Q} \frac{dz}{dt} = -k(z - z_f).$$

Dividimos entre la masa y reacomodamos:

$$\frac{d^2 z}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dz}{dt} + \frac{k}{m} z = \frac{k}{m} z_f,$$

$$\frac{d^2 z}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dz}{dt} + \omega_0^2 z = \omega_0^2 z_f.$$

Esta es la ecuación de movimiento de un oscilador armónico forzado y amortiguado y su solución tiene la forma:

$$z(t) = A \cos(\omega t - \phi),$$

donde:

$$\phi = \arctan \left[ \frac{\omega \omega_0}{Q(\omega_0^2 - \omega^2)} \right],$$

$$A = \frac{\omega_0^2 B}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \frac{\omega^2 \omega_0^2}{Q^2}}}.$$

Hasta ahora no hemos introducido la interacción entre la punta y el sustrato que normalmente se denomina de Van der Waals, aunque muchas veces sean interacciones entre superficies y no parejas de átomos.

Definimos esta interacción como  $F_i(d)$  y depende la distancia entre la punta y el sustrato,  $d$ . Supongamos que la punta se encuentra a una distancia  $d$  del sustrato y la interacción atractiva, en este caso, el sustrato provoca que la micropalanca se desplace una distancia  $l$ , con respecto de su posición de equilibrio o reposo. En el caso estacionario, i.e. cuando la micropalanca no es forzada a oscilar, existe un equilibrio de fuerzas entre la restitución elástica de la micropalanca y la fuerza de interacción:

$$F_i(d) = F_{resorte}(l) = -kl.$$

Cuando la micropalanca se hace oscilar, tenemos el caso del oscilador forzado y amortiguado. La diferencia es que ahora debemos considerar el desplazamiento por la fuerza de interacción. De modo que la fuerza de restitución del resorte depende de  $z$ ,  $z_f$  y  $l$  de la siguiente manera  $F = -k(z - z_f - l)$  y además debemos agregar el término de la fuerza de interacción que ahora depende de la distancia entre la punta y la muestra y los desplazamientos por la oscilación,  $F_i(d + z)$ , de modo que la ecuación de movimiento es:

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + \frac{m \omega_0}{Q} \frac{dz}{dt} = -k(z - z_f - l) + F_i(d + z).$$

Utilizando la aproximación de amplitudes de oscilación pequeñas podemos expandir el término de la fuerza de interacción alrededor del punto de equilibrio ( $z = 0$ ):

$$F_i(d + z) = F_i(d) + \left. \frac{d}{dz} F_i(d + z) \right|_{z=0} \cdot z + \mathcal{O} \left( \frac{d^2}{dz^2}, z^2 \right),$$

descartamos los términos de orden superior dado que los desplazamientos son pequeños y por lo tanto tenemos que la fuerza de interacción cuando la micropalanca oscila varía de manera lineal con  $z$ . Definimos la derivada como una constante de acoplamiento similar a la constante de resorte de la ley de Hooke:

$$\alpha = -\left. \frac{d}{dz} F_i(d+z) \right|_{z=0}.$$

Sustituyendo la aproximación lineal en la ecuación de movimiento tenemos que:

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + \frac{m\omega_0}{Q} \frac{dz}{dt} = -k(z - z_f - l) + F_i(d) - \alpha \cdot z,$$

como

$$F_i(d) = -kl,$$

entonces

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + \frac{m\omega_0}{Q} \frac{dz}{dt} = -k(z - z_f - l) - \cancel{kl} - \alpha \cdot z,$$

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + \frac{m\omega_0}{Q} \frac{dz}{dt} + = -k(z - z_f) - \alpha \cdot z,$$

dividiendo entre la masa y re arreglando

$$\frac{d^2 z}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dz}{dt} = -\frac{k}{m}(z - z_f) - \alpha \frac{z}{m},$$

$$\frac{d^2 z}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dz}{dt} + \frac{k}{m} z = \frac{k}{m} z_f - \alpha \frac{z}{m},$$

$$\frac{d^2 z}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dz}{dt} + \frac{k + \alpha}{m} z = \frac{k}{m} z_f,$$

$$\frac{d^2 z}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dz}{dt} + \frac{k + \alpha}{m} z = \omega_0^2 z_f,$$

$$\frac{d^2 z}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dz}{dt} + \frac{k'}{m} z = \omega_0^2 z_f,$$

donde

$$k' = k + \alpha.$$

La ecuación resultante es muy similar a la de un oscilador armónico amortiguado con forzamiento, solo que en este caso tenemos que:

$$k/m \rightarrow k'/m \equiv \omega_o'^2$$

y, por lo tanto

$$A = \frac{\omega_0^2 B}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega_o'^2)^2 + \frac{\omega_o'^2 \omega_0^2}{Q^2}}}.$$

Como podemos observar, la interacción entre la punta y la muestra provoca un corrimiento de la frecuencia de resonancia, de manera que:

$$\omega_o \rightarrow \omega_o' = \sqrt{\frac{k + \alpha}{m}},$$

$$\omega_o' = \sqrt{\frac{k}{m} \left(1 + \frac{\alpha}{k}\right)} = \omega_o \sqrt{\left(1 + \frac{\alpha}{k}\right)},$$

De aquí podemos ver que la interacción entre el sustrato y la punta modifica directamente la frecuencia de resonancia y por lo tanto la amplitud de oscilación. Si la interacción se anula,  $\alpha = 0$ , recuperamos la frecuencia de resonancia original.

Al igual que en el modo de contacto, en este modo se pueden registrar otras señales además de los desplazamientos en  $z$  que componen la imagen topográfica. Al registrar los cambios en la fase de la función periódica que se ajusta a la oscilación se puede determinar un cambio de material en la superficie de la muestra. Al igual que en el caso de contacto y la medición de la fricción, este es un modo indirecto de detectar cambios de material o composición de dentro de la muestra.

### Modo intermitente

Un modo híbrido entre contacto y no contacto es el modo denominado 'tapping' o 'intermitente' en donde la micropalanca es puesta a oscilar cerca de su frecuencia de resonancia a una amplitud mayor que en el modo no-contacto. Este mayor rango permite que la punta toque la superficie cada ciclo de oscilación, por lo que el contacto es intermitente y no continuo, de ahí el nombre de este modo. Este modo de barrido utiliza

tanto las fuerzas atractivas como las repulsivas y tiene la desventaja que el modo de contacto, si el material es suave, puede sufrir daños por el contacto de la punta sobre él. Si por el contrario el material es duro, más que la punta, ésta se desgasta en mayor medida que en modo no-contacto debido al choque con la muestra durante cada oscilación, pero en menor medida que en el modo de contacto. Además, para el modo intermitente las oscilaciones son tales que la amplitud es grande y por lo tanto no se puede aproximar a un oscilador armónico. El tratamiento debe ser el de un oscilador anarmónico y la solución analítica se vuelve mucho más complicada de obtener (Voigtländer, 2019b). La ventaja de resolver este oscilador es el acceso a la información precisa del cambio de fase, ya que esta información indica un cambio de material en la superficie.

Para finalizar esta sección, se hace énfasis en que el modo a utilizar depende mucho de la muestra. Para muestras sólidas se puede recurrir a modo contacto para obtener alta resolución con un riesgo muy bajo de daño de la muestra. Sin embargo, si la muestra es suave, como es el material biológico, es preferible usar el modo no-contacto.

### ***1.5.2. Curvas de fuerza contra distancia y micropalanca***

Además de la obtención de imágenes topográficas de la superficie de la muestra de interés, AFM permite la caracterización mecánica de la muestra mediante curvas de fuerza contra distancia. Esto se logra acercando la micropalanca a la muestra, ésta toca la superficie y se realiza una indentación controlando el movimiento del escáner vertical. Se calcula la fuerza que actúa sobre la micropalanca a cada paso del desplazamiento mediante la deflexión del láser. El resultado es una curva que muestra la fuerza calculada como función del desplazamiento de la micropalanca en la dirección vertical, ver figura 13. Para determinar las propiedades mecánicas de la muestra se requiere saber la constante de resorte de la micropalanca,  $k$ , la cual se puede determinar utilizando distintos métodos que se tratan más adelante. Al aplicar una fuerza a la micropalanca, ésta sufre una deformación que se puede cuantificar mediante el control de los desplazamientos.

La detección de la deflexión y las fuerzas que actúan sobre la micropalanca se miden de la siguiente manera. Se hace incidir un láser sobre la micropalanca. Las micropalancas generalmente se encuentran recubiertas con un material reflejante en su cara superior para favorecer la reflexión total del haz de luz. El láser se refleja hacia un fotodetector sensible a la posición (PSPD) que se encuentra dividido en cuadrantes lo que permiten determinar la deflexión del haz de luz. De esta manera se registran de forma muy precisa los desplazamientos de la micropalanca. Estos desplazamientos se utilizan en el circuito de retroalimentación, ver figura 10.

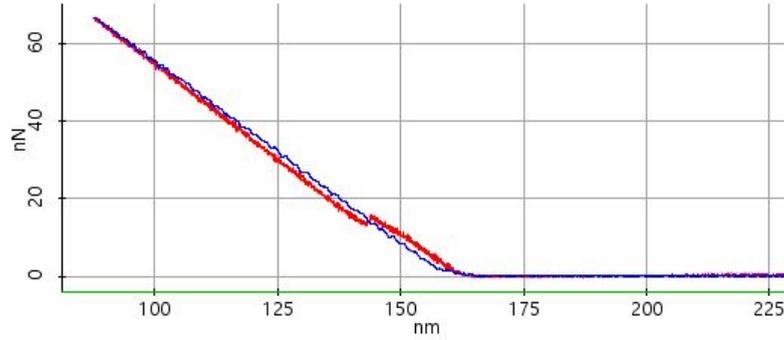


Figura 13. Curva típica de fuerza contra distancia (FvD) obtenida sobre una bicapa soportada con una punta con constante de resorte de  $0.45 \text{ N/m}$ . Se muestra la traza o acercamiento (rojo) y la re-traza o regreso (azul). La punta se acerca a la muestra y no percibe fuerza alguna (región entre  $225$  y  $\sim 160 \text{ nm}$ ). Al hacer contacto el brazo detecta se deforma y el láser se desvía, con esta deflexión se calcula la fuerza. A pesar del contacto el brazo es desplazado más en la dirección vertical lo que genera la respuesta observada, una respuesta elástica tipo Hooke. A cierto valor de la fuerza la bicapa no resiste la presión y se rompe, lo que genera una discontinuidad en la traza ( $\sim 145 \text{ nm}$  y  $\sim 15 \text{ nN}$ ). Una vez desplazada la membrana la punta del brazo hace contacto con el sustrato y se observa una respuesta homogénea.

La fuerza se calcula a partir de los desplazamientos del piezoeléctrico o de la deflexión de la micropalanca. En una primera aproximación lineal se utiliza la ley de Hooke para resortes dentro de su límite elástico:

$$F = kdz.$$

Utilizando la ley de Hooke se calcula la constante de resorte del sistema al evaluar la pendiente de la curva FvD. Este valor  $k_s$  es la constante aparente del sistema, es decir incluye la constante de resorte de la micropalanca,  $k_c$ , y la constante de resorte del material,  $k_m$ . Para un sistema de dos resortes en serie las tres constantes de resorte están relacionadas de la siguiente manera:

$$k_s = \frac{k_m k_c}{k_c + k_m}.$$

La constante de interés, la del material  $k_m$ , se obtiene al despejar:

$$k_m = \frac{k_c k_s}{k_c - k_s}.$$

Con estas dos ecuaciones podemos hacer algunas observaciones importantes. De la primera se observa que si el material bajo estudio es muy rígido y la micropalanca muy suave ( $k_m \gg k_c$ ) se tiene que  $k_c + k_m \rightarrow k_m$  y por lo tanto  $k_s \rightarrow k_c$  lo cual no brinda información sobre el material. Por otro lado un material suave estudiado con una micropalanca muy dura implicaría que  $k_s \rightarrow k_m$ , lo cual es una situación ideal. Sin embargo, físicamente una micropalanca muy dura no sufriría una deflexión por parte del material suave, sino que penetra sin oposición deformando el material por completo. De este análisis se concluye que la micropalanca se debe escoger tomando en cuenta los

valores de  $k_c$  y  $k_m$  para obtener información relevante. Además se observa que si  $k_c = k_s$  la ecuación de  $k_m$  pierde validez. Este es el caso cuando  $k_m \gg k_c$ . Lo cual define cierto límite para los valores de  $k_c$  que se pueden utilizar, como se observa en la figura 14, en donde la constante de resorte del sistema tiende a la constante de resorte de la micropalanca para valores de  $k_m$  altos.

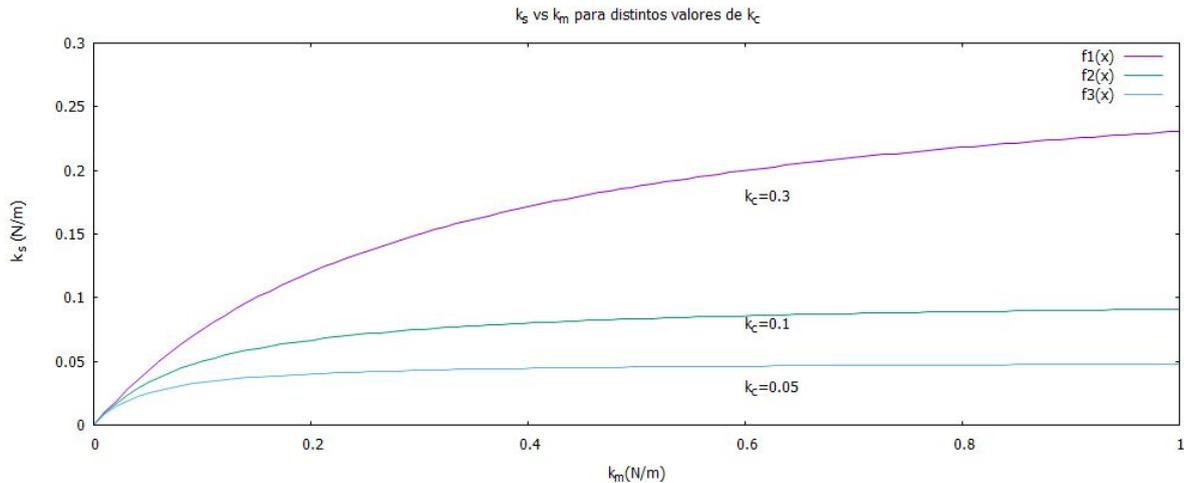


Figura 14. Curvas de la constante de resorte del sistema calculada para distintos valores de la constante de resorte de la micropalanca y variando la constante de resorte del material. Se observa que cuando el material posee una constante de resorte mayor que la de la micropalanca, el valor del sistema llega a una meseta en un valor muy cercano al de la micropalanca. Es por ello por lo que se debe elegir la micropalanca con detenimiento y considerando valor de la constante de resorte de la muestra.

### 1.5.3. Calibración de las micropalancas

De todo lo mencionado anteriormente se puede afirmar que es importante saber con precisión la constante de resorte de la micropalanca ya que la incertidumbre en la constante de resorte de la micropalanca genera un error en el cálculo de las propiedades elásticas del material,  $k_m$ . Para determinar  $k_c$  se debe calibrar cada micropalanca y existen diferentes métodos para llevar a cabo la calibración. Sin importar el método, primero se requiere conocer la sensibilidad de la micropalanca.

En la ley de Hooke de la cual se obtendrá la constante de resorte se utiliza el desplazamiento en  $z$ ,  $\Delta z$ , sin embargo la cantidad que se mide realmente en el equipo es el cambio en el voltaje,  $\Delta V$ . Una vez conocida dicha sensibilidad,  $S = \Delta z / \Delta V$ , se puede calcular la constante de resorte. Lo más común es obtener este parámetro de manera experimental, ya que los métodos analíticos disponibles requieren de variables que son desconocidas o conocidas, pero con muy baja precisión. La manera de calcular la sensibilidad es acercar la micropalanca y su punta a una superficie dura. Dado que de entrada no conocemos la rigidez de la micropalanca se utilizan superficies de silicio o vidrio que son mucho más rígidos que una micropalanca común. Se adquiere una curva de fuerza contra distancia sobre la superficie dura, de manera que el desplazamiento del piezoeléctricos en la dirección y la deformación verticales de la micropalanca sean la misma, es decir no hay indentación de la punta en la superficie. De la curva obtenida se

puede calcular la sensibilidad como la pendiente (o pendiente inversa dependiendo del equipo). Una vez determinado este valor se puede calcular el valor de la constante de resorte de la micropalanca. Para ello, existen varios métodos.

En este trabajo se utiliza el método de fluctuaciones térmicas. Éste consiste en obtener la densidad espectral de potencia y ajustar una función de Lorentz a los datos, ver imagen figura 15. Este ajuste brinda información sobre la constante de resorte de la micropalanca, así como de su factor de calidad  $Q$ , el cual indica la disipación de energía de la micropalanca, a mayor valor de  $Q$  menor disipación y en el caso de la micropalanca significa obtención de imágenes en medios acuosos de mejor calidad. El factor de calidad surge del amortiguamiento y se calcula como la frecuencia de resonancia entre el ancho de la curva de resonancia.

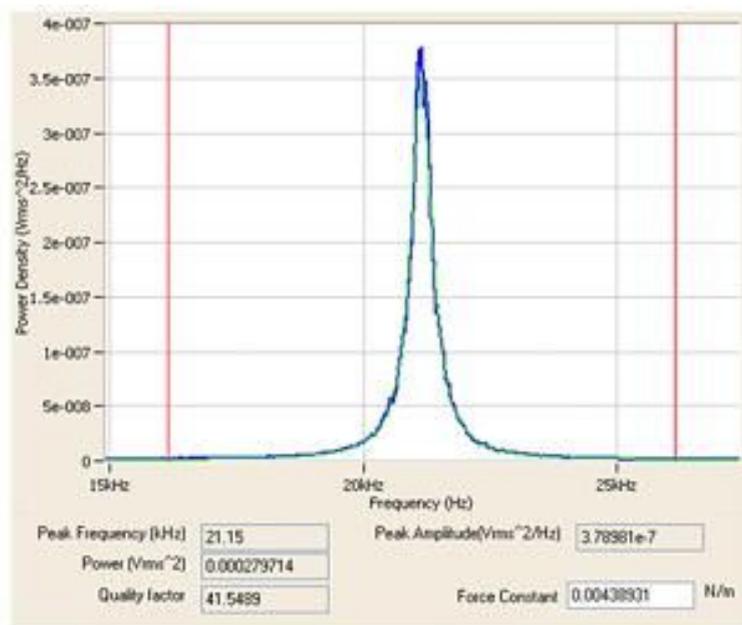


Figura 15. Curva típica obtenida de realizar un barrido de frecuencias y un análisis de fluctuaciones térmicas de una micropalanca. A partir de esta curva se realiza un ajuste del cual se obtiene el factor de calidad  $Q$ , la frecuencia de resonancia y la constante de resorte de la micropalanca. Imagen obtenida de la página web de Park Systems.

Una vez que se tiene la constante de resorte de una micropalanca se puede decidir si es la adecuada para obtener propiedades elásticas de cierta muestra de interés. Recordando la figura 14, si el material bajo estudio es mucho más rígido que la micropalanca no mediremos sus propiedades elásticas y además en el caso contrario de que la micropalanca sea mucho más rígida que la muestra, ésta sufrirá daño, podemos concluir que la micropalanca debe tener una constante de resorte del mismo orden de magnitud que el material. Estudios previos (Liang et al., 2004; Steltenkamp et al., 2006; Ovalle-García y Ortega-Blake, 2007; Ovalle-García et al., 2011) indican que la constante de resorte de bicapas no-soportadas y de vesículas se encuentran en el rango de 1-5 mN/m. Actualmente existen diferentes opciones de micropalancas comerciales con estas propiedades para el estudio de materiales biológicos e. g. Biolevers de Bruker, lo cual brinda una selección de micropalancas con diferentes propiedades adecuadas. De las micropalancas comercialmente disponibles se puede acotar el rango de  $k_c$  a aquellas con valor 10-250 mN/m para modo contacto.

#### **1.5.4. Sustratos**

Para poder observar una muestra mediante AFM se requiere que ésta se encuentre depositada y/o sujeta a un sustrato rígido. En el caso de muestras biológicas, los sustratos más comunes son mica, vidrio y grafito (Morris et al., 2010).

##### Mica

El sustrato más popular para muestras biológicas es la mica, particularmente para estudiar moléculas individuales debido a su bajo costo y alta disponibilidad. Otra característica que la hace muy popular es que se pueden obtener superficies atómicamente planas. Esto es gracias a que la mica consiste en una serie de planos cristalinos que se pueden separar fácilmente al aplicar una fuerza de corte. Esto se logra con una navaja insertada por un costado o con cinta adhesiva que retira la capa superior. El resultado es una capa fresca, que no ha sido expuesta a la atmósfera, que posee regiones planas que se extienden por micras. No es una sola capa ya que en la práctica se retiran varias capas y algunas se fracturan lo que deja más bien una serie de escalones. Dependiendo del tipo de mica, la superficie tendrá expuestos unos u otros iones. Es importante tener esto en cuenta ya que si se usa agua a pH neutro o aire la superficie de la mica tendrá una carga neta que se debe contemplar al depositar la muestra de interés.

##### Vidrio

Este es el sustrato de elección cuando se quiere obtener imágenes de células, y donde la resolución molecular no es necesaria. Al igual que la mica, el vidrio en forma de cubreobjetos es barato y de alta disponibilidad. El mayor cuidado que se debe tener es la limpieza, para evitar contaminar las células.

##### Grafito

Este sustrato se utiliza cuando se requiere un material conductor. Usualmente se utiliza si además de imágenes de AFM se pretende obtener imágenes de microscopía por efecto túnel. También se utiliza para descartar efectos causados por sustratos hidrofílicos como mica o vidrio gracias a que el grafito es hidrofóbico.

#### **1.5.5. Problemas**

Como toda técnica, AFM tiene sus problemas y desventajas. A continuación, se describen algunas de las problemáticas más comunes.

##### Deriva térmica

Este problema es más evidente cuando las muestras se encuentran en un ambiente líquido, como la mayoría de las muestras biológicas. El problema se da cuando el líquido y el ambiente alrededor de la celda líquida tienen una diferencia de temperatura significativa ya que surgen corrientes térmicas que pueden desviar la micropalanca. Adicionalmente, el material reflejante que recubre las micropalancas, típicamente oro o aluminio, puede sufrir de expansión diferenciada debido al grosor de la capa. Esto provoca que la micropalanca se

doble, incluso si no hay corriente de agua. En general hay dos situaciones que sugieren la presencia de deriva térmica: i) El láser se desvía con el tiempo, debido al doblamiento de la micropalanca, lo que puede ocasionar que la muestra se raye o que la punta se desprenda mientras se adquiere una imagen; ii) Se observa una deriva en el plano XY de la imagen obtenida. La manera en que se previene este problema es asegurarse de dejar que el equipo, la muestra y el ambiente alcancen un equilibrio que reduzca las diferencias de temperatura. Dependiendo del tamaño de la muestra esto puede variar entre 10 y 60 minutos.

#### Efectos de punta

Esta es la mayor fuente de errores y de problemas ya que la punta es la sonda que barre la superficie. Uno de los problemas más comunes es la punta doble o punta múltiple. En este caso la punta ha sido dañada o se encuentra contaminada de manera que la punta presenta más de un ápice. Esto resulta en una repetición o copia de las estructuras presentes en la muestra que se está estudiando, una por cada ápice adicional. Aunque es un problema molesto, en muestras sencillas es fácil de identificar debido a la simetría que surge en la imagen topográfica resultante. Cuando la muestra es más compleja se vuelve más difícil reconocer este problema y requiere de un análisis más detallado de las imágenes para notar un exceso de repeticiones de la estructura. Si se identifica este problema lo más directo y sencillo es cambiar de punta. Si se tiene cierta certeza de que podría deberse a contaminación se pueden realizar barridos grandes a altas velocidades sobre un sustrato duro para desprender el contaminante, aunque este proceso podría dañar la punta por lo que no es lo más recomendable.

#### Interferencia óptica

Cuando el haz láser no es enfocado de manera adecuada sobre la micropalanca, parte del haz incide en la superficie de la muestra. Si la muestra es reflejante o si la muestra se encuentra en medio acuoso, este remanente del haz puede ser reflejado hacia el fotodetector. Esto ocasiona un efecto de corrugación en el fondo de la imagen debido a interferencia constructiva y destructiva entre los rayos reflejados de la micropalanca o de otra fuente. Cuando solo se requiere de información topográfica este problema se resuelve en un tratamiento posterior a las mediciones, mediante procesamiento de imágenes. Sin embargo, si se requiere la obtención de curvas de fuerza contra distancia la interferencia vuelve la tarea difícil ya que imposibilita la detección de fuerzas pequeñas y los registros tienen mucho ruido.

#### Rugosidad de muestra

La altura típica de una punta es de 3  $\mu\text{m}$ . Esto limita el tipo de superficies que se pueden barrer con una punta de AFM para obtener una buena imagen topográfica. Si la muestra de interés tiene estructuras cuya altura es mayor a la punta de AFM, tendremos un barrido realizado por el brazo de la micropalanca en lugar de la punta. Esto obviamente afecta la calidad de la imagen que pierde la mayor parte del detalle.

### Movilidad de la muestra

La movilidad de la muestra, es decir que la muestra no se encuentre debidamente fija al sustrato o que presente cambios en su superficie, es común al estudiar muestras en un medio acuoso. La mayoría de los materiales biológicos reaccionan al agua, ya sea que se hincha o que adquieren movilidad. El mayor problema en este caso es que la muestra se desprende del sustrato. Estos problemas se resuelven de manera particular para cada caso.

### Imágenes en condiciones acuosas

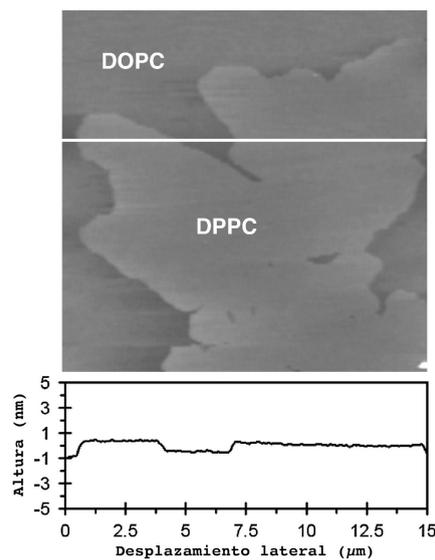
En general, como ya se ha mencionado, adquirir imágenes topográficas mediante AFM de muestras en un medio acuoso es más complicado que si las muestras estuvieran en aire. Hay tres consideraciones importantes: i) Equilibrio térmico: Si hay una gran diferencia de temperatura entre la muestra y el equipo (porta-muestra) se generan corrientes convectivas que afectan la toma de imágenes; ii) Cuidado con las fugas: Las fugas de solución acuosas pueden generar daños en el equipo que son muy costosos y además peligrosos por lo que se debe tener mucho cuidado al llenar la celda líquida y asegurarse en cada uso de que no haya fugas. iii) Limpieza: Cualquier tipo de contaminación genera problemas al realizar mediciones en condiciones acuosas. Por ejemplo, partículas en el medio acuoso que podrían chocar con la micropalanca o interferir con el haz del láser o también sedimentos que cambien las imágenes topográficas. Siempre se debe trabajar con material limpio y en condiciones de poco polvo.

### **1.5.6. Uso de AFM en este trabajo**

Debido a las limitaciones de los microscopios ópticos al observar estructuras menores a 200 nm se han buscado alternativas como la microscopía electrónica (SEM y TEM) y la de fuerza atómica (AFM). Sin embargo, en la última década ha surgido una preferencia por el uso de AFM en la adquisición de imágenes con resolución nanométrica de muestras biológicas ya que, a diferencia de SEM o TEM, se pueden observar sistemas biológicos en condiciones fisiológicas y, contrario a TEM, AFM permite obtener imágenes de alta resolución sin dañar la muestra. Estudios previos han logrado obtener imágenes de células, proteínas de membrana y filamentos de actina (Marti et al., 1988; Butt et al., 1990; Edstrom et al., 1990; Gould et al., 1990; Henderson et al., 1992), liposomas (Jass et al., 2000, 2003; Liang et al., 2004) y bicapas (Kalb et al., 1992; Mou et al., 1994a; Rinia et al., 2001; Richter et al., 2003; Khadka et al., 2015). Los estudios por AFM han permitido observar la interacción de proteínas, toxinas y fármacos con la bicapa lipídica en condiciones fisiológicas (Mou et al., 1996; Lawrence et al., 2003; Maté et al., 2014) e incluso observar que las propiedades elásticas de células saludables se ve modificada al volverse cancerosas (Cross et al., 2007; Osmulski et al., 2015; Han et al., 2016; Deng et al., 2018; Svetlizky et al., 2019). Es por eso por lo que hoy en día se considera a la microscopía de fuerza atómica como una herramienta poderosa para el estudio de sistemas biológicos. Como ya se ha mencionado, en este trabajo se utilizará el modelo de bicapa soportada sobre mica para la evaluación de su estructura y dinámica mediante AFM.

Imágenes topográficas de AFM obtenidas de bicapas soportadas han permitido observar la presencia de dominios en la membrana. Estos dominios son parches de membrana que

presentan un grosor diferente al del resto de la bicapa, generalmente un grosor mayor. Esta diferencia de grosor, usualmente de  $\sim 1$  nm, se puede detectar con AFM. Las mezclas de lípidos que llevan a la formación de dominios generalmente involucran un lípido de cadenas de ácidos grasos saturados, por ejemplo, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), con un lípido que contenga una o sus dos cadenas insaturadas como por ejemplo dioleoilfosfatidilcolina (DOPC). La saturación o insaturación de las cadenas de ácidos grasos genera una diferencia considerable en la temperatura de transición un lípido de una fase líquida a una fase gel. Por ejemplo, la temperatura de transición de DOPC es de  $-17$  °C mientras que para el DPPC es de  $41$  °C. Debido a esto una membrana formada por DOPC y DPPC a temperatura ambiente se compondrá de DOPC en fase líquida y de DPPC en fase gel o sólida, lo que se traduce en zonas de membrana con grosores distintos. La figura 16 muestra una imagen topográfica de una bicapa soportada compuesta de DOPC y DPPC a una razón equimolar.



*Figura 16. Segregación de fases en una bicapa lipídica soportada compuesta por DOPC/DPPC a una razón equimolar. Se muestra la imagen topográfica obtenida mediante AFM y un perfil de altura trazado sobre la misma imagen. Imagen topográfica de  $15 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$  y un rango en  $z$  de  $10$  nm. Imagen adaptada de la publicada en (Kirat et al., 2010).*

Como se mencionó anteriormente, existe evidencia que la membrana de levadura presenta formación de dominios (Klose et al., 2010; Aresta-Branco et al., 2011b). La existencia de estos dominios podría ser una vía de acceso de los antibióticos poliénicos hacia la membrana. Asimismo, hay evidencia experimental de que la acción ionofórica del antibiótico poliénico Nys se ve incrementada por la presencia de zonas de fase gel presentes en la membrana de liposomas (Dos Santos et al., 2017). Esto sugiere una hipótesis, que la zona de interfase podría facilitar la penetración a la membrana. Por tanto, se alienta un estudio más profundo sobre la estructura de la membrana y la presencia de dominios en esta. Además, recordando que las membranas de hongo y de mamífero presentan un esteroles diferentes, ergosterol y colesterol respectivamente, se muestra como evidente estudiar el efecto que estos esteroides tienen sobre la morfología, estructura y dinámica de membranas dominios. Para llevar a cabo esta comparación se escogió el uso de bicapas soportadas sobre mica como el modelo más adecuado, asimismo el estudio

mediante AFM de estas bicapas permite no solo la obtención de imágenes sino también de propiedades mecánicas.

En una colaboración con los Drs. Nakabayashi y Kobayashi de la Universidad de Saitama se tuvo la oportunidad de observar los sistemas modelos estudiados hasta ahora en su microscopio de fuerza atómica que tiene la capacidad de obtener imágenes topográficas en modo de no-contacto mediante modulación de frecuencia, FM-AFM. Se observaron bicapas soportadas de POPC/eSM 1/1 a 0 y 20 mol% de ergosterol. En particular se buscó esclarecer: i) Que las diferencias de altura observadas son reales ya que en los experimentos de contacto se podría comprimir la bicapa y modificar las alturas relativas. Por ello se utilizaron las mezclas más relevantes en este sentido, la binaria y a 20 mol% ergosterol; ii) La morfología de los dominios de la bicapa binaria ya que se observan no-uniformes en las imágenes obtenidas hasta ahora. Se buscó aprovechar que la técnica FM-AFM tiene una mayor resolución.

### ***1.5.7. Limitaciones***

Los resultados de AFM son observaciones fenomenológicas y no son suficientes para proponer una explicación de su origen. Para estudiar sistemas biológicos moleculares y celulares existen diversas técnicas y metodología aplicables. La tabla 1 muestra las técnicas más comunes, así como sus ventajas, fuentes de error, resolución y limitaciones. Entre las más versátiles y de mejor resolución posible se encuentra la microscopía de fuerza atómica elegida para los estudios de topografía y fuerza de ruptura. Equiparables o incluso mejores en cuanto a resolución le siguen las técnicas de microscopía electrónica y las simulaciones numéricas, sin embargo, las primeras tienden a dañar la muestra, además de que no se puede estudiar en su ambiente nativo. Las microscopías de super-resolución requieren del uso de marcadores fluorescentes, en este caso lípidos. La morfología y la dinámica de las membranas es muy sensible al cambio de composición, incluso en pequeñas proporciones (e. g. 5 mol%). Por lo cual introducir lípidos con algún marcador fluorescente podría modificar la estructura y dinámica de las membranas de manera significativa. Es por ello por lo que se recurrió a las simulaciones numéricas de dinámica molecular y cálculos cuánticos de las moléculas de ergosterol y colesterol con el fin de obtener información a nivel molecular y poder así proponer una explicación mecanística de los fenómenos observados hasta ahora. Estas herramientas se muestran como las más adecuadas dado que permiten un estudio detallado de las moléculas de interés y creemos que la presencia de dominios está íntimamente relacionada con las interacciones entre POPC y eSM con los esteroides. En la siguiente sección se discute este tema de manera más amplia.

Tabla 1. Comparación de técnicas de imagen de alta resolución en biología molecular y celular. Se consideran experimentos en: célula completa, membranas extraídas o artificiales, proteínas purificadas y ácidos nucleicos. \*Sobre proteínas de membrana se logra una resolución de  $\leq 1$  nm, sobre células de mamífero  $\sim 50$  nm y sobre células microbianas  $\sim 10$  nm. \*\*STED, agotamiento de emisión estimulada; PALM, microscopía de localización foto-activada; STORM, microscopía óptica estocástica de reconstrucción. Tabla obtenida de la publicación de Dufrêne y colaboradores (Dufrêne et al., 2017) y modificada para incluir simulaciones numéricas.

<b>Técnica / Característica</b>	<b>Microscopía de fuerza atómica</b>	<b>Microscopía de super-resolución (STED, PALM, STORM)**</b>	<b>Microscopía electrónica de transmisión</b>	<b>Microscopía electrónica de barrido</b>	<b>Simulaciones numéricas (Dinámica Molecular)</b>
<b>Resolución</b>	$\leq 1$ nm–50 nm*	20–50 nm	0.2–10 nm	2–10 nm	0.1–1000 nm
<b>Preparación de muestras y ambiente</b>	Muestra soportada; condiciones fisiológicas.	Marcadores fluorescentes; condiciones fisiológicas	Muestra sobre rejilla; deshidratada (negative staining); congelada (crio-TEM).	Congelamiento / secado de punto crítico y sombreado metálico.	Mezclas simples de moléculas en agua en diferentes condiciones termodinámicas.
<b>Causas de problemas y artefactos</b>	Punta, fuerza, escaneo.	Toxicidad y blanqueo	Deshidratación; daño por el haz y formación de cristales de hielo.	Deshidratación; daño por el haz y sombreado metálico.	Modelaje, campos de fuerza, simplicidad, tamaño y tiempo
<b>Ventajas</b>	Barridos en condiciones nativas; no requiere de tinción, marcadores fluorescentes ni fijación; alta relación señal-ruido; evaluación simultánea de múltiples parámetros físicos, químicos y biológicos.	Acceso a estructura tridimensional de la célula; alta resolución espaciotemporal; capacidad de monitorear procesos biomoleculares en células vivas.	Obtención de estructuras de proteínas; imagen instantánea de proteínas y complejos; estructuras dentro de la célula con resolución molecular.	Imágenes superficiales de tejidos, células y de interfaces con resolución nanométrica.	Acceso a estructuras tridimensionales de moléculas de interés; alta resolución espaciotemporal; monitoreo de procesos biomoleculares; conocimiento de las bases físicas de procesos biológicos.
<b>Limitaciones</b>	Restringido a superficies.	Obtención de imágenes restringido a marcadores fluorescentes.	No se pueden observar procesos en vivo.	No se pueden observar procesos en vivo.	Campos de fuerza limitados, velocidad y tiempo de cómputo, validación.

## 1.6. Cálculos Cuánticos y Simulaciones De Dinámica Molecular

Lograr una descripción mecánica y determinista de la materia y la naturaleza ha sido un objetivo de las ciencias exactas desde que Newton dedujo sus ecuaciones de movimiento hasta la fecha. La idea era, desde entonces, que conociendo todas las condiciones iniciales de las partículas de un sistema, así como las fuerzas de interacción involucradas sería posible describir el estado del sistema a un tiempo posterior cualquiera. El avance en la capacidad de cómputo de las últimas cinco décadas permitió el desarrollo de herramientas digitales dirigidas al estudio de procesos e interacciones a nivel molecular y atómico. El conocimiento obtenido de estos cálculos y modelos moleculares permite entender y predecir propiedades macroscópicas. A pesar de algunas predicciones de este tipo por medio de simulaciones numéricas siempre se debe tener en cuenta que son una aproximación y que los átomos y moléculas no se rigen por las leyes de la mecánica clásica, sino la cuántica. Entre los estudios de sistemas modelo utilizando herramientas computacionales se encuentran las simulaciones de Dinámica Molecular (DM). Estas simulaciones parten de modelos computacionales de átomos y moléculas de interés y, por un tiempo determinado, permiten que el sistema evolucione libremente bajo la acción de fuerzas de interacción determinadas. El resultado es la visualización del movimiento de los átomos y moléculas, así como la caracterización de las interacciones entre ellos que permiten reproducir y predecir comportamientos y propiedades macroscópicas. En las últimas tres décadas surgió un gran interés por el estudio de sistemas biológicos mediante herramientas computacionales como las simulaciones de DM. El trabajo de refinar tanto los programas y algoritmos como los parámetros de los campos de fuerza utilizados permitió el desarrollo de diversas herramientas capaces de simular sistemas biológicos, como bicapas lipídicas y proteínas (Brooks et al., 1983; Berendsen et al., 1995; Pearlman et al., 1995; Enkavi et al., 2019). Al día de hoy los resultados de DM, ya sea con diferentes campos de fuerza empíricos o con cálculos cuánticos *ab initio* de gran precisión, han sido capaces de reproducir propiedades y mediciones experimentales (Wang et al., 2016; Bennett et al., 2018). Esta validación de las herramientas computacionales permite su uso para estudiar y medir propiedades inaccesibles experimentalmente. Aunque siempre debemos tener en cuenta la advertencia de Haile (Haile et al., 1993): “Tenga en cuenta que utilizar una máquina para calcular el comportamiento de un modelo de varios cuerpos no garantiza que el comportamiento calculado sea representativo de ese modelo, y mucho menos que el modelo imita la realidad.”

### 1.6.1 Dinámica Molecular *ab initio*

Existen diferentes técnicas computacionales para lograr una descripción adecuada de un sistema atómico o molecular. El sistema bajo estudio y sus propiedades determinan el método y nivel de cálculo más apropiado. En particular para el estudio de átomos y moléculas, se debe utilizar la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo. A este nivel de cálculo cuántico, sin el uso de parámetros experimental o ad-hoc, se le denomina nivel *ab initio* y bastaría con calcular las funciones de onda de los átomos, núcleos y electrones, para resolver el sistema y poder predecir su dinámica a cualquier tiempo. Sin embargo, para sistemas de más de dos átomos resolver las ecuaciones del sistema se vuelve muy complejo y se debe recurrir a métodos aproximados como por ejemplo el método Hartree-Fock (ab-initio) o la Teoría de Funcional de Densidad (no ab-initio) entre muchos

otros. Para una descripción de las diversas técnicas para cálculos ab initio se pueden consultar el texto de J.M. Haile y el texto de P. B. Balbuena y J. M. Seminario (Haile, 1997; Balbuena y Seminario, 1999).

### 1.6.2. Método de Hartree-Fock

El método de Hartree-Fock es una aproximación para obtener la función de onda y la energía de un sistema cuántico estacionario de varios cuerpos. En este método el sistema de N-cuerpos se aproxima a la solución de N-orbitales de espín. Esta función de onda de varios electrones es la combinación lineal de funciones de onda de un electrón. El método supone además que cada una de estas funciones de onda de un electrón se pueden escribir como una combinación lineal de una base de funciones de onda y que cada electrón del sistema tiene una interacción con el campo promedio generado por los demás electrones y núcleos. Gracias a esta expansión en una base arbitraria de funciones de onda, la solución puede converger a la solución exacta si se escoge una base apropiada i.e. completa. Desafortunadamente este método se vuelve computacionalmente caro, ya que escoger una base completa para la descripción de cada una de las funciones de onda de los electrones hace que el tiempo de computación crezca enormemente. Por lo tanto, se debe llegar a un compromiso entre precisión y tiempo de computación al momento de elegir la base.

El método de Hartree-Fock simplifica el sistema haciendo cinco aproximaciones:

1. La aproximación de Born-Oppenheimer se considera implícita. La función de onda del sistema se puede separar en la función de onda del núcleo(s) y la función de onda de los electrones.
2. No se consideran los efectos relativistas.
3. La solución es una combinación lineal de funciones de onda de una base, la cual es finita y casi completa.
4. Cada función propia de la energía se puede describir mediante un determinante de Slater, un producto antisimétrico de las funciones de onda electrónicas.
5. La aproximación de campo medio es utilizada. El efecto del colectivo de cuerpos del sistema sobre una partícula individual se aproxima como una sola interacción de ésta con el promedio de las interacciones.

En términos matemáticos, resolver el problema cuántico de N-cuerpos con el método de Hartree-Fock consiste en encontrar soluciones a la ecuación de valores propios:

$$\hat{F}(i)\phi_{1,i} = \epsilon_i\phi_{1,i}$$

donde:

- $\phi_i$  son un conjunto de funciones de onda de un electrón.
- $\epsilon_i$  es la energía propia de cada función de onda electrónica.
- $\hat{F}(i)$  es el operador de Fock actuando sobre el i-ésimo electrón y se define como:

$$\hat{F}(i) = \hat{h}(i) + \sum_{j=1}^{n/2} [2\hat{J}_j(i) - \hat{K}_j(i)]$$

donde:

- $\hat{h}(i)$  es el Hamiltoniano para el i-ésimo electrón.
- $n$  es el número de electrones y  $n/2$  es el número de orbitales ocupados en un sistema de cascarón cerrado.
- $\hat{J}_j(i)$  es el operador de Coulomb (fuerza repulsiva entre los electrones  $i$  y  $j$ ).
- $\hat{K}_j(i)$  es el operador de intercambio (intercambiar dos electrones)

### ***1.6.3. Teoría de perturbaciones Möller-Plesset***

Una mejor aproximación se obtiene de considerar la correlación electrónica, descartada en el método de Hartree-Fock. Para ello se debe resolver la ecuación de Schrödinger para un sistema multi-electrónico mediante el método de perturbaciones. En este caso iniciamos con un sistema del cual conocemos su solución (sistema no-perturbado) que además se parezca al sistema que queremos resolver (sistema perturbado). Al aplicar teoría de perturbaciones al sistema no-perturbado podemos calcular la perturbación al nivel de precisión deseado. Este método se denomina Teoría de Perturbaciones de Möller-Plesset y utiliza el Hamiltoniano obtenido por el método de Hartree-Fock, es decir del Hamiltoniano del sistema no-perturbado. A partir de este Hamiltoniano se resuelven las ecuaciones de perturbación a cualquier nivel u orden deseado, mientras la capacidad computacional lo permita. La energía a orden cero es la energía de los orbitales ocupados. La primera corrección a la función de onda corresponde a las correcciones de segundo y tercer orden de la energía (Métodos MP2 y MP3) y la segunda corrección a la función de onda resulta en las correcciones de cuarto (MP4) y quinto (MP5) orden de la energía. La gran ventaja de los métodos de MP es que son consistentes de tamaño, por lo cual son muy utilizados en química.

### ***1.6.4. Teoría del Funcional de la Densidad***

La Teoría del Funcional de la Densidad (DFT por sus siglas en inglés) se ha convertido en una de las técnicas fundamentales para el estudio de la materia a la escala atómica. El método DFT está basado en el teorema de Hohenberg-Kohn el cual establece que el valor esperado de cualquier observable en el estado base es un funcional único de la densidad del estado base. Por tanto, la energía, que es un observable, posee un carácter variacional dependiente de la densidad electrónica que al minimizarse da como resultado la densidad del estado base. La utilidad de la densidad electrónica radica en la reducción de la complejidad del problema desde un punto de vista numérico. Para un sistema de  $N$  partículas la función de onda contiene  $3N$  variables mientras que la densidad electrónica es siempre una función de 3 variables. El teorema de Hohenberg-Kohn se ha extendido a sistemas que no son el estado base.

A pesar de la importancia del teorema de Hohenberg-Kohn, este no presentó ejemplos prácticos de cómo realizar los cálculos para obtener soluciones. El procedimiento Kohn-Sham atendió este tema al dar procedimientos prácticos para resolver la ecuación de Schrödinger mediante DFT.

El éxito de los métodos DFT radica en su precisión para la solución de sistemas moleculares sin recurrir a una base funciones tan extensa, lo que reduce el costo computacional. Sin embargo, llegar a una solución para un problema en particular no es tan directo y tiene su grado de complejidad, donde el mayor problema es encontrar la forma más precisa del funcional de la energía en términos de la densidad electrónica es aquí en dónde entra el uso de parámetros ad-hoc que permitan obtener un funcional que se ajuste a observaciones experimentales.

Una mejora a los métodos de DFT es la introducción explícita de la dependencia que tienen los funcionales de correlación e intercambio de los gradientes de las densidades (electrónica y de espín). Esta aproximación se denomina de gradiente generalizada (GGA). Históricamente existen dos maneras de aplicar la aproximación GGA: i) Encontrar funcionales de intercambio-correlación que cumplan las restricciones físicas del sistema de manera que mientras mayor número de restricciones se cumplan, mayor precisión de las predicciones; ii) Se parametrizan los funcionales y se ajustan utilizando datos experimentales. Este método se denomina *semiempírico*.

Dentro de la categoría de los métodos GGA de DFT no-empíricos se tiene PW91 (Perdew et al., 1992, 1993). PBE (Perdew et al., 1996, 1998) y RPBE (Hammer et al., 1999) entre otros. Dentro de la categoría de los métodos empíricos el más utilizado es el B3LYP (Becke, 1993; Hammer et al., 1999), un híbrido HF/DFT. Este último método será utilizado en el presente trabajo para calcular las configuraciones de mínima energía de los esteroides estudiados.

### B3LYP

El método de cálculo de B3LYP utiliza la energía de correlación de Lee-Yang-Parr (Lee et al., 1988) en lugar del esquema de energía de correlación corregido mediante gradientes de Perdew-Wang (Perdew, 1986; Becke, 1988) utilizado por Becke (Becke, 1993). Además, utiliza el intercambio no-local de HF y lo mezcla con la energía de correlación-intercambio de la aproximación GGA. Los coeficientes se ajustan y pesan utilizando datos experimentales de termoquímica de algunos átomos y moléculas. En cálculos moleculares de anfotericina B en donde se utilizó B3LYP con un término de dispersión, este funcional resultó ser el más cercano a los cálculos cuánticos MP2 lo que demuestra que puede ser una muy buena opción para evaluar las conformaciones moleculares de colesterol y ergosterol.

### ***1.6.5. Simulaciones de Dinámica Molecular***

El cálculo de las configuraciones de mínima energía para una molécula de interés no es suficiente para una predicción de sus propiedades macroscópicas. Para ello se deben estudiar conjuntos de muchas de estas moléculas a cierta temperatura. A partir de estos conjuntos se pueden obtener promedios que se relacionan con las propiedades macroscópicas que además se pueden medir experimentalmente. Dado que el interés de las

simulaciones son los promedios del conjunto y no el detalle atómico se pueden hacer algunas simplificaciones, si el sistema así lo permite. Entre estas simplificaciones existen la asociación de varios átomos como una sola partícula, reducir las libertades de movimiento a un grupo de coordenadas, considerar las partículas de un solvente como un campo medio que afecta al resto del sistema etc. Para generar y estudiar estos conjuntos estadísticos existen dos maneras: i) Simulaciones de Monte Carlo y ii) Simulaciones de Dinámica Molecular (DM). Aunque las simulaciones de Monte Carlo son más simples de llevar a cabo que las de DM, en la mayoría de los casos no brindan más información. Por ello el método preferido en la literatura es el de simulaciones de DM y también lo fue para este trabajo.

Las simulaciones de DM resuelven las ecuaciones de movimiento de Newton para cada partícula involucrada en el sistema.

$$m_i \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} = \mathbf{F}_i, \quad i = 1 \dots N$$

Donde las fuerzas son el negativo de la derivada de la energía potencial ( $V$ ) del sistema:

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i}$$

La simulación se lleva a cabo calculando la posición de cada partícula a diferentes tiempos separados por un intervalo corto. El producto final de una simulación son las posiciones de las partículas como función del tiempo llamadas trayectorias. A partir de estas trayectorias se pueden obtener promedios que brindan información sobre propiedades macroscópicas del sistema.

Aunque las simulaciones de DM son muy útiles siempre se debe estar consciente de sus limitaciones. Entre estas limitaciones se encuentra el hecho de que se tratan los átomos con las ecuaciones de Newton, es decir un tratamiento clásico de átomos, los cuales que pueden presentar efectos cuánticos, pero el tratamiento clásico no puede predecir estos efectos cuánticos. En este caso se pueden hacer correcciones a la energía total del sistema o, en caso de ser posible, tratar los enlaces entre átomos como restricciones de las ecuaciones de movimiento, en lugar de osciladores armónicos. Existen otra limitaciones importantes que solo se enlistan a continuación: i) Los electrones se encuentran en su estado base, por lo que no se pueden simular estados excitados; ii) Los campos de fuerza ( $V$ ) son aproximados, por lo que se deben refinar constantemente y para cada caso particular; iii) Las interacciones de larga distancia se hacen cero a cierta distancia de corte, esta distancia de corte es algo empírica; iv) Las fronteras del sistema no son naturales, usualmente se manejan condiciones de frontera periódicas pero aún así se debe evaluar la posible interacción del sistema con su “reflejo”.

Existen distintos programas computacionales para llevar a cabo simulaciones de DM. Uno de ellos es GROMACS (GRONingen MACHine for Chemical Simulations) (Berendsen et al., 1995; Abraham et al., 2015) es un programa de libre acceso muy utilizado. Funciona en distintas plataformas como Windows y Linux entre otras. GROMACS utiliza la configuración inicial de un sistema (puede ser una molécula o un sistema de  $N$  moléculas) almacenado en un archivo extensión .gro, una topología inicial almacenado en un archivo extensión .top y/o .itp y por último un archivo con los parámetros de dinámica almacenados en un archivo con extensión .mdp. Adicionalmente se pueden utilizar

diferentes campos de fuerza como por ejemplo CHARMM (Brooks et al., 1983), Slipids (Jämbeck y Lyubartsev, 2012), MARTINI (Marrink et al., 2007) y AMBER (Case et al., 2005). Cada campo de fuerza utiliza una aproximación distinta para facilitar los cálculos, es por ello por lo que importante la elección de un campo de fuerza dependiendo de las propiedades que se quieren estudiar.

### CHARMM<sub>36</sub>

CHARMM (Chemistry at HARvard for Macromolecular Mechanics) (Brooks et al., 1983) es tanto un programa para realizar simulaciones de DM como una serie de campos de fuerza que se pueden utilizar en otros paquetes y programas para realizar simulaciones desarrollado en la universidad de Harvard por el grupo de Karplus . Existen diferentes versiones de los campos de fuerza para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, para simulaciones que involucran proteínas existen CHARMM19 (átomo-unido o extendido) y CHARMM22 (todo-átomos) (MacKerell et al., 1998) entre otros. Para lípidos existen campos como CHARMM36 (Kluda et al., 2010), CHARMM22 (Schlenkrich et al., 1996) y CHARMM27 (Feller et al., 1997). Estos campos de fuerza para lípidos son todo-átomos. Para este trabajo se utilizó CHARMM36 ya que este es el campo de fuerza más reciente y preciso para estudiar lípidos de la familia de CHARMM.

### Slipids

Slipids (Stockholm lipids) es un campo de fuerza desarrollado por Joakim Jämbeck y Alexander Lyubartsev específicamente para realizar simulaciones de DM de lípidos y membranas lipídicas. Actualmente tienen parametrizados aproximadamente 30 tipos de lípidos diferentes. Debido a la especificidad hacia lípidos se utilizó este campo de fuerza en conjunto con CHARMM36 para validar los resultados de las simulaciones de DM.

De todo lo expuesto hasta ahora se puede concluir que los antibióticos poliénicos son fármacos que poseen una alta efectividad para atacar infecciones fúngicas sistémicas y efectos colaterales graves que limitan su uso clínico. Sin embargo, la falta de un entendimiento preciso de su mecanismo de acción molecular es un factor importante que ha limitado tanto su aplicación de forma más segura como la búsqueda de un fármaco igualmente potente con menos efectos nocivos. La evidencia acumulada en los últimos veinte años sugiere que la estructura de la membrana es determinante para la acción ionofórica de los polienos, y no así la sola presencia de esteroides como sugiere el modelo clásico de formación de poros. Estructuras lipídicas de particular interés para estudiar el modo de acción de polienos son los dominios que se forman en bicapas con segregación de fases o coexistencia de fases. Se ha encontrado evidencia de la existencia de estos dominios de tamaño de micrómetros en la membrana de *Saccharomyces cerevisiae*. Por su parte, en membranas de mamíferos se ha encontrado evidencia de su existencia, pero de tamaños menores, decenas de nanómetros. Aunado a esta evidencia se tienen resultados que muestran que Nys tiene mayor actividad ionofórica a mayor porcentaje de lípido en fase gel en la bicapa. AFM es una herramienta muy adecuada para observar la segregación de fases presente en bicapas soportadas (SLB) así como la interacción de biomoléculas de interés con dichas bicapas. Considerando todo lo anterior, este trabajo de tesis se dedica a estudiar de manera sistemática el efecto de diferentes concentraciones de colesterol o

ergosterol sobre SLB con segregación de fase mediante AFM. Se busca encontrar alguna diferencia que se pueda relacionar con la presencia de dominios en membranas fúngicas y mamíferas y con la mayor actividad ionofórica de polienos en bicapas con mayor presencia de lípidos en fase gel. Adicionalmente se recurrirá a Simulaciones de Dinámica Molecular y Cálculos Cuánticos con la ayuda de expertos en esta técnica computacional para explicar las observaciones de AFM.

## Capítulo 2: Justificación

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una herramienta muy versátil que permite obtener información topográfica de una superficie con una resolución del orden de 0.1 - 1 nm incluso en condiciones acuosas. En el laboratorio de biofísica del Instituto de Ciencias Físicas se cuenta con un equipo de AFM y con el material y experiencia para la obtención de vesículas de diferentes composiciones y tamaños. Aunque se contaba ya con la infraestructura, hacía falta la pericia experimental para la obtención de bicapas soportadas sobre un sustrato sólido (SLB) de manera cotidiana, para poder acceder a un modelo de membrana que ofrece grandes ventajas al usarse con AFM. Este sistema experimental es apropiado para estudiar las propiedades mecánicas y morfológicas de bicapas y su interacción con polienos, como se ha hecho con otras toxinas. Un mejor entendimiento del papel que juega la membrana celular y su estructura en la actividad ionofórica de polienos ayudará a describir de mejor manera el mecanismo molecular de acción de estos compuestos y desarrollar sistemas de entrega o derivados más seguros e igualmente potentes. El primer paso es estudiar los efectos de ergosterol y colesterol sobre la bicapa.

## Capítulo 3: Hipótesis y objetivos

### 3.1 Hipótesis

Ergosterol y colesterol modifican de manera distinta las propiedades de bicapas compuestas por una mezcla equimolar de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina y esfingomielina de huevo, en particular la segregación de fases.

### 3.2 Objetivo general

Evaluar los efectos de ergosterol y colesterol sobre bicapas compuestas por una mezcla equimolar de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina y esfingomielina de huevo y evaluar la unión de AmB y A21 a dichas bicapas.

### 3.3 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de agregar distintas concentraciones de ergosterol y colesterol sobre la presencia y morfología de dominios presentes en bicapas compuestas por una mezcla equimolar de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina y esfingomielina de huevo mediante microscopía de fuerza atómica.
2. Evaluar el efecto de agregar distintas concentraciones de ergosterol y colesterol sobre respuesta mecánica de bicapas compuestas por una mezcla equimolar de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina y esfingomielina de huevo mediante microscopía de fuerza atómica.
3. Utilizar simulaciones de dinámica molecular para estudiar propiedades moleculares de ergosterol y colesterol y ofrecer una explicación molecular a los fenómenos observados en bicapas lipídicas de mezclas ternarias mediante AFM.
4. Evaluar la adsorción de anfotericina B y su derivado A21 en bicapas con presencia de dominios.

## Capítulo 4: Materiales y métodos

### 4.1. Materiales

Se utilizaron los siguientes lípidos: palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) de origen vegetal y esfingomiélna de huevo (eSM) adquiridos de Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama E.E.U.U.). Ergosterol y colesterol fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, Toluca, Edo. México. La figura 17 muestra esquemas moleculares de los lípidos utilizados. Se utilizó anfotericina B (AmB) en polvo de Beijing Mesochem Technology (Beijing, China) con un grado de pureza de 88 % y su derivado A21 sintetizado en la FES Zaragoza de la UNAM con una pureza de ~84%. Dimetilsulfóxido (DMSO) de Sigma Aldrich (Toluca, México) grado reactivo. Se utilizaron micas de la marca SPI, West Chester, Pensilvania E.E.U.U., que poseen un diámetro de 9.9 mm y de grado V-5. Se usó buffer fosfato salino (PBS-P4417 Sigma-Aldrich) en pastilla que al disolverse en 200 ml de agua contiene 10 mM de buffer de fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ), 2.7 mM de KCl y 137 mM de NaCl. También se utilizó buffer fosfato salino de Dulbecco (DPBS) de 1 litro compuesto por 2.7 mM de KCl, 1.8 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137 mM de NaCl y 10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (anhidro) adquiridos de Sigma-Aldrich, Toluca, Edo. México

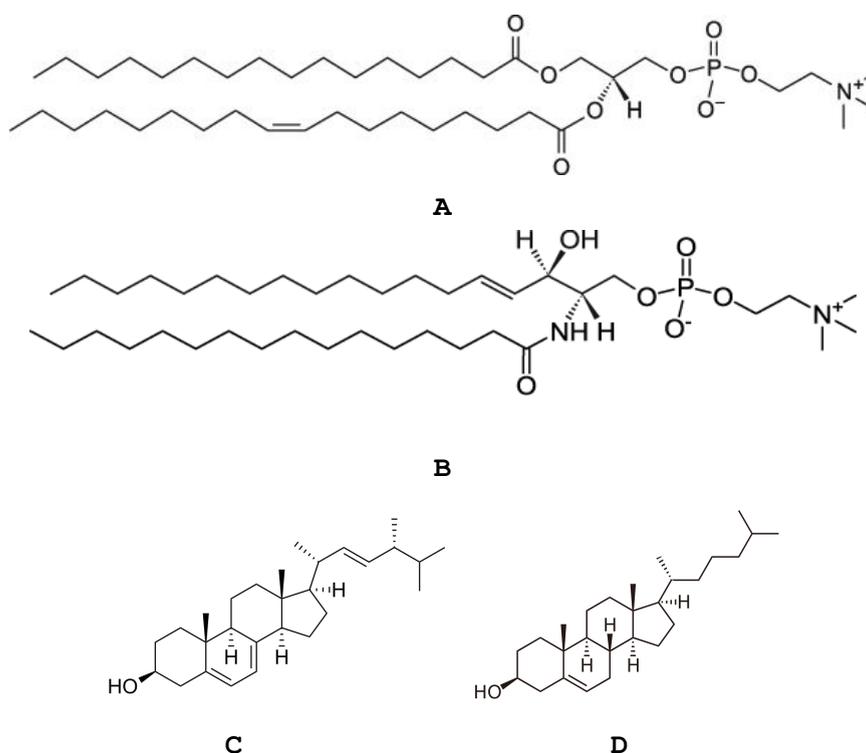


Figura 17. Lípidos utilizados en este trabajo. Se utilizó un esfingolípido, un fosfolípido y dos esteroides. (A) *sn-1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina* o POPC. (B) *Palmitoil-eritro-esfingomiélna* o SM. (C) Ergosterol. (D) Colesterol.

## 4.2. Obtención de vesículas

Para la obtención de bicapas soportadas se utilizaron vesículas unilamelares pequeñas o SUV (~30 nm de diámetro) que se fusionan con el sustrato. Los lípidos se disolvieron en cloroformo o cloroformo/metanol (sólo eSM) según sea el caso. Los lípidos se agregaron a un matraz de vidrio de fondo redondo de 5 ml en las cantidades de acuerdo con las proporciones requeridas de cada mezcla de lípidos. Para preparar 1 ml de emulsión liposomal a partir de soluciones de POPC y eSM a 25 mg/ml y colesterol y ergosterol a 10 mg/ml a una concentración final de lípido total de 0.25 mg/ml se requieren: i) 5.17  $\mu$ l de POPC y 4.83  $\mu$ l de eSM para la mezcla POPC:eSM 1:1; ii) 5.05  $\mu$ l POPC, 4.73 eSM y 0.677  $\mu$ l de colesterol (0.69  $\mu$ l ergosterol) para la mezcla POPC:eSM 1:1 + 5 mol% colesterol (ergosterol); iii) 4.62  $\mu$ l de POPC, 4.32  $\mu$ l de eSM y 2.93  $\mu$ l de colesterol (3.14  $\mu$ l ergosterol) para la mezcla POPC:eSM 1:1 + 20 mol% colesterol (ergosterol); iv) 3.83  $\mu$ l de POPC, 3.58  $\mu$ l eSM y 6.50  $\mu$ l de colesterol (6.66  $\mu$ l ergosterol) para la mezcla POPC:eSM + 40 mol% colesterol (ergosterol). El matraz se colocó en un rotavapor Büchi para evaporar el solvente mediante dos pasos de una hora mientras el matraz rota lentamente. El primero a 40°C y 400 mbar evapora los solventes orgánicos y el segundo a 40°C y 72 mbar evapora rastros de agua. Se retiró el matraz incrementando la presión mediante la inyección de nitrógeno de alta pureza para evitar oxidar los lípidos que se depositaron en las paredes del matraz. Los lípidos se hidrataron con agua desionizada a una concentración de lípido de 0.25 mg/ml. Utilizar agua desionizada favorece la formación de liposomas, a mayor fuerza iónica de la solución menor es la producción de liposomas.

Una vez hidratados los lípidos, se agregó nitrógeno al matraz y este se tapó herméticamente para ser sumergido en un baño ultrasónico por 45 minutos o hasta que la emulsión cambió de color blanco turbio a azul transparente. En este momento la emulsión de liposomas tiene una distribución de tamaños más angosta y las vesículas se asumen unilamelares. Esta emulsión posee en su mayoría vesículas unilamelares pequeñas (SUV), de diámetros entre 20 y 100 nm, aunque también podría tener una población de vesículas de diámetros mayores.

## 4.3. Formación de bicapas soportadas

Utilizando la emulsión SUV (Paternostre et al., 1996) se obtuvieron SLB sobre mica mediante el método de fusión (Kalb et al., 1992; Mou et al., 1994a, 1996). Se utilizaron micas de moscovita de grado V-5 en forma de disco y con diámetro de 9.9 mm. La mica se adhirió al centro de una caja de Petri de 3 ml Nunclon de Thermo Scientific (153066) (Sigma Aldrich, Toluca, México) mediante cinta doble cara transparente (Tuk, México). La caja de Petri utilizada es de 30 mm de diámetro, lo cual permitió su uso en conjunto con el microscopio de AFM XE-Bio.

Antes de usarse, las micas se lavaron con etanol, se tallaron con pañuelos para tareas delicadas que liberan poca pelusa (Kimwipes) y posteriormente se lavaron con agua desionizada. Se colocaron en una plancha a 35°C por 1 hora para evaporar el agua. Las micas deben ser desbastadas previo a la toma de imágenes. De esta manera se retira la capa externa de la mica, exponiendo una capa nueva. Se procedió a depositar 80  $\mu$ l de emulsión liposomal y 20  $\mu$ l de una solución 4 mM de CaCl<sub>2</sub>. Se incubó la muestra a 40°C. Tras un intervalo de tiempo definido se lavó la gota con 3 volúmenes de 50  $\mu$ l de agua desionizada.

Se repitió el lavado un total de 3 veces respetando el tiempo inicial entre la deposición y el primer lavado. Se dejó reposar la muestra a temperatura ambiente (21°C). El tiempo entre la deposición y el primer lavado depende de la mezcla de lípidos. No hay una regla establecida, pero hay una tendencia. Las mezclas con bajo contenido de esterol requirieron entre 5 y 7 minutos, para valores de esterol alto se requirieron 15 minutos. Esto es interesante y parece indicar un comportamiento de ruptura de las vesículas diferente dependiendo del contenido de esterol. Finalmente, antes de iniciar la toma de imágenes se lavó la gota con 5 volúmenes de 50  $\mu$ l de PBS o DPBS. El PBS de Dulbecco (DPBS, Sigma-Aldrich, Toluca, México) conteniendo 137 mM de cloruro de sodio, 2.7 mM de cloruro de potasio, 10 mM de fosfato de sodio y 1.8 mM de fosfato de potasio a un pH de 7.4. Las pruebas realizadas en Saitama se hicieron con una tableta de PBS disuelta en 200 ml con concentraciones de 137 mM de cloruro de sodio, 2.7 mM de cloruro de potasio, 10 mM fosfato de sodio y 10 mM de fosfato de potasio a pH de 7.4.

Para las muestras utilizadas en la Universidad de Saitama se modificó el protocolo debido a la configuración del sistema. Se utilizaron micas de 15 mm de diámetro. La deposición de liposomas con solución de cloruro de calcio a 4 mM sobre la mica fue de 200  $\mu$ l en total. Para las mezclas de POPC/eSM se usó la razón volumen/volumen 125:75 (Emulsión:Solución de calcio) y para la mezcla POPC/eSM/Ergo se utilizó 175:25. Se incubó el volumen 15 minutos a 40°C. Pasados los 15 min se lavó con 5 volúmenes de 100  $\mu$ l de agua desionizada y se permitió la incubación por 10 minutos a 40°C. El proceso de lavado e incubación por 10 minutos se repitió 2 veces para un total de 45 minutos de incubación a 40°C. Pasados estos 45 minutos se lavó la muestra con 5 volúmenes de 100  $\mu$ l de PBS.

#### **4.4. Obtención de imágenes topográficas**

Se utilizó el microscopio de fuerza atómica XE-Bio de Park Systems, Corea, que posee una cámara para muestras biológicas que permitió la medición y visualización de sistemas en condiciones acuosas. Cuenta además con un controlador de temperatura, una mesa anti-vibratoria y todo el sistema está encerrado en una caja acústica que además sirve de jaula de Faraday para evitar la interferencia ocasionada por ruido eléctrico o acústico del exterior. El equipo cuenta con un sistema para la calibración de las micropalancas mediante el método de fluctuaciones térmicas.

Se utilizaron micropalancas de silicio con constantes de resorte menores a 1 N/m (1,000 mN/m). Principalmente se utilizaron micropalancas de Bruker modelo MSNL-10 de constantes elásticas de 10, 30, 100 y 600 mN/m. Este conjunto de varias micropalancas permitió la obtención de imágenes topográficas en modo contacto (micropalancas de 10 y 30 mN/m) de muestras suaves. Además, la sensibilidad de la micropalanca de 600 mN/m permitió la visualización de la ruptura de la bicapa en las curvas de FvD. Se obtuvieron imágenes topográficas de 5 x 5  $\mu$ m<sup>2</sup> de cada mezcla de lípidos de al menos 3 preparaciones distintas. Se utilizaron 5 de las imágenes de mejor calidad (i.e. aquellas con menor número de artefactos como rayones o deriva) y se utilizaron para el cálculo de valores promedio. Para el caso de la unión de AmB y A21 sobre bicapas se repitió la medición en dos preparaciones diferentes para cada caso y se presente la imagen con mejor calidad.

Una vez que la micropalanca se sumergió en la solución acuosa se dejó reposar durante 30 minutos para minimizar fluctuaciones del láser, dependiendo de la sensibilidad de la micropalanca a veces requirió de 1 hora. Cuando el láser dejó de mostrar desviaciones en el tiempo la micropalanca estaba lista para usarse. Las imágenes topográficas se barrieron a frecuencias de adquisición entre 1 y 3.5 Hz. Las fuerzas aplicadas se mantuvieron menores a 1 nN. Las imágenes constan de 256x256 píxeles a menos de que se mencione lo contrario. Las imágenes obtenidas se analizaron con el software propio de Park Systems (XEI). Se recurrió a un aplanado lineal de las imágenes, a menos que se indique lo contrario. En el caso de las imágenes de adsorción de polienos se utilizó el programa de acceso libre Gwyddion (Nečas y Klapetek, 2012) dada la dificultad para el aplanado de dichas imágenes con el programa XEI.

#### **4.5. Obtención de curvas de fuerza contra distancia**

Las curvas de fuerza contra distancia (FvD) se obtuvieron con la micropalanca de 600 mN/m hasta un máximo de 30 nN de fuerza. Los desplazamientos totales de la curva fueron de entre 200 y 400 nm con fuerzas de contactos menores a los 1 nN y velocidades de acercamiento menores a 0.5  $\mu\text{m/s}$ . Las mediciones se hicieron en mapas de 8 x 8 curvas en diferentes regiones de la membrana. Se escogieron los dos mejores mapas de cada mezcla de lípidos para su análisis, es decir aquellos con menor número curvas truncas o faltantes. Los datos se analizaron con una rutina escrita en Matlab. Para llevar a cabo este análisis se contó con la colaboración del Dr. Armando Antillón Díaz del ICF UNAM para elaborar dicha rutina. La rutina buscó el punto de ruptura y evaluó el grosor de la bicapa. Valores de grosor fuera de rango, i.e. menores a 1 nm y mayores a 8 nm, fueron descartados ya que no corresponden a una bicapa.

La fuerza de ruptura que se midió con este procedimiento está relacionada a la presión lateral (Patra, 2005; Ollila et al., 2007a, 2007b) que existe entre los lípidos que componen la membrana. La presión lateral tiene su origen en las interacciones entre las colas de los lípidos de la membrana y se opondría a que la punta de la micropalanca lograra penetrar la bicapa. Si la presión lateral se ve afectada por cambios en la composición o estructura de la bicapa, la fuerza de ruptura también debe presentar algún cambio. Esto es importante ya que la presión lateral se pueda estudiar mediante simulaciones de dinámica molecular lo que sería un complemento para validar los resultados que se obtengan con AFM.

#### **4.6. Cálculos cuánticos de conformaciones de mínima energía**

En colaboración con el Dr. Jorge Hernández Cobos del ICF UNAM, se llevaron a cabo cálculos ab-initio de alta calidad con una base 6-31+G\* para las moléculas de colesterol, ergosterol y coprosterol con el programa Gaussian 09 (rev. D. 01) (Gaussian y Incorporated, 2013). Se utilizaron 2 niveles de cálculo para incluir la energía de correlación electrónica, el método de perturbación de Möller-Plesset hasta segundo orden (MP2) y cálculos de DFT con el funcional de B3LYP con la versión D3 de la dispersión de Grimme y la función de amortiguamiento original de D3 (GD3) (Grimme et al., 2010). Se escogió B3LYP con un término de dispersión debido a que este funcional resultó ser el más cercano a los cálculos cuánticos MP2 para polienos. Se observó que también en el caso de colesterol y ergosterol B3LYP reproducía los valores de MP2. Para evaluar el efecto de solventes sobre las configuraciones y las energías relativas se llevaron a cabo cálculos utilizando el campo SCRF

(Self Consistent Reaction Field) con el método PCM (Polarizable Continuum Model) (Marenich et al., 2009). Las imágenes de las estructuras tridimensionales se generaron utilizando el paquete de MOLDEN (Schaftenaar et al., 2017).

#### **4.7. Simulaciones de Dinámica Molecular**

En colaboración con el Dr. Jorge Hernández Cobos del ICF UNAM, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular (DM) con el programa de simulación GROMACS versión 5.0.2 tanto con el campo de fuerza CHARMM36 como con Slipids para validar y tener certeza en los resultados obtenidos. Se llevaron a cabo simulaciones de una sola molécula sin condiciones de frontera periódicas. Para los cálculos de minimización de energía se utilizó el método de máximo descenso (steepest descent method) con un criterio de convergencia de la fuerza de  $0.1 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ . Se llevó a cabo un “molde simulado” (simulated annealing) durante 40 ns con pasos de 2 fs para cada sistema. Cada molécula se calentó a 303.15 K para luego ser enfriado a 0 K en repetidas ocasiones. Cada paso de calentar-enfriar tuvo una duración de 2.5 ns. Se utilizó el termostato de Nosé-Hoover para controlar la temperatura. Para explorar el espacio conformacional de las moléculas se llevaron a cabo simulaciones de DM a 303.15 K. Pensamos que esta temperatura nos proporcionará un mayor rango de posibles conformaciones. También aquí se utilizó el termostato de Nosé-Hoover para controlar la temperatura y también se simuló por 40 ns con pasos de 2 fs. Cada 0.2 ps se almacenaron las configuraciones en el archivo de trayectoria. Las trayectorias se analizaron utilizando las herramientas de superposición de conjuntos y de cúmulos de conjuntos del programa UCSF Chimera (versión 1.13.1) (Pettersen et al., 2004).

## Capítulo 5: Resultados

### 5.1. Morfología y dinámica de bicapas soportadas

#### 5.1.2. Efecto de los esteroides sobre la morfología de los dominios

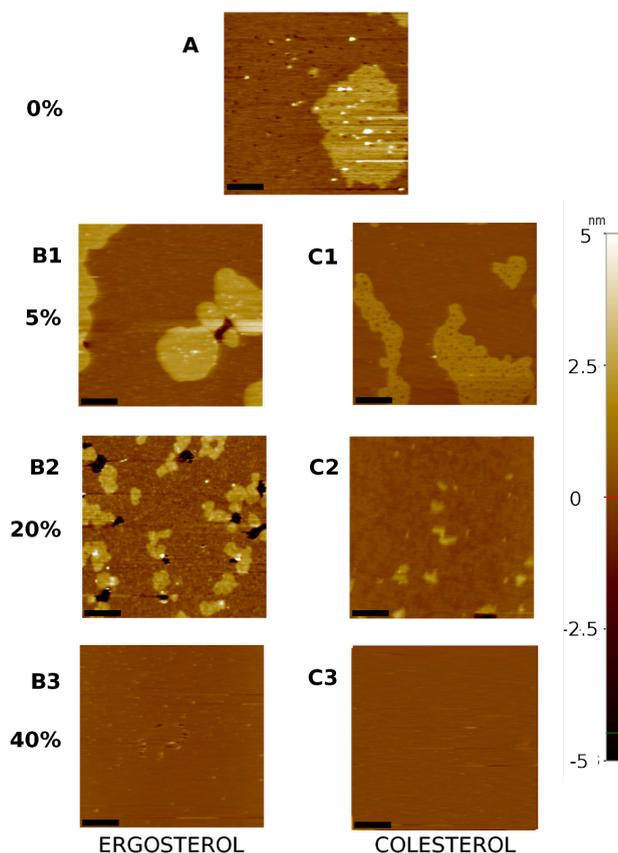


Figura 18. Imágenes topográficas de AFM representativas de cada mezcla estudiada. Se muestran áreas de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  para bicapas soportadas compuestas de POPC/eSM 1/1 mol/mol con 0 (A), 5 (B1 y C1), 20 (B2 y C2) y 40 mol% de esterol (B3 y C3). El rango en  $z$  es de 10 nm y es el mismo para todas las imágenes. Color café claro indica mayor altura mientras que café oscuro indica alturas menores. La escala es de  $1 \mu\text{m}$ . Las imágenes de la columna de la izquierda corresponden a ergosterol (B1-B3) y las imágenes de la columna de la derecha corresponde a colesterol (C1-C3). Imágenes topográficas obtenidas mediante modo contacto con una micropalanca tipo MSNL-10 con constante de resorte de  $20 \text{ mN/m}$ .

La figura 18 muestra imágenes topográficas de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  características de cada mezcla estudiada. Se muestran dos columnas correspondientes a cada esterol para una mejor comparación. Se observa que la mezcla binaria de POPC y eSM presenta dominios de gran tamaño,  $\sim 4 \mu\text{m}^2$  de diámetro. Estos dominios presentan agujeros, es decir zonas donde la mica no se cubrió por lípidos, y por tanto los dominios no son uniformes. Al agregar 5 mol% de esterol la morfología cambia ligeramente en ambos casos. La cobertura de los dominios, área relativa, sigue siendo amplia pero su morfología en la bicapa que contiene colesterol es más bien de filamentos, además de que los dominios no son uniformes, similar a la mezcla binaria. En la bicapa con ergosterol a 5 mol%, los dominios parecen ser más uniformes que en el caso binario y su morfología es variada, aunque parece predominar

una estructura de disco. A concentraciones de 20 mol% de esteroles se observa una clara diferencia entre los dos esteroles. El colesterol reduce la formación de dominios a esta concentración mientras que el ergosterol sigue presentando dominios de diámetros de micras, aunque de dimensiones menores que en el caso de 5 mol%. La cobertura de dominios presentes en la bicapa con ergosterol se ve reducida, aunque sigue siendo apreciable, ver figura 20. A 40 mol% de concentración de esteroles los dominios se pierden tanto para colesterol como ergosterol y las bicapas se observan homogéneas. Un análisis más minucioso muestra que para el caso de membranas con ergosterol existen fluctuaciones de alrededor de 0.4 nm. Esto se tratará más adelante.

Para cuantificar el efecto de los esteroles sobre los dominios se generaron histogramas de altura a partir de los datos de las imágenes topográficas. En la figura 19 se muestran los histogramas obtenidos a partir de las imágenes topográficas de la figura 18. Los valores de las alturas de las regiones de bicapa y dominio son los presentados en la figura 21 y la tabla 2. Estos valores se obtuvieron al medir la diferencia de altura entre regiones de mica y la bicapa o los dominios. Se eligió presentar los resultados de este modo para observar al mismo tiempo el cambio en la diferencia de altura entre ambas regiones y el engrosamiento de dichas regiones. Se muestran por separado las diferentes concentraciones de esteroles, 0-40 mol%. A 0 mol%, evidentemente solo hay un histograma, y a las concentraciones de 5, 20 y 40 mol% se muestran los resultados obtenidos con ambos esteroles para su comparación. Lo primero que se observa claramente es la presencia de dos picos en 3 de las 4 concentraciones. El primero, de mayor altura, corresponde a la región enriquecida en POPC que denominamos bicapa. El segundo pico, de menor altura, corresponde a la región enriquecida en eSM que denominamos dominio. Al agregar esteroles a la mezcla de la bicapa el segundo pico se ve modificado (figura 19 A vs B-D). Además, el efecto es distinto si la bicapa contiene colesterol o ergosterol. Para 0 mol% de esteroles la diferencia pico -pico es de ~1 nm, i.e. una diferencia de altura promedio entre la bicapa y el dominio. Al agregar 5 mol% de esteroles la ocurrencia de ambos picos se desplaza a la derecha, es decir a grosores mayores, sin embargo, en el caso de ergosterol la diferencia de altura (diferencia entre picos) es de ~2 nm mientras que en el caso de colesterol esta diferencia es de ~1 nm, parecida al caso sin esteroles. A concentraciones de 20 mol% de esteroles el segundo pico se ve bastante reducido en altura y área para ambos esteroles en comparación con los casos de 0 y 5 mol% de esteroles. Esta reducción es mucho más dramática para el colesterol, en donde el segundo pico es casi inexistente. En el caso de ergosterol a pesar de la reducción del altura y área, el segundo pico se resuelve con claridad y se observa una diferencia de altura entre ambas regiones de ~2 nm. El segundo pico, correspondiente a los dominios, se pierde por completo a 40 mol% de ambos esteroles de acuerdo con lo observado en las imágenes topográficas de la figura 18, aunque en este caso se observa que los grosores de ambas membranas incrementaron considerablemente con respecto al caso sin esteroles. En el caso de 0 mol% esteroles el grosor de la bicapa era de ~3 nm y de los dominios de ~4 nm. Mientras que para el caso de 40 mol% de esteroles el grosor de la bicapa es ~5 nm para el caso de colesterol y de ~5.5 nm para el caso de ergosterol.

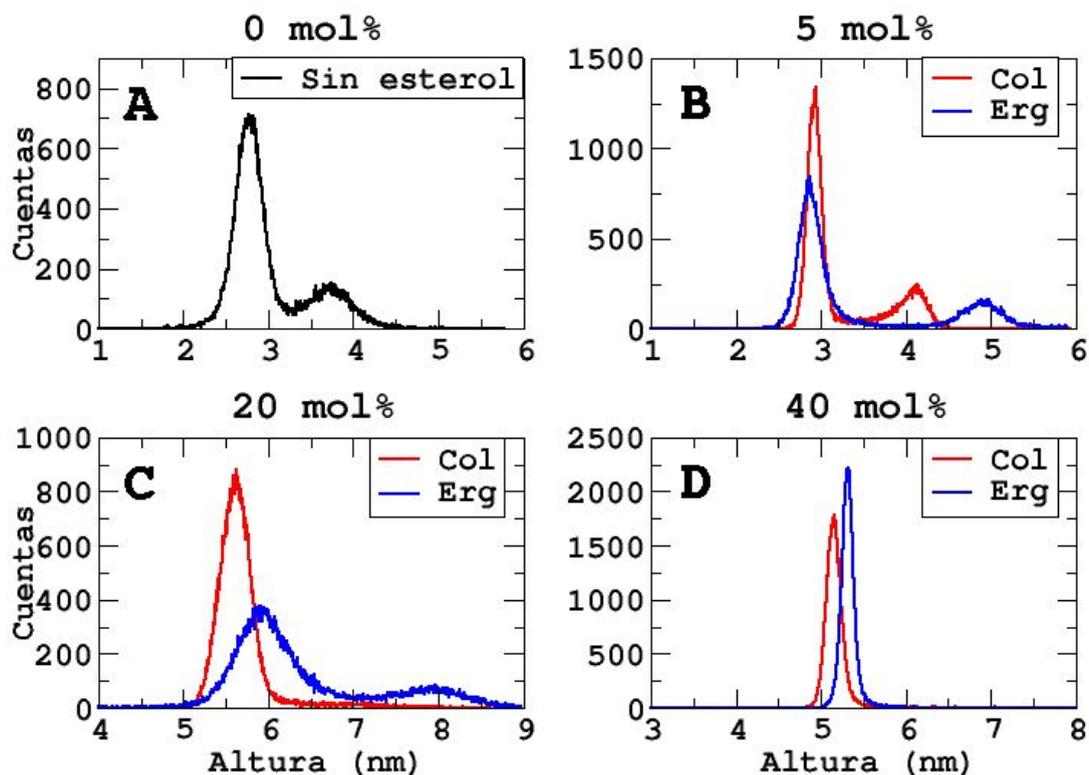


Figura 19. Histogramas de altura obtenidos a partir de imágenes topográficas de AFM. Histogramas de alturas obtenidos a partir de las imágenes topográficas de la figura 18 correspondientes a bicapas soportadas compuestas por POPC/eSM 1/1 mol/mol con 0 mol% (A), 5 mol% (B), 20 mol% (C) y 40 mol% de esterol (D). Los histogramas de alturas para los casos sin esterol (negro), con colesterol (rojo) y con ergosterol (azul) se muestran con colores diferentes para su mejor comparación. En todos los casos se observa un pico más alto correspondiente a la región enriquecida en POPC o bicapa. En los casos de 0, 5 y 20 mol% de esterol (A-C) se observa un segundo pico correspondiente a los dominios enriquecidos en eSM. El segundo pico alcanza su máximo número de cuentas en distintos valores dependiendo de la cantidad y tipo de esterol presente. En el caso de 40 mol% de esterol el segundo pico no se observa.

Al realizar un ajuste gaussiano a cada histograma de alturas correspondientes a 0, 5 y 20 mol% de esterol se puede obtener más información de la altura relativa entre los dominios y la bicapa, así como la cobertura de los dominios. Se realizó este ajuste a 5 imágenes topográficas diferentes para cada caso y se obtuvo el promedio y su desviación estándar. También se calculó el valor P mediante una prueba t de Student para los valores obtenidos para una misma concentración de esterol (colesterol vs ergosterol). Estos resultados se muestran en la figura 20. En la figura se observa como al agregar esterol a la mezcla de la bicapa, se afecta la altura relativa entre la bicapa y los dominios, figura 20 A. Este cambio no es muy pronunciado para el caso de colesterol a 5 y 20 mol%, mientras que para el caso de ergosterol el cambio es dramático. La diferencia de altura aumenta un 100% al pasar de 1 a 2 nm para ergosterol a 5 y 20 mol%. En contraste, colesterol solo presenta un cambio de 1 a ~ 1.3 nm al comparar el caso sin esterol con el caso de 20 mol%. En el caso de la cobertura de los dominios se observa que ambos esterol los aumentan cuando están presentes a una concentración de 5 mol%, sin embargo, a 20 mol% la cobertura disminuye. En el caso de colesterol la cobertura cae incluso por debajo del valor de cobertura inicial a cero esterol. Para ergosterol a 20 mol% el valor es similar al valor a cero esterol, a pesar de que el

tamaño de los dominios es menor como se puede observar en la figura 18. El caso de 40 mol% no se presentó dado que no había presencia de dominios a esta resolución.

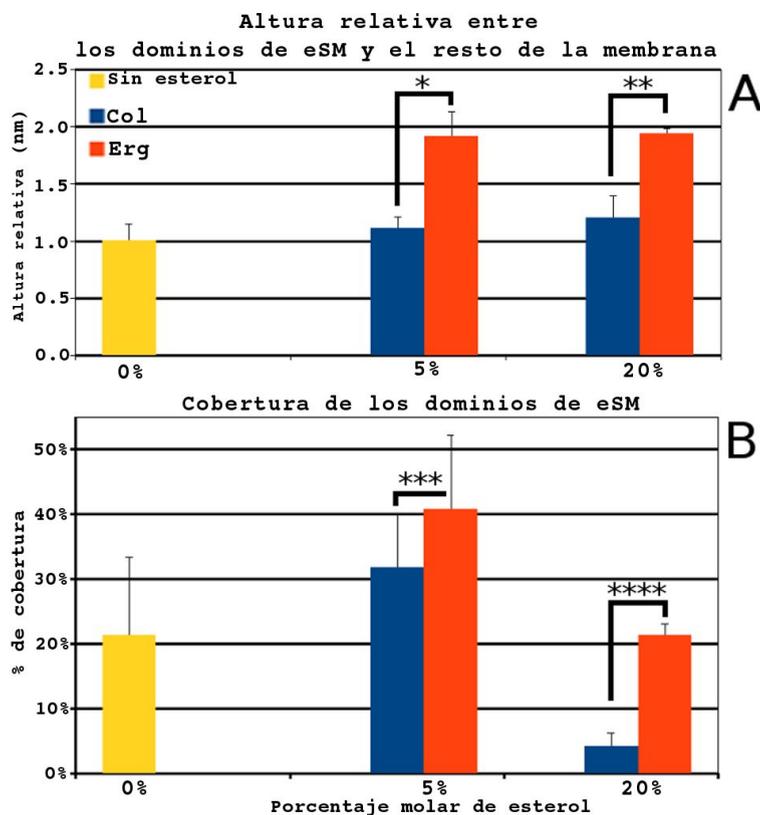


Figura 20. Gráficas comparativas de la altura relativa de los dominios (A) y del porcentaje de cobertura de estos (B). Bicapas soportadas compuestas de POPC/eSM 1/1 mol/mol + esterol. Se muestra el caso sin esterol (amarillo) y los casos con 5 y 20 mol% de colesterol (azul) y de ergosterol (naranja). Valores graficados muestran promedio y desviación estándar de 5 áreas de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  distintas para cada caso y de al menos dos preparaciones distintas. El caso de 40 mol% de esterol no se muestra debido a que dichas mezclas no presentan formación de dominios suficiente para obtener datos. Valores P obtenidos de una prueba-t de Student para dos muestras independientes, del mismo tamaño muestral y de igual varianza: \* $P=0.000073$ ; \*\* $P=0.000035$ ; \*\*\* $P=0.192$ ; \*\*\*\* $P=0.0000052$ .

Para tener una idea del efecto de engrosamiento de la bicapa se buscaron imágenes de todos los casos en donde se observará una región sin bicapa que correspondiera a la mica limpia. A partir de estas imágenes se pudo calcular el grosor de la bicapa y los dominios. La figura 21 muestra las imágenes utilizadas, un perfil de altura y los valores de grosor de la bicapa y de la diferencia de altura entre la bicapa (cursores rojos) y el dominio (cursores verdes). La diferencia de alturas se calculó con el programa XEI de Park Systems. Se recurrió a la utilidad de diferencias promedio en donde se escogió una región amplia de cada zona de interés. Los valores presentados, son entonces, promedios entre las regiones de interés. En el caso de 40 mol% se dieron dos situaciones interesantes que cabe mencionar. En el caso de 40 mol% ergosterol se observan ondulaciones que, al medir la diferencia de altura promedio, están a  $\sim 0.5$  nm por encima de la región más plana. Esto sugiere que aún a esta concentración hay presencia de dominios, aunque por sus dimensiones se pierden al hacer un histograma de alturas. En el caso de 40 mol% colesterol se observa lo contrario, la región de bicapa es completamente lisa. En este caso ambos cursores, rojo y verde, muestran la altura de la bicapa de  $\sim 5$  nm. Utilizando los valores de las mediciones se calcularon los valores del grosor de los dominios en cada caso y se

muestran en la tabla 2 para una mejor comparación del efecto de los esteroides sobre este parámetro.

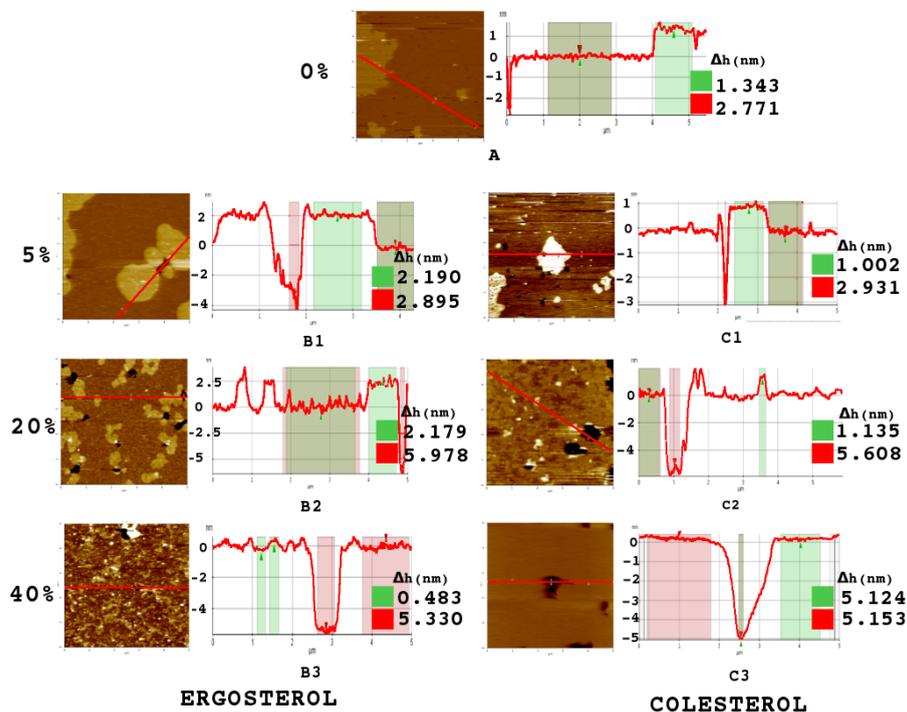


Figura 21. Perfiles de altura de bicapas soportadas de POPC/eSM 1/1 mol/mol con diferentes concentraciones de esterol. Imágenes topográficas y perfiles de altura de bicapas soportas que presentan dominios y defectos para poder medir la altura de cada región de la bicapa. Se presentan los casos de 0 (A), 5 (B1 y C1), 20 (B2 y C2) y 40 (B3 y C3) mol% de esterol. Imágenes de la columna izquierda corresponden a ergosterol (B1-B3) mientras imágenes de la columna derecha corresponden a colesterol (C1-C3). En todos los casos se muestran dos cursores (rojo y verde) de altura promedio proporcionados por el programa de análisis XEI de Park Systems. Para los casos 0, 5 y 20 mol% de esterol (A, B1, B2, C1, C2) y para 40 mol% ergosterol (B3) los cursores corresponden a la altura entre la mica y la zona enriquecida en POPC (rojo) y a la altura entre la zona enriquecida en POPC y la zona de dominio, enriquecida en eSM (verde). En el caso de 40 mol% colesterol (C3) ambos cursores corresponden a la altura entre la mica y la zona enriquecida en POPC. Imágenes topográficas obtenidas mediante modo contacto con una microbalanza tipo MSNL-10 con constante de resorte de 20 mN/m.

En la tabla 2 podemos observar que hay una diferencia en el efecto de engrosamiento de la bicapa producido por colesterol o ergosterol. En particular para el caso de los dominios, que se supusieron enriquecidos en eSM, hay una diferencia significativa en el engrosamiento producido por ambos esteroides. Desde concentraciones bajas el ergosterol incrementa en mayor medida el grosor de los dominios. En la bicapa que contiene 20 mol% de ergosterol el grosor de los dominios incrementa en un factor de 2 con respecto al grosor a cero esterol. Esto es algo realmente sorprendente que se tratará más adelante. En contraste el grosor de los dominios de la bicapa con 20 mol% de colesterol incrementa en un ~60%, un incremento significativo, aunque menor que en el caso de ergosterol. Algo muy sorprendente es que a 40 mol% de esterol, el grosor de la bicapa se volvió homogénea, o casi homogénea en el caso de ergosterol, con un valor intermedio entre los valores del grosor a cero esterol y a 20 mol%. Siendo el grosor final mayor que en el caso sin esterol y menor que en caso de 20 mol%. Este fenómeno se discutirá más adelante.

Tabla 2. Datos del grosor obtenidos a partir de la figura 21. Se denomina Dominio 1 a los dominios de mayor altura, mientras que se denomina Dominio 2 a los dominios de menor altura.

<i>mol%</i> <i>esterol</i>	<i>Ergosterol</i>		<i>Colesterol</i>	
	<i>Grosor</i> <i>Dominio 1 (nm)</i>	<i>Grosor</i> <i>Dominio 2 (nm)</i>	<i>Grosor</i> <i>Dominio 1 (nm)</i>	<i>Grosor</i> <i>Dominio 2 (nm)</i>
0	2.771	4.114	2.771	4.114
5	2.895	5.085	2.931	3.933
20	5.978	8.157	5.608	6.743
40	5.330	5.813	5.139	N/O

Las imágenes topográficas resultantes se muestran en la figura 22. La misma figura muestra un perfil de altura para cada imagen. Se muestran imágenes topográficas de una bicapa equimolar de POPC/eSM con 0 y 20 mol% de ergosterol. Las imágenes obtenidas por FM-AFM son barridos de un área de  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ , esto es un área menor que las obtenidas anteriormente para poder observar con mayor detalle la superficie de las bicapas. En el caso de la bicapa binaria se observa la existencia de dominios de dimensiones de  $\sim 200$  nm aglomerados en racimos. Esto sugiere que lo que se observó como un dominio de gran extensión en las imágenes topográficas de contacto, realmente son racimos de dominios de menor tamaño. En el caso de la bicapa que contiene 20 mol% de ergosterol, se observa que los dominios son más uniformes. No tienen la misma forma de racimos de dominios pequeños. Al medir la diferencia de alturas entre ambas regiones de la membrana, se observa que sí hay una diferencia con respecto de las alturas relativas medidas en modo contacto. Las alturas relativas medidas con FM-AFM son mayores. En el caso de la mezcla binaria POPC/eSM la altura relativa aumentó de  $\sim 1.0$  a  $\sim 1.5$  nm mientras que para la mezcla ternaria POPC/eSM + 20 mol% ergosterol ésta aumentó de  $\sim 2.0$  a  $\sim 2.4$  nm. En ambos casos la diferencia es de  $\sim 0.5$  nm.

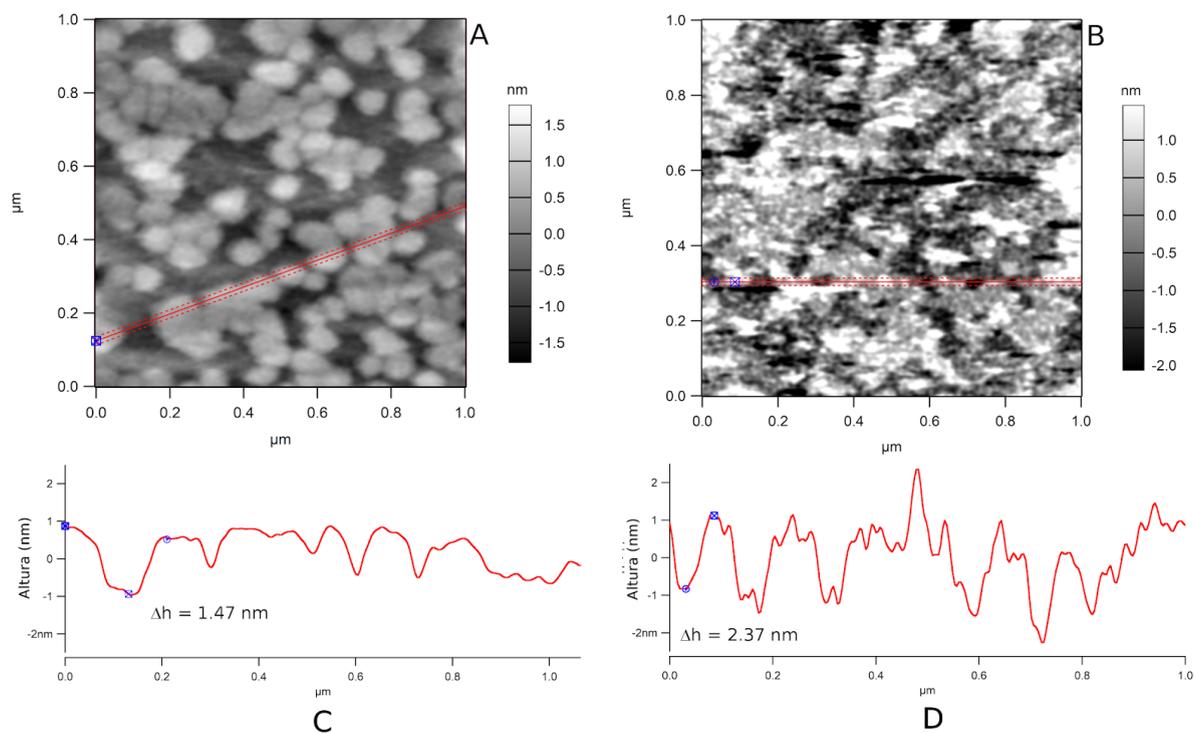


Figura 22. Imágenes topográficas de FM-AFM y perfiles de altura de bicapas soportadas de POPC/eSM 1/1 mol/mol a 0 y 20 mol% de ergosterol. Imágenes topográficas (A y B) de FM-AFM de  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  de área escogida de una zona con presencia de dominios. El aumento en la resolución permite observar que los dominios no son uniformes y que están conformados por múltiples discos. Se muestran perfiles de altura correspondientes a cada imagen topográfica (C y D). Los perfiles de altura son el resultado del promedio de 5 líneas contenidas dentro de las líneas punteadas. La altura relativa ( $\Delta h$ ) entre la zona enriquecida en POPC y la enriquecida en eSM se muestra en cada perfil. Los valores obtenidos para  $\Delta h$  son ligeramente mayores que los valores correspondientes obtenidos mediante AFM de contacto lo que sugiere un efecto de compresión al utilizar el modo de contacto de AFM. Las imágenes topográficas se filtraron utilizando un filtro gaussiano de  $3 \times 3$  para resolver mejor los dominios. Imágenes topográficas obtenidas mediante modo no contacto con una micropalanca tipo NCHRAuD con constante de resorte y frecuencia de resonancia nominales de  $42 \text{ N/m}$  y  $150 \text{ kHz}$ .

### 5.1.3. Efecto de los esteroides sobre la respuesta mecánica de la membrana

Los mapas de curvas FvD se analizaron para obtener los valores de la fuerza de ruptura. De los mapas de curvas FvD también se obtuvieron las posiciones de cada medición sobre la membrana. De esta manera se pudo relacionar cada ruptura a una zona de dominio o bicapa. Con estos datos se graficaron los histogramas de fuerza de ruptura que se muestran en la figura 23. Los histogramas en rojo corresponden a valores obtenidos sobre la bicapa. Los histogramas en azul corresponden a valores de fuerza de ruptura obtenidos sobre un dominio. Para los casos de 20 mol% colesterol y 40 mol% esterol solo se distingue una sola fase en las imágenes topográficas por lo que solo se presenta el histograma verde, que indica una superficie homogénea. En el caso particular de 40 mol% de ergosterol se observan algunos puntos alrededor de 20 nN. Las posibles implicaciones de esto se discutirán más adelante.

Los histogramas del caso de cero esterol muestran un pico bien definido en  $\sim 5 \text{ nN}$  y otro más ancho centrado  $\sim 7 \text{ nN}$ . Al agregar 5 mol% esterol a la mezcla binaria se observa un cambio en las fuerzas de ruptura que son distintas para ergosterol y para colesterol.

Ergosterol incrementa sustancialmente la fuerza de ruptura de los dominios respecto al valor a cero esterol, de  $\sim 7$  a  $\sim 15$  nN. Pero el valor de las regiones de bicapa se mantienen cerca del valor a cero esterol,  $\sim 4$  nN. Por su parte colesterol incrementa la fuerza de ruptura promedio de ambas regiones, aunque el incremento es menor al pasar de  $\sim 5$  y  $\sim 7$  nN a  $\sim 9$  y  $\sim 11$  nN para las regiones de bicapa y dominio respectivamente. Al igual que los resultados de cobertura de los dominios, a 20 mol% esterol hay una diferencia muy pronunciada entre colesterol y ergosterol. Mientras que el histograma de la bicapa con 20 mol% colesterol muestra un solo pico alrededor de 4 nN, para el caso de 20 mol% de ergosterol se observan claramente dos picos. Los valores del centro de los picos para este caso son de  $\sim 5$  y  $\sim 10$  nN para la bicapa y los dominios respectivamente. Finalmente, como ya se mencionó para 40 mol% esterol ambos casos presentan un solo histograma, lo que sugiere una bicapa homogénea mecánicamente hablando.

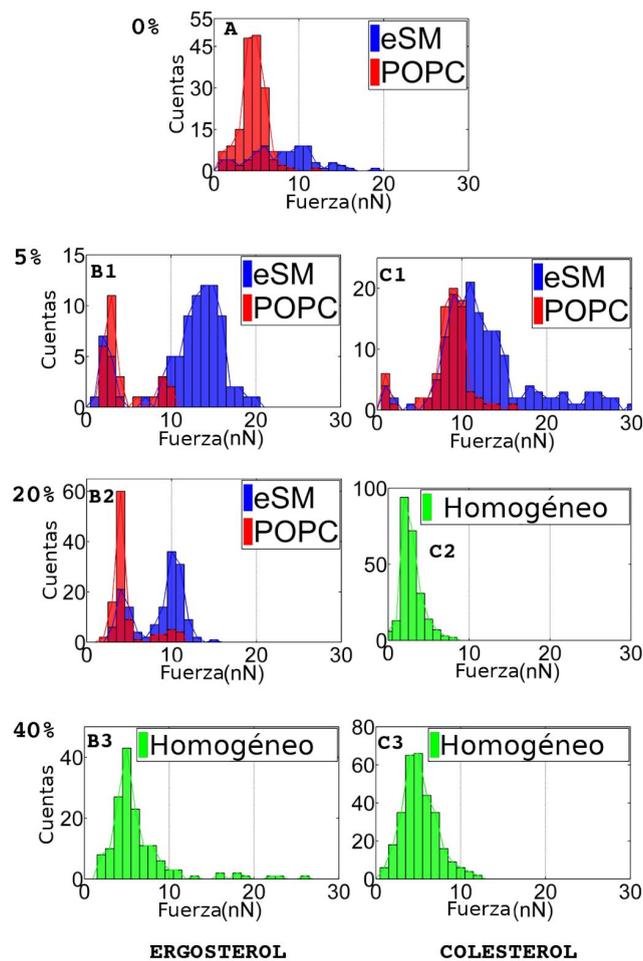


Figura 23. Histogramas de las fuerzas de ruptura resultantes al perforar bicapas soportadas compuestas de POPC/eSM 1/1 mol/mol a diferentes concentraciones de esterol. Se muestra los histogramas de fuerza para 0 (A), 5 (B1 y C1), 20 (B2 y C2) y 40 mol% (B3 y C3) de esterol. Histogramas de la columna izquierda corresponden a ergosterol (B1-B3) mientras que histogramas de la columna derecha corresponden a colesterol (C1-C3). Los valores obtenidos se catalogaron dependiendo de la región donde se obtuvo la medición, ya sea la región enriquecida en POPC (rojo) o de la enriquecida en eSM (azul). En los casos en los que las imágenes topográficas no permitieron resolver la existencia de dominios se les catalogó como "homogéneo" y los histogramas correspondientes se muestran en color verde.

#### 5.1.4. Nanodominios en bicapas de POPC/eSM y 40 mol% de ergosterol

De las imágenes topográficas de la figura 21 y del histograma de las fuerzas de ruptura correspondientes a la bicapa con 40 mol% de ergosterol se observa que existen irregularidades de altura y eventos de ruptura fuera de la distribución central, esto sugiere la existencia de dominios de menor tamaño que no se resolvieron a la escala escaneada y que sí se detectaron al medir la fuerza de ruptura. Vale la pena mencionar que en la figura 18 no se observan estas irregularidades topográficas debido a la escala en z que no permite resolver estas pequeñas estructuras. Se obtuvieron imágenes topográficas de bicapas con 40 mol% de esterol en un área de  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ . La mejor imagen obtenida se muestra en la figura 24. Se observa una estructura en la bicapa que contiene ergosterol mientras que en la bicapa con colesterol no se observa una estructura definida que sugiera la existencia de dominios de menor tamaño. La dificultad en obtener una buena imagen a esta escala podría deberse al modo de contacto con el que se obtuvieron. Se debe repetir en modo de no-contacto y modo FM-AFM.

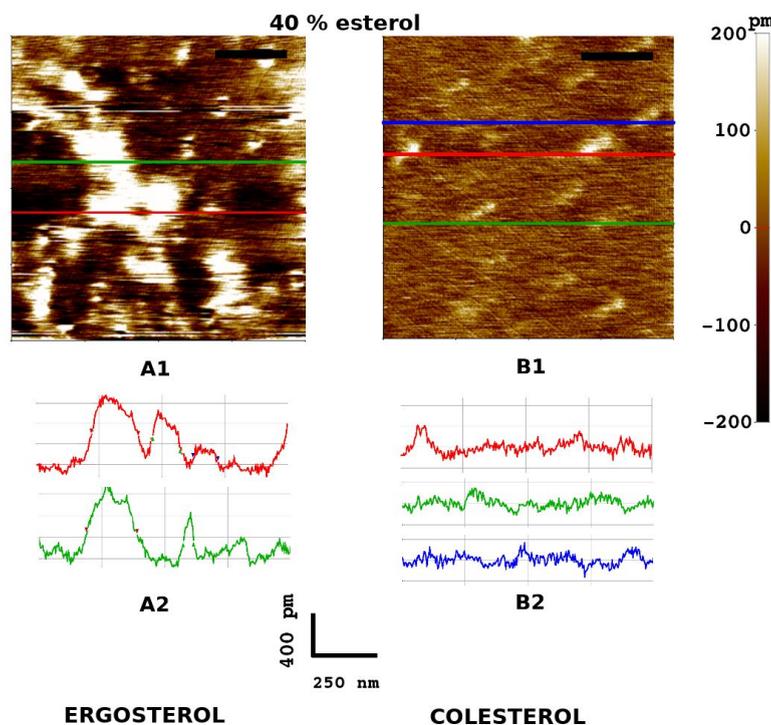


Figura 24. Imágenes topográficas de AFM y varios perfiles de altura de bicapas soportadas de POPC/eSM 1/1 mol/mol + 40 mol% ergosterol (A) o colesterol (B). Imágenes obtenidas mediante barridos de  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ . En el caso de la bicapa que contiene ergosterol se observa una estructura de una altura significativa, aunque el barrido no es muy limpio. En el caso de la bicapa que contiene colesterol no se observan estructuras que se pudieran considerar dominios. Barras de escala de 200 nm. Imágenes topográficas obtenidas mediante modo contacto con una micropalanca tipo MS/NL-10 con constante de resorte de 20 mN/m

## **5.2 Adsorción de AmB y A21 sobre bicapas soportadas. Resultados preliminares.**

Como se mencionó en el Capítulo 1, se tiene evidencia que sugiere que la estructura de la membrana juega un papel importante en el mecanismo de acción de antibióticos poliénicos como AmB y Nys. En particular existe evidencia que sugiere que los polienos ven favorecida su inserción en la membrana y su actividad ionofórica en membranas lipídicas que presentan una coexistencia de fases de una fase desordenada y otra ordenada ( $l_o+l_d$  o líquido-gel), incluso sin la presencia de esteroides. Es por eso por lo que se decidió estudiar la adsorción de AmB y de su derivado A21 en las bicapas soportadas estudiadas anteriormente. En particular aquellas mezclas en donde se observa claramente la presencia de dominios de fase gel.

Para la evaluación del lugar de adsorción de los antimicóticos polienos AmB y A21 en bicapas con presencia de dominios se obtuvieron imágenes topográficas de bicapas soportadas en presencia de polienos. AmB se disolvió en DMSO a una concentración de 5 mM y A21 se disolvió en agua desionizada con 10 mM de HEPES y a un pH de 7.3 y una concentración de 5 mM. Se agregó el polieno en volúmenes correspondientes a 0.5  $\mu$ M y se dejó reposar la muestra 10 minutos. Posteriormente se adquirieron imágenes topográficas en modo contacto con micropalancas de constante de resorte de 0.05 N/m. Se agregó el polieno hasta observar un cambio en las imágenes, como la presencia de agregados, remoción de bicapa o cambio en la morfología de los dominios. Se utilizaron las mezclas POPC/eSM 1:1 con 0 y 20 mol% esteroles debido a que con y sin ergosterol las bicapas muestran dominios mientras que la mezcla con colesterol no presenta una clara formación de dominios, lo cual permite evaluar diferencias en el efecto de polienos en a membranas modelo de hongo y de mamífero.

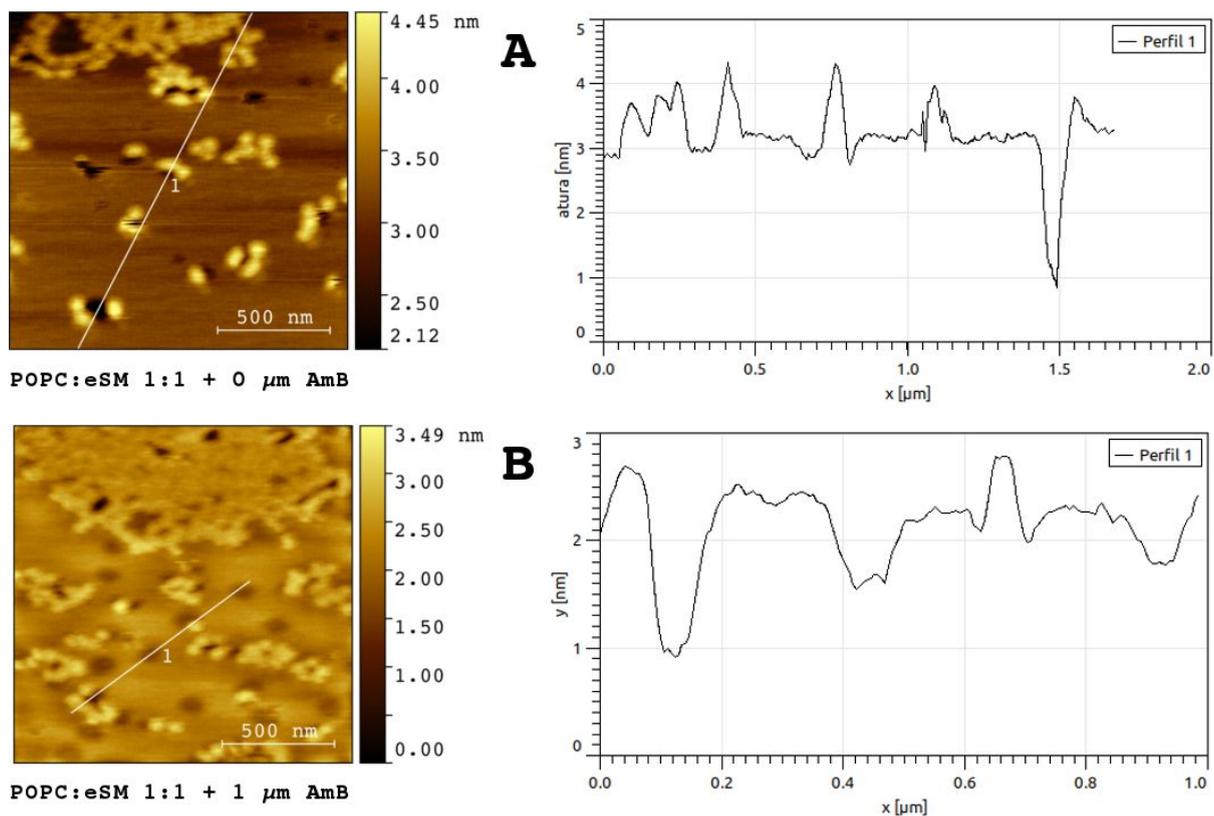


Figura 25. Imágenes topográficas de AFM y un perfil de alturas de bicapas soportadas formadas por POPC/eSM a razón equimolar sin (A) y con  $1 \mu\text{M}$  de AmB (B). En el caso en el que hay AmB presente se observan estructuras más altas que el resto de la bicapa, particularmente en los bordes. Barras de escala de 500 nm. Imágenes topográficas obtenidas mediante modo contacto con una micropalanca tipo MS/NL-10 con constante de resorte de nominal de 30 mN/m.

La figura 25 A presenta una imagen topográfica y un perfil de altura que muestra la presencia de dominios típicos de la mezcla sin esterol, con una diferencia de altura de  $\sim 1$  nm. Al agregar  $1 \mu\text{M}$  de AmB se nota la presencia de zonas de compresión, ver figura 25 B. Estas estructuras podrían ser zonas donde se ha insertado AmB y obliga a la bicapa a reducir su grosor. Estas regiones podrían contener canales iónicos de AmB. La figura 26 muestra el efecto de agregar A21 a la misma mezcla. Se observa un comportamiento parecido, sin embargo, existe adsorción y agregación de A21 en los bordes y el interior de los dominios, ver figura 26 B. Estas estructuras se observan a una concentración de  $2 \mu\text{M}$ , una concentración mayor que en el caso de AmB. En ambos casos, AmB y A21, no parece existir un efecto pronunciado sobre los dominios, pero sí sobre la fase líquida.

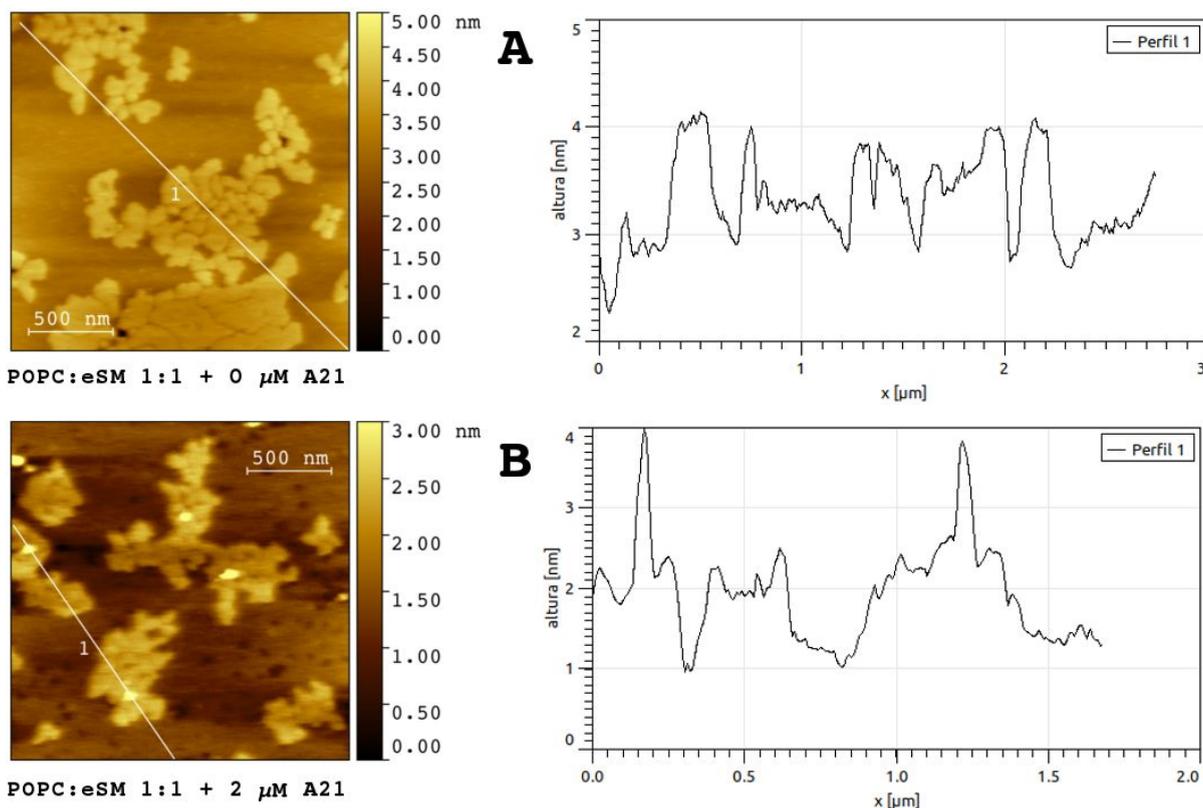


Figura 26. Imágenes topográficas de AFM y un perfil de alturas de bicapas soportadas formadas por POPC/eSM a razón equimolar sin (A) y con 2  $\mu\text{M}$  de A21 (B). En el caso en el que hay AmB presente se observan estructuras más altas que el resto de la bicapa, tanto en los bordes como en las regiones internas de los dominios. Barras de escala de 500 nm. Imágenes topográficas obtenidas mediante modo contacto con una microbalanza tipo MSNL-10 con constante de resorte de nominal de 30 mN/m.

Las imágenes topográficas y perfiles de altura de bicapas soportadas compuestas de la mezcla POPC/eSM 1:1 + 20 mol% ergosterol en presencia de AmB y A21 se muestran en la figura 27 y figura 28. Al igual que en el caso anterior para A21 se observa la aparición de estructuras altas en los bordes de los dominios, aunque ahora en el caso de 1  $\mu\text{M}$  de AmB también se observan. Para el caso de A21 se muestran imágenes para 1 y 2  $\mu\text{M}$ , figura 28 B y C respectivamente, ya que para esta mezcla se observó, además de la aparición de estructuras altas, un cambio en los dominios. De las imágenes topográficas se puede observar que el dominio se ensancha, aumenta su tamaño en el plano XY. Esto está acompañado de una reducción en la altura relativa entre los dominios y el resto de la bicapa. En los paneles A y B, 0 y 1  $\mu\text{M}$  respectivamente, la altura relativa se encuentra entre 1.5 y 2 nm. Al agregar 2  $\mu\text{M}$  de A21 la altura relativa se encuentra entre 1 y 1.5 nm, panel C. Desde 1  $\mu\text{M}$  se observa la aparición de estructuras altas en los bordes de los dominios. A 2  $\mu\text{M}$ , además de los agregados se observa remoción de lípido de la bicapa.

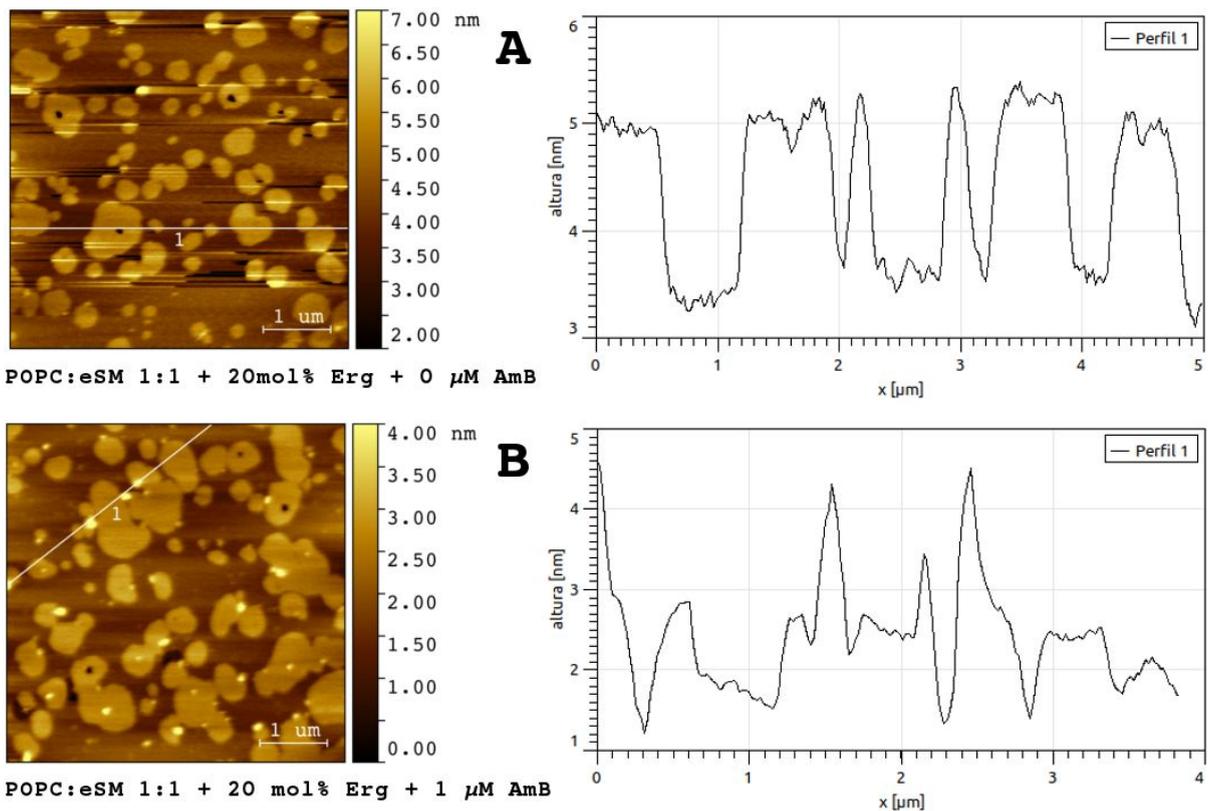


Figura 27. Imágenes topográficas de AFM y un perfil de alturas de bicapas soportadas formadas por POPC/eSM a razón equimolar + 20 mol% ergosterol sin (A) y con 1  $\mu\text{M}$  de AmB (B). En el caso en el que hay AmB presente se observan estructuras más altas que el resto de la bicapa, particularmente en los bordes, aunque hay algunos en el interior de los dominios. Barras de escala de 1  $\mu\text{m}$ . Imágenes topográficas obtenidas mediante modo contacto con una micropalanca tipo MSNL-10 con constante de resorte de 20 mN/m.

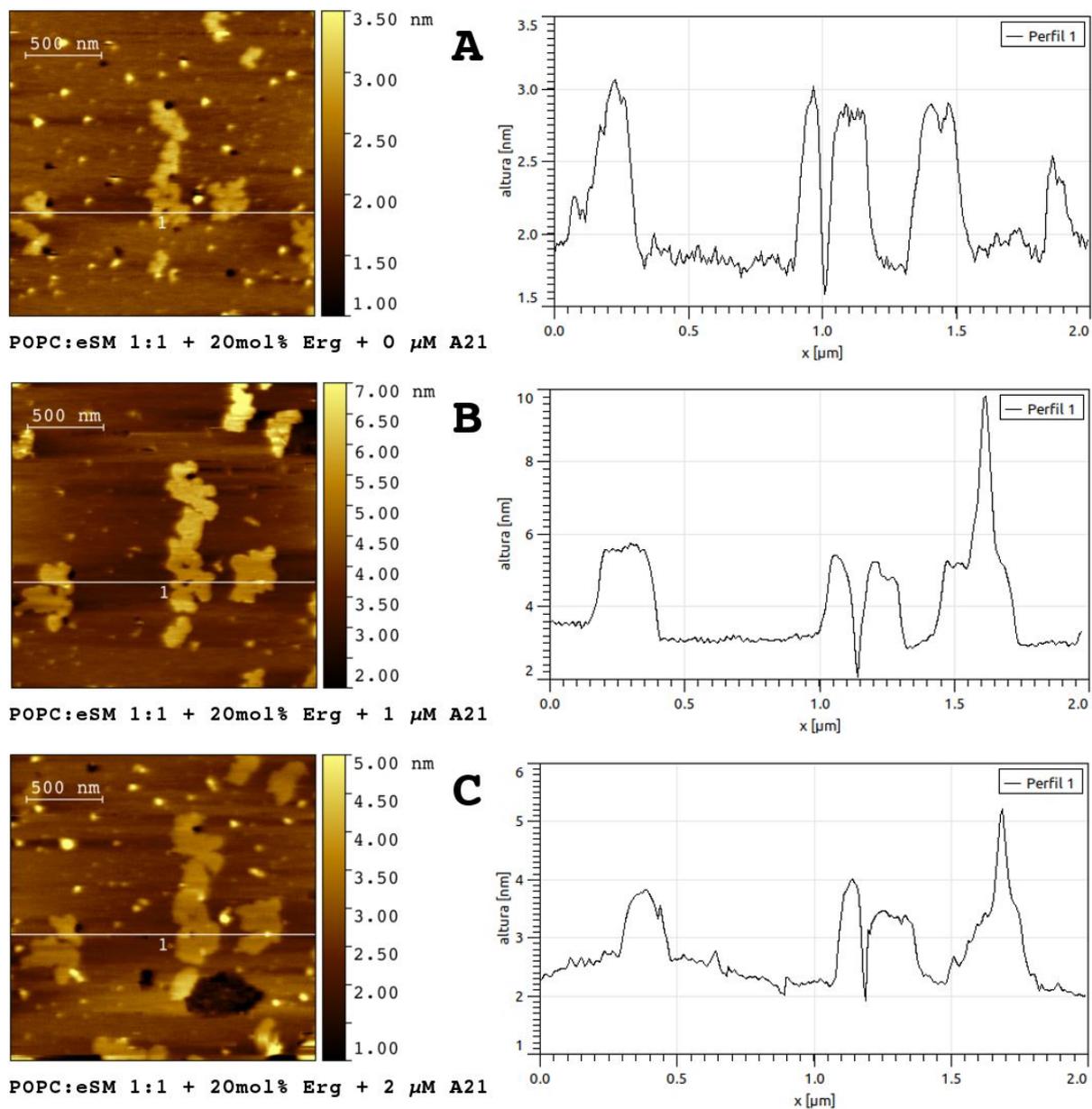


Figura 28. Imágenes topográficas de AFM y un perfil de alturas de bicapas soportadas formadas por POPC/eSM a razón equimolar + 20 mol% ergosterol sin A21 (A), con 1  $\mu\text{M}$  de A21 (B) y con 2  $\mu\text{M}$  de A21 (C). En los casos en que hay A21 presente se observan estructuras más altas que el resto de la bicapa, particularmente en los bordes, aunque hay algunos en el interior de los dominios. Al agregar A21 se observa un cambio en la morfología de los dominios, se ensanchan y a mayor concentración se reduce la altura relativa. En el caso de 2  $\mu\text{M}$  de A21 se observa un efecto de detergente sobre la zona enriquecida en POPC. Barras de escala de 500 nm. Imágenes topográficas obtenidas mediante modo contacto con una micropalanca tipo MSNL-10 con constante de resorte de 20 mN/m.

Se evaluó también la adsorción de AmB y A21 sobre bicapas compuestas por cantidades equimolares de POPC y eSM con 20 mol% de colesterol. A pesar de que en este caso no hay presencia de dominios de gran tamaño se buscó encontrar alguna diferencia que pueda explicar la mayor seguridad de A21 frente a AmB. La figura 29 muestra el efecto de agregar AmB a la bicapa ternaria con colesterol. Sin polieno presente, panel (A), se observan hoyos de mediano tamaño (cientos de nanómetros) en la bicapa que llegan a la mica, así como algunos dominios de menor tamaño. En la presencia de  $2 \mu\text{M}$  de AmB, panel (B), aparecen estructuras de gran altura que podrían ser agregados de AmB, sin embargo, esto no se puede afirmar tan fácilmente como en los casos anteriores que presentaban claramente dominios de gran tamaño. Adicionalmente, se observa la aparición de nuevos hoyos de menor tamaño sobre la superficie de la bicapa. Esto parece ser un efecto del polieno, actuando como detergente sobre la bicapa.

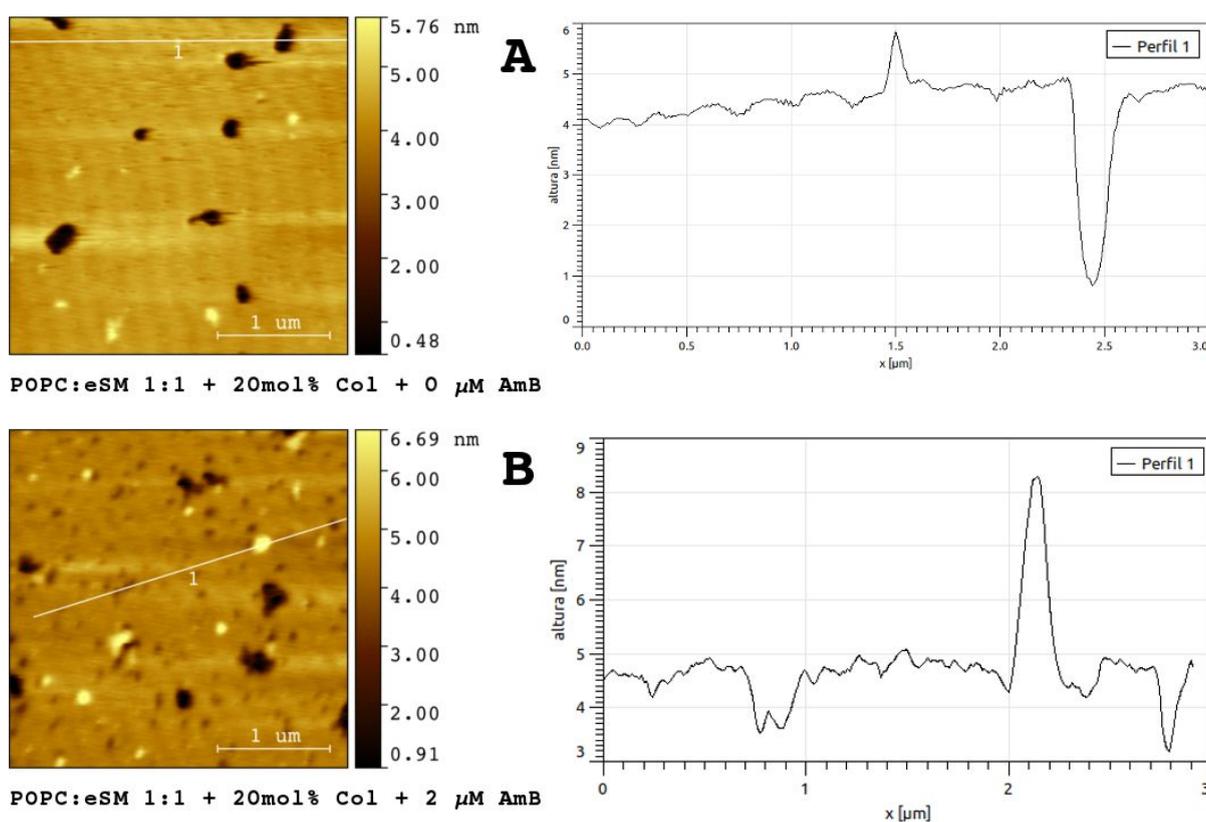


Figura 29. Imágenes topográficas de AFM y un perfil de alturas de bicapas soportadas formadas por POPC/eSM a razón equimolar + 20 mol% colesterol sin AmB (A) y con  $2 \mu\text{M}$  de AmB (B). En presencia de AmB se observan estructuras más altas que el resto de la bicapa y la bicapa presenta nuevos defectos, de menor tamaño de los presentes sin AmB. Barras de escala de  $1 \mu\text{m}$ . Imágenes topográficas obtenidas mediante modo contacto con una micropalanca tipo MSNL-10 con constante de resorte de nominal de  $30 \text{ mN/m}$ .

En la figura 30 se muestran las imágenes topográficas y perfil de alturas de bicapas de POPC/eSM + 20 mol% colesterol con y sin A21. También se observan hoyos en la bicapa debido a una cobertura sub-óptima. En este caso se requirió de una concentración de  $5 \mu\text{M}$  de A21 para observar un cambio significativo sobre la bicapa que, además, es diferente que en el caso de AmB. Aparecen estructuras sobre la bicapa de gran tamaño, tanto en cobertura como en altura. Además, los hoyos hacia la mica se redujeron sustancialmente, esto se corroboró con varios barridos. En conjunto, estos resultados sugieren la agregación

e inserción de A21 en la bicapa. Sin embargo, no parece existir un efecto de detergente como en el caso de AmB. Esto es una clara diferencia en el modo molecular de acción entre AmB y A21 que podría estar relacionado con la diferencia en su toxicidad colateral hacia tejido de mamífero. Esto se discutirá más adelante.

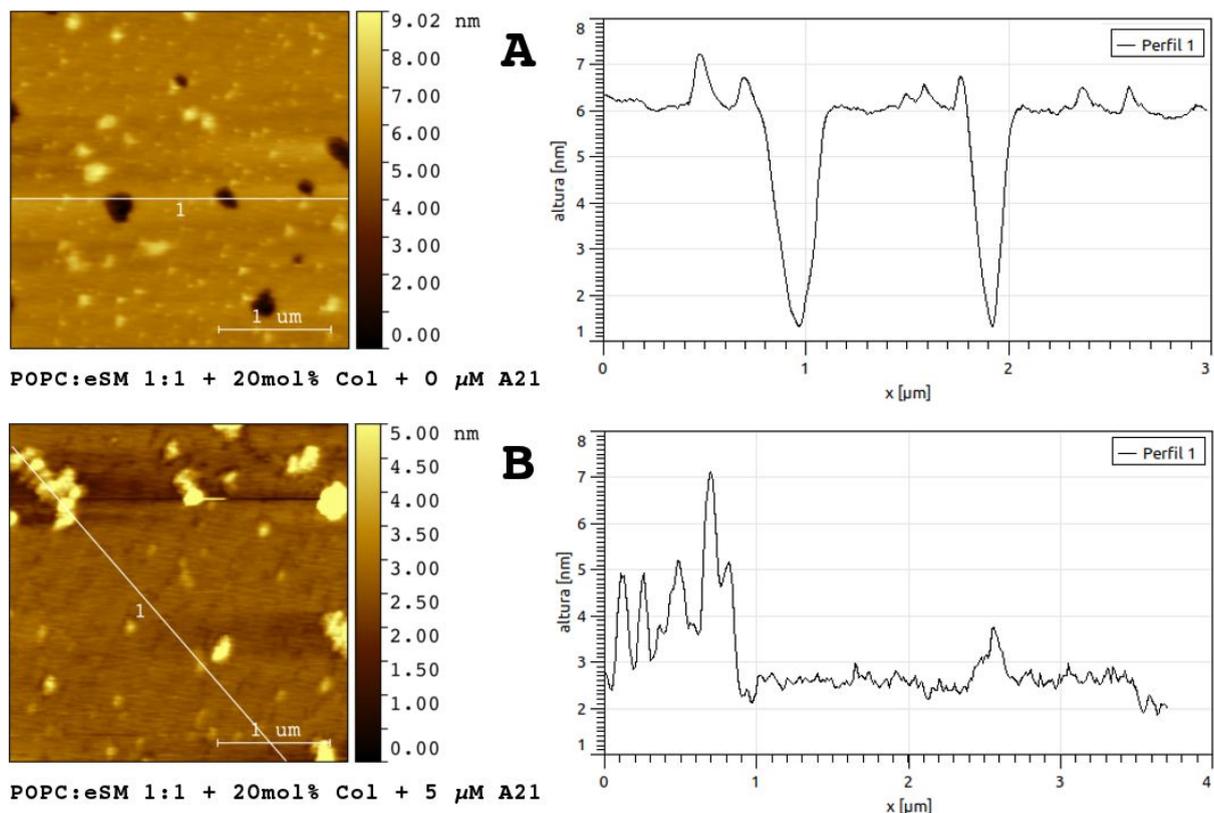


Figura 30. Imágenes topográficas de AFM y un perfil de alturas de bicapas soportadas formadas por POPC/eSM a razón equimolar + 20 mol% colesterol sin A21 (A) y con 5  $\mu$ M de A21 (B). En presencia de A21 se observan estructuras más altas que el resto de la bicapa. Barras de escala de 1  $\mu$ m. Imágenes topográficas obtenidas mediante modo contacto con una micropalanca tipo MSNL-10 con constante de resorte de nominal de 30 mN/m.

### 5.3. Libertades conformacionales de ergosterol y colesterol

#### 5.3.1. Conformaciones de mínima energía de colesterol, ergosterol y coprosterol

La figura 31 muestra los confórmeros de mínima energía correspondientes a los cálculos realizados con Gaussian 09 a nivel de B3LYP/6-31-G\*. Se presentan ergosterol, colesterol y coprosterol. Se observa una clara diferencia en la estructura de los tres confórmeros. Además, se señalan los sitios de dobles enlaces en cada estructura. Ergosterol tiene tres sitios con enlaces dobles, colesterol sólo uno y coprosterol ninguno. Estas diferencias tienen un efecto sobre los confórmeros de mínima energía, como se observa en la figura 31. Ergosterol posee una estructura plana lo que sugiere una estructura ordenada y rígida. Colesterol tiene un doblamiento de la cola de hidrocarburos hacia la cara sin presencia de metilos, que se denomina cara suave. La cara que contiene metilos se denomina cara rugosa. Es sorprendente que un doblamiento semejante sea de baja energía. El coprosterol en su confórmero de menor energía es aún más doblado que el colesterol. Tanto la cabeza polar como la cola de hidrocarburos se doblan hacia la cara suave. Esta configuración es aún más sorprendente que la de colesterol. El coprosterol se utilizó para comparar

conformeros de mínima energía de esteroides que se sabe tienen diferentes capacidades para promover la formación de dominios o balsas (Xu et al., 2001). La literatura menciona que ergosterol tiene mayor grado que colesterol y finalmente coprosterol no solo tiene bajo grado de promoción, sino que incluso llega a inhibir la formación de dominios y/o balsas. Esta diferencia en la inducción de dominios se puede explicar en cierta medida por la estructura de los conformeros obtenidos de los cálculos, esto se discute más adelante. Dado que ergosterol y colesterol promueven la formación de dominios y solo varían en el grado, en los siguientes cálculos se utilizaron sólo ergosterol y colesterol para vislumbrar la razón de esta diferencia.

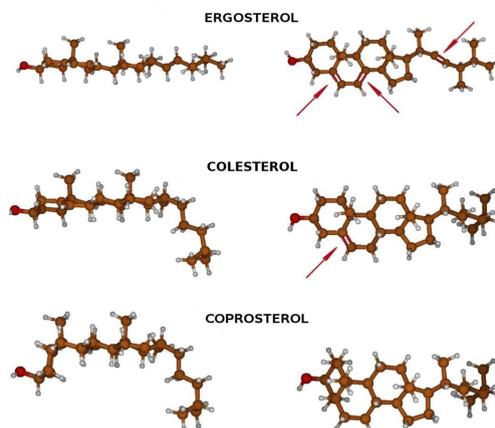


Figura 31. Geometrías de los conformeros de mínima energía calculados al nivel de B<sub>3</sub>LYP/6-31 + G\* utilizando Gaussian para ergosterol, colesterol y coprosterol. Las imágenes en 3D se obtuvieron con el programa Molden. Se indican con flechas rojas los sitios de doble enlace. Se observa una clara diferencia entre los 3 esteroides. Ergosterol es plano mientras que colesterol tiene la cola de hidrocarburos doblada y coprosterol tienen tanto la cabeza hidroxilada como la cola de hidrocarburos doblada.

Se evaluó la existencia de otros conformeros de mínima energía, o energías cercanas a la mínima para obtener una mejor imagen del espacio conformacional de los esteroides ya que la libertad rotacional no sólo depende de los valores mínimos sino también de las diferencias en energía entre diferentes conformeros. Para ello se hicieron nuevas minimizaciones utilizando diferentes estructuras iniciales. Se utilizaron ocho estructuras iniciales obtenidas de la base de datos de PubChem3D (Bolton et al., 2011a), de una optimización obtenida con Gaussian 09 a nivel de B<sub>3</sub>LYP/6-31-G\* y a partir de un molde simulado realizado con CHARMM36. Se realizaron comparaciones entre los cálculos al nivel de MP2 y de B<sub>3</sub>LYP de las estructuras de colesterol para evaluar la consistencia de este último, el cual requiere menor tiempo de cálculo. Las energías calculadas de estos conformeros se muestran en la tabla 3. Se observa que la jerarquía de energías es muy parecida entre los dos niveles de cálculo. Debido a esta similitud, los cálculos para ergosterol se realizaron a partir del nivel B<sub>3</sub>LYP. Las energías optimizadas para el ergosterol se muestran en la tabla 4. En ambas tablas se asigna una geometría para evaluar de manera cuantitativa el paisaje conformacional de los esteroides. Las geometrías se definen de acuerdo con la alineación de la cola de hidrocarburos y el anillo enlazado a la cabeza polar, anillo A, respecto a las diferentes caras. Así tenemos las siguientes geometrías: L es plano; TS indica que la cola está doblada hacia la cara suave; TR indica que la cola está doblada hacia la cara rugosa; AS indica que el anillo A y la cabeza están dobladas

hacia la cara suave; AR indica que el anillo A y la cabeza están dobladas hacia la cara rugosa. Para visualizar mejor estas geometrías ver la figura 32.

*Tabla 3. Energías relativas de los conforméromos de colesterol optimizados utilizando diferentes niveles de cálculo, MP2/6-31-G\*, B3LYP/6-31-G\* y GROMACS con diferentes campos de fuerza, CHARMM36 y Slipids. El conforméromo 1 se obtuvo a partir de un molde simulado realizado con CHARMM36. El conforméromo 2 es una optimización previa realizada al nivel B3LYP hecha con Gaussian 09. Los conforméromos del 3 al 8 se obtuvieron de la base de datos de PubChem3D (Bolton et al., 2011b). Los conforméromos están ordenados de manera ascendente con respectos a las predicciones al nivel B3LYP.*

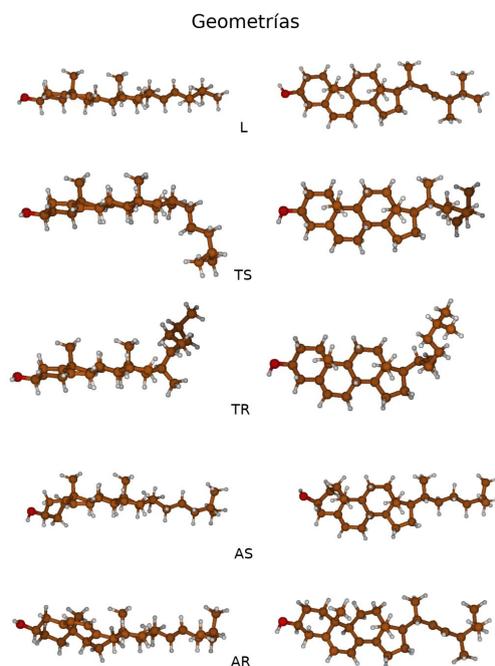
Conforméromo		MP2/6-31-G*	B3LYP/6-31-G* más Dispersión	GROMACS - CHARMM36	GROMACS - Slipids
Número	Geometría	$\Delta E$ (kcal/mol)	$\Delta E$ (kcal/mol)	$\Delta E$ (kcal/mol)	$\Delta E$ (kcal/mol)
1	TS <sup>A</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00
2	L <sup>B</sup>	0.20	0.21	1.92	1.16
3	TS	0.27	0.42	1.67	0.74
4	TR <sup>C</sup>	1.32	1.20	2.89	1.29
5	L	2.99	2.71	4.27	2.93
6	TR	2.77	2.99	3.29	3.34
7	AS <sup>D</sup>	4.75	5.16	8.90	8.15
8	TR/AS	7.38	7.57	11.27	10.21

<sup>A</sup>Cola doblada hacia cara suave; <sup>B</sup>Plano; <sup>C</sup>Cola doblada hacia cara rugosa; <sup>D</sup>Anillo A doblado hacia cara suave

*Tabla 4. Energías relativas de los conforméromos de ergosterol optimizados utilizando diferentes niveles de cálculo B3LYP/6-31-G\* y GROMACS con diferentes campos de fuerza, CHARMM36 y Slipids. Los conforméromos 1, 3, 5, 6, 7 y 8 se obtuvieron de la base de datos de PubChem3D (Bolton et al., 2011b). El conforméromo 2 es una optimización previa realizada al nivel B3LYP hecha con Gaussian 09. El conforméromo 4 se obtuvo a partir de un molde simulado realizado con CHARMM36. Los conforméromos están ordenados de manera ascendente con respectos a las predicciones al nivel B3LYP.*

Conforméromos		B3LYP/6-31-G* más Dispersión	GROMACS - CHARMM36	GROMACS - Slipids
Número	Geometría	$\Delta E$ (kcal/mol)	$\Delta E$ (kcal/mol)	$\Delta E$ (kcal/mol)
1	L <sup>A</sup>	0.00	0.00	0.00
2	L	0.01	-0.02	0.00
3	L	0.32	1.28	-1.07
4	L	0.59	-0.61	0.14
5	TS <sup>B</sup>	1.01	1.39	-0.23
6	L	1.27	1.39	-0.44
7	AR <sup>C</sup>	3.76	10.41	8.87
8	TS/AR	5.02	12.22	8.35

<sup>A</sup>Plano; <sup>B</sup>Cola doblada hacia cara suave; <sup>C</sup>Anillo A doblado hacia cara rugosa.



*Figura 32. Las diferentes geometrías definidas en este trabajo para comparar los diferentes conformeros de ergosterol y colesterol. Se muestran en orden descendente la geometría plana (L), cola doblada hacia cara suave (TS), cola doblada hacia cara rugosa (TR), anillo doblado hacia cara suave (AS) y anillo doblado hacia cara rugosa (AR). Imágenes en 3D generadas con el programa Molden.*

De las tablas se observa que para colesterol los tres conformeros de menor energía calculados con MP2 y B3LYP tiene geometrías muy distintas. Una es plana, y las otras presentan un doblamiento de la cola hacia la cara suave y rugosa respectivamente. Esto sugiere que para colesterol una barrera energética baja entre una geometría plana y una que presente un doblamiento de la cola. En el caso de ergosterol los cálculos al nivel B3LYP, las geometrías de los conformeros con menor energía, por debajo de 1 kcal/mol de diferencia, son planas. Doblar la cola o la cabeza presenta una barrera energética mayor que en el caso de colesterol. Esto sugiere un espacio de conformaciones más amplio y flexible para el colesterol y uno más acotado y plano para el ergosterol.

De las tablas 3 y 4 se observa además que en el caso de colesterol los cálculos realizados con GROMACS-CHARMM36 y GROMACS-Slipids predicen una jerarquía muy parecida al nivel B3LYP. En el caso de CHARMM36 sólo dos conformeros están fuera de lugar y para Slipids es sólo 1. En el caso de las optimizaciones con ergosterol es evidente la falta de coincidencia entre los valores obtenidos con B3LYP y aquellos obtenidos con GROMACS y los diferentes campos de fuerza.

Estos cálculos nos brindan una idea del espacio conformacional de ambos esteroides, el cual podría regir las interacciones favorables para cada uno. Dado que ergosterol se muestra más plano y rígido que colesterol se podría uno imaginar que esta diferencia cambie las posibles interacciones entre ellos y los lípidos dentro de una membrana. Se debe tomar nota que estos cálculos se realizaron en vacío, por lo cual los resultados podrían cambiar cuando los esteroides se encuentren dentro de una membrana. En un intento de despejar esta duda de manera rápida aunque aproximada se realizaron las mismas optimizaciones

en dos medios, n-hexadecano y cloroformo, utilizando el campo SCRF (Self Consistent Reaction Field) con el método PCM (Polarizable Continuum Model) (Marenich et al., 2009). N-hexadecano tiene una constante dieléctrica parecida al interior de la membrana y el cloroformo es un solvente natural de los esteroides. Las energías resultantes en hexano o cloroformo no modifican el orden de los conformeros, lo que da confianza en los cálculos en vacío. Adicionalmente las geometrías optimizadas tanto en n-hexadecano como en cloroformo varían muy poco con respecto de las geometrías en el vacío. La variación raíz cuadrática media (rmsd) más grande fue de 0.013 Å.

El número de configuraciones utilizado hasta ahora es limitado. Por lo que se realizaron simulaciones de Dinámica Molecular para obtener mucha mayor información de las posibles configuraciones de cada esteroide.

### ***5.3.2. Espacio conformacional de colesterol y ergosterol***

Los resultados de las simulaciones de DM utilizando GROMACS y dos campos de fuerza, CHARMM36 y Slipids, se analizaron utilizando el programa Chimera que permite superponer los conformeros resultantes de la dinámica considerando que los anillos centrales B, C y D, constituyen el marco de referencia. Esta superposición se divide en cúmulos. Los diferentes cúmulos se dibujaron de colores diferentes, como se puede observar en la figura 33. El mismo programa nos permitió obtener el porcentaje de conformaciones en cada cúmulo. Los tres cúmulos más poblados se presentan en la figura 33. En el caso del colesterol, para ambos campos de fuerza, se observa que la cola de hidrocarburos se puede doblar en un rango de casi 180 grados. Al observar a detalle los valores de los tres cúmulos más poblados para cada esteroide se nota una diferencia entre los campos de fuerza utilizados.

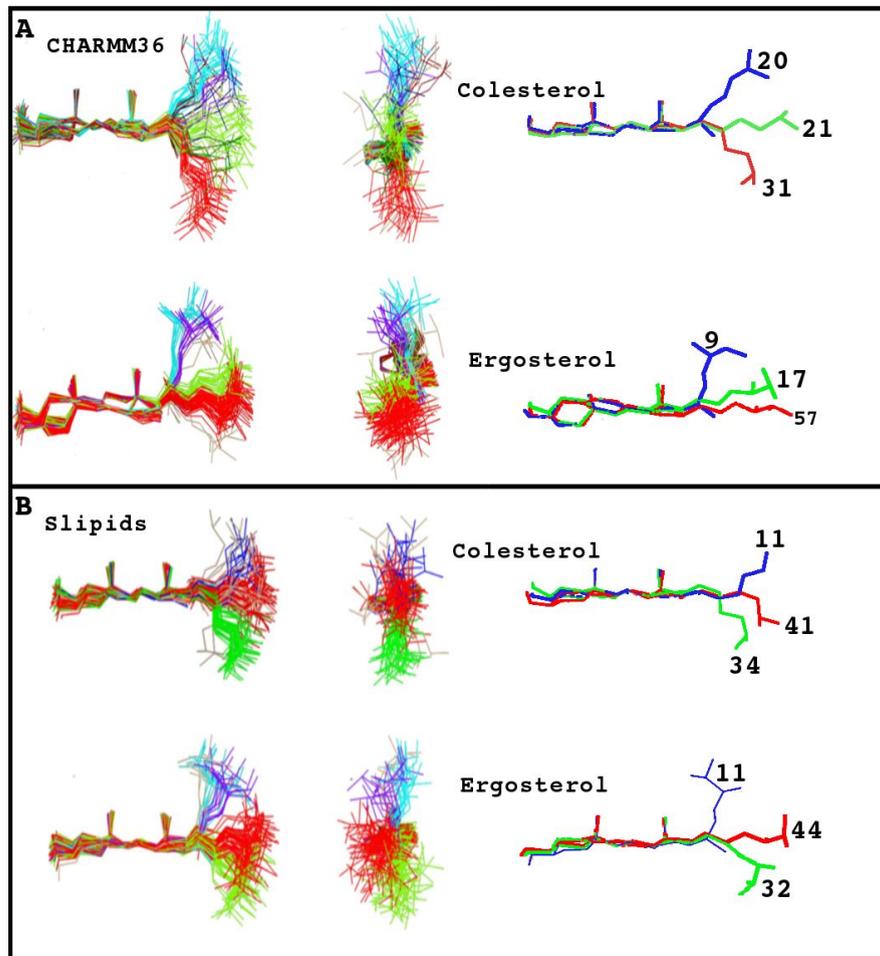


Figura 33. Cúmulos de geometrías y geometrías representativas más pobladas resultantes de cada simulación de DM utilizando CHARMM36 (A) o Slipids (B) para ergosterol y colesterol. Las geometrías representativas tienen el porcentaje de población correspondiente a cada una. Las simulaciones se realizaron utilizando el paquete GROMACS y el análisis mediante cúmulos con el programa Chimera. Para el caso de colesterol ambos campos de fuerza generan un paisaje conformacional muy similar. Para ergosterol ambos campos de fuerza muestran una región “vacía” o “prohibida” en cuanto al movimiento de la cola, pero CHARMM36 muestra un doblamiento del anillo de la cabeza en todas sus geometrías lo cual puede ser un error en la definición de parámetros del ergosterol para CHARMM36. CHARMM36 muestra una clara preferencia de ergosterol por la geometría plana, mientras que Slipids se divide entre una plana y una doblada hacia la cara rugosa (L y TS). CHARMM36 presenta una distribución de colesterol equiprobable entre las 3 geometrías más pobladas (L, TS y TR) y Slipids presenta la mayoría de las geometrías distribuidas en dos grupos (L y TS).

Para el caso de colesterol CHARMM36 como Slipids presentan un espacio conformacional parecido. Las poblaciones más pobladas son también muy parecidas, con la única diferencia de que Slipids posee menos geometrías con un doblamiento pronunciado hacia el lado rugoso.

## Capítulo 6: Discusión

### 6.1. Efecto de ergosterol y colesterol en la morfología de dominios en bicapas equimolares de POPC/eSM.

A partir de la figura 18, figura 19 y figura 20 se puede observar un claro efecto de agregar esterol a la mezcla binaria de POPC/eSM (1/1 mol/mol). De las imágenes de topografía por AFM se observa una disminución en el área de cobertura de los dominios, regiones enriquecidas en eSM, al incrementar el contenido de esterol. La disminución de la cobertura se ve más marcada con el incremento en la concentración molar de colesterol en comparación con ergosterol. Esta diferencia se observa claramente a 20 mol% de concentración de esterol. Mientras que para ergosterol se distinguen claramente los dominios para colesterol los dominios son de áreas menores, muy dispersos y poco frecuentes. Esto se corrobora tanto en la figura 19 como en la figura 20. En el primer caso se observa que el pico del histograma correspondiente a los dominios es casi inexistente en el caso de colesterol a 20 mol% mientras que a esta misma concentración el pico correspondiente en ergosterol sigue presente y bien definido. En la figura 20 observamos como a 20 mol% el porcentaje de cobertura de los dominios en las bicapas con colesterol es de alrededor del 5% mientras que para ergosterol el porcentaje de cobertura es de alrededor 20%, es decir 4 veces mayor cobertura a la misma concentración molar. Para ambos esteroides, los dominios dejan de observarse por completo, a esta resolución de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , en membranas con 40 mol% de contenido molar de esterol.

El hecho de requerir de una mayor concentración de ergosterol respecto a colesterol para lograr una bicapa más homogénea sugiere una interacción diferente entre éste y los lípidos involucrados, POPC y eSM, y a su vez una interacción distinta con respecto a la de colesterol con estos mismos lípidos. En la literatura el colesterol es mucho más estudiado que el ergosterol por lo que la información sobre el efecto de ergosterol sobre bicapas y membranas es más limitado y en ocasiones contradictorio. Sin embargo, existe consenso en que ergosterol y colesterol tienen un efecto similar en el orden de las cadenas de hidrocarburos de los lípidos y en su condensación (empacamiento) y sólo varían ligeramente en grado (ver el trabajo recopilatorio de Mannock y colaboradores (Mannock et al., 2010a)). Se tienen reportes en la literatura de que ergosterol ordena en mayor medida el lípido saturado dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) en fase líquida (líquida desordenada o líquida ordenada+desordenada) en comparación con colesterol, sin embargo el colesterol forma regiones de líquido ordenado en bicapas de DPPC en fase gel o líquido desordenado en mayor medida (Hsueh et al., 2005). Estos resultados implican un mejor ordenamiento del DPPC por parte del ergosterol, al menos en fase líquida, con un leve efecto de condensación. Otro trabajo en que utilizan DMPC, un lípido saturado, muestra que en vesículas unilamelares con 0, 20 y 47 mol% de ergosterol, colesterol o lanosterol el incremento en el grosor de la membrana es similar para los tres esteroides, sin embargo el coeficiente de expansión térmica es distinto (Pencer et al., 2005). El coeficiente es mayor en lanosterol, seguido por colesterol y menor en ergosterol. El coeficiente de expansión térmica está relacionado con la condensación de una membrana lipídica, por lo que los resultados de Pencer y colaboradores sugiere un efecto de condensación muy diferente en cada uno de los tres casos. La evidencia de esta tesis, en conjunto con la evidencia en la literatura, sugiere que ergosterol tiene una interacción con eSM que favorece un

incremento en el orden de dicho lípido llevando la región de gel a un estado aún más ordenado, mientras que en la región enriquecida en POPC la interacción, aunque existe, es menor. Por otro lado, el colesterol tiene una interacción distinta, la desaparición de los dominios a concentraciones de colesterol entre 20 y 40 mol% sugiere una interacción entre colesterol y eSM que da lugar a la formación de regiones de líquido ordenado y no de gel ordenado. El efecto diferenciado sobre la región enriquecida en eSM, ordenamiento por parte del ergosterol y licuefacción por parte del colesterol, se nota claramente a 20 mol% tanto en las imágenes topográficas como en los histogramas de alturas. El efecto de ordenamiento de la región enriquecida en eSM por parte del ergosterol es notable, incluso a concentraciones bajas de esterol se observa un incremento del 100% en la altura relativa entre los dominios y el resto de la bicapa. Este efecto tan dramático sugiere una interacción favorable entre eSM y ergosterol. Además, este efecto sobre la diferencia de altura entre las fases no se observa en colesterol.

Desde los estudios de Chapman hace más de 50 años (Ladbrooke et al., 1968; Oldfield y Chapman, 1972), se comprobó que colesterol modifica la temperatura de transición de gel-líquido de fosfolípidos y desde entonces se concibió la idea de que colesterol regula la fluidez de las cadenas de hidrocarburos de los lípidos de la membrana celular a modo de tener acceso a dominios rígidos y fluidos (o tipo líquido). Además, en estos trabajos se demostró que el colesterol suprime la transición gel-líquido de lecitina a una concentración de 50 mol%, algo que ha sido corroborado para este y otros lípidos. Este efecto podría explicar la desaparición de los dominios de fase gel en las bicapas estudiadas debido a un cambio en el comportamiento termotrópico de las fases de los lípidos al agregar 20 y 40 mol% de colesterol dado que estequiométricamente sería parecido al caso de lecitina con 50 mol% colesterol.

En resumen, el efecto de ergosterol y colesterol sobre bicapas de POPC/eSM con formación de dominios es claramente diferente, incluso a bajas concentraciones en donde el ergosterol aumenta la altura relativa entre los dominios y el resto de la bicapa y mantiene la formación de dominios hasta concentraciones intermedias de esterol. Mientras tanto el colesterol mantiene constante la diferencia de altura entre fases a bajas concentraciones y la reduce a concentraciones intermedias. Además, a concentraciones intermedias y altas inhibe la segregación de fases, i.e. la formación de dominios. Todo lo anterior indica una interacción claramente diferente entre los esteroides, ergosterol y colesterol, con POPC y eSM que se debe investigar con mayor detalle.

## **6.2. Los esteroides incrementan el grosor de la membrana de manera no-monotónica.**

Como ya se mencionó anteriormente, el ergosterol aumenta la altura relativa entre los dominios y el resto de bicapa lo que sugiere un incremento del grosor de esa región de la membrana. Los perfiles de altura que se muestran en figura 21 indican el aumento en la altura entre la primera región de la bicapa, la región enriquecida en POPC, y el sustrato, es decir, la mica. Definimos esta diferencia de altura como grosor de la bicapa. Se observa que ambos esteroides tienen un efecto similar sobre el grosor de la bicapa. Al agregar concentraciones bajas e intermedias de esterol el grosor incrementa, sin embargo, a concentraciones altas el grosor se ve reducido. El incremento en el grosor de la membrana

está relacionado con el efecto de condensación, es decir reducir el área promedio por lípido (Lecuyer y Dervichian, 1969; Demel y De Kruyff, 1976). Los resultados sugieren que ambos esteroides presentan este efecto de condensación, lo que va en contradicción con observaciones previas de que ergosterol no presenta efecto de condensación en membranas de POPC y DOPC (Hung et al., 2016). Esto podría ser conciliado si pensamos que el efecto del incremento en el grosor de la fase enriquecida en POPC se ve afectada por la presencia de eSM con un mayor grado de orden. En cualquier caso, se observa que el incremento en el grosor de la membrana en cualquiera de las fases es no-monotónico para ambos esteroides ya que inicialmente incrementa y a concentraciones altas de esteroles regresa un valor intermedio.

Un fenómeno sorprendente es el incremento por un factor de 2 en el grosor de la región alta, presumiblemente enriquecida en eSM, de  $\sim 4$  nm a  $\sim 8$  nm. Este valor del grosor en cualquier bicapa es extremo y requiere de una explicación. La primera y la más sencilla es la existencia de dos bicapas sobre la mica. Aunque esta explicación se descarta rápidamente al observar que en las imágenes topográficas existen hoyos en la bicapa que llegan a mica (corroborado por curvas de FvD sin ruptura). Otra posible explicación es la elongación total de la esfingomielina en presencia de ergosterol. Según el modelo propuesto por Matamala (Matamala, 2016) la longitud de un octano y decano elongados es de 12.93 y 15.44 Å respectivamente. Extrapolando al número de enlaces ( $\sim 24$ ) a lo largo de N-palmitoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina o 16:0 SM, que es la esfingomielina más abundante en la esfingomielina de huevo con un 86%, se obtiene una estimación de  $\sim 33.3$  Å. Para una bicapa de pura esfingomielina 16:0 elongada, el grosor sería entonces 66.6 Å i.e. 6.6 nm. Entre la bicapa y el sustrato existe una capa de agua que suma al grosor que se mide entre la mica y la superficie de la bicapa. Se especula que la capa de agua atrapada entre bicapa y mica se encuentra ordenada y se ha calculado que una capa ordenada de agua tiene una extensión aproximada de  $\sim 5.5$  Å (Carrillo-Tripp et al., 2004). Con lo anterior se llega a una extensión máxima de 7.2 nm. Esto sigue siendo menor que el valor encontrado en este trabajo de 8 nm. Existe en la literatura un estudio de AFM de bicapas soportadas compuestas de diferentes tipos de esfingomielinas y el grosor de las bicapas al variar la temperatura (Jiménez-Rojo et al., 2014). En este trabajo se observa que el valor promedio de la altura de bicapas de esfingomielina 18:0 (18:0 SM) a  $23^\circ\text{C}$  es de 7.2 nm, justo en el valor de nuestra aproximación para 16:0 SM, sin embargo, hay valores extremos que superan los 8 nm. La temperatura de transición de la 16:0 SM es de  $\sim 40^\circ\text{C}$  y para la 18:0 SM es de  $\sim 44:0^\circ\text{C}$  (Kodama et al., 2012; Jiménez-Rojo et al., 2014) por lo que a  $21-23^\circ\text{C}$  se podría esperar un parámetro de orden ligeramente mayor en la 18:0 SM, atribuible a una mayor extensión de la cadena N-acil de este lípido. Por ello el valor de 8 nm de la fase alta de la mezcla POPC/eSM + 20 mol% ergosterol se podría explicar como un valor extremo del grosor de una bicapa compuesta de SM (16:0 18:0 y/o 22:0 que se encuentran en la eSM) con una elongación máxima provocada por la presencia de ergosterol. Adicionalmente, estudios recientes de DM de las mezclas POPC/eSM/esteroles muestran un fenómeno de desfaseamiento vertical por parte de la 16:0 SM al agregar esteroles que podría aportar a la explicación de este valor de 8 nm en el grosor de la fase alta de la bicapa en cuestión, ver Anexo 1. Aunque estos estudios siguen en curso se puede estimar una separación de alrededor de  $\sim 5$  Å entre monocapas enriquecidas en 16:0 SM en una bicapa de POPC/16:0 SM + 20 mol% ergosterol, por lo que el grosor estimado de estos dominios sería de 7.7 nm.

Este valor coincide bien con la distribución de alturas observada en la figura 19. Claro que esto se sustenta en una interacción muy fuerte entre ergosterol y esfingomiolina (16:0, 18:0 y/o 22:0) que debe ser estudiada a detalle.

### **6.3. Respuesta mecánica de las bicapas: Ergosterol afecta principalmente a eSM; Colesterol modifica la respuesta de toda la membrana, POPC y eSM.**

El incremento en la fuerza de ruptura al agregar colesterol (5 mol%) sugiere un incremento en el empaquetamiento tanto de la zona enriquecida en POPC como en la enriquecida en eSM. Un efecto similar se observa al agregar ergosterol (5 mol%) aunque solamente en la zona enriquecida en eSM. En la zona enriquecida en POPC se observa un ligero incremento en la fuerza de ruptura al agregar ergosterol (5 mol%) pero es mínimo, lo que sugiere que el efecto de condensación es mucho menor que en el caso de colesterol. Esta diferencia en el efecto de condensación entre ergosterol y colesterol ha sido abordada en otro estudio (Hung et al., 2016). Agregar concentraciones intermedias de esterol (20 mol%) muestra un efecto claramente distinto para ambos esteroides. A diferencia de lo que se observa de las imágenes topográficas para el caso de 20 mol% colesterol, la bicapa es una superficie homogénea mecánicamente, ya que presenta un único pico en su histograma de fuerzas de ruptura cuyo centro es alrededor de 3 nN. Sin embargo, las imágenes topográficas muestran algunas regiones de dominio, aunque de área reducida. Esto sugiere una respuesta elástica de estos dominios muy parecida al resto de la membrana a pesar de contar con un grosor diferente. Esto refuerza la idea de que colesterol licua la región enriquecida de eSM mientras que ordena y empaca la región enriquecida en POPC de manera que la bicapa se vuelve homogénea. En el caso de 20 mol% de ergosterol, similar a las imágenes topográficas, se observan dos regiones con respuesta mecánica distinta. Los centros de estas distribuciones corresponden a ~5 y ~10 nN. Finalmente, a 40 mol% de esterol ambas bicapas muestran un solo pico en su distribución de la fuerza de ruptura. Esto sugiere una bicapa homogénea en ambos casos, aunque para ergosterol se observan eventos alejados de la distribución principal, ~20 nN. Para ambos esteroides se observa un efecto no-monotónico en la respuesta mecánica de la bicapa. Si bien ergosterol afectó únicamente la región de eSM, ésta se volvió más dura al agregar 5 mol% con respecto a 0 mol% y al agregar más esterol (20 mol%) se volvió algo más suave, aunque aún más dura que sin esterol (~9 nN -> ~15 nN -> ~10 nN). En el caso de colesterol, ambas regiones se vieron modificadas al agregar 5 mol% a la bicapa, siendo más dura con esterol, sin embargo, al agregar 20 y 40 mol% de colesterol la bicapa se vuelve homogénea en su respuesta mecánica al presentar un solo pico en el histograma de fuerzas de ruptura cuyo centro es alrededor de 4 nN. Este valor es parecido a la región de POPC de cero esterol, pero es un valor menor que cualquiera de los presentes a 5 mol% de colesterol, ~9 y ~11 nN para ambas regiones.

### **6.4 Ergosterol mantiene la segregación de fases a concentraciones altas: nanodominios.**

De la figura 21 se observa que a 40 mol% ergosterol, la bicapa equimolar de POPC/eSM muestra alguna irregularidad. Además del histograma de fuerzas de ruptura en esa misma mezcla se observan algunos eventos lejos del pico principal. Esto sugiere la existencia de nanodominios que no se lograron medir a la resolución escaneada. De la figura 24 se observa que con el equipo con el que se cuenta podemos observar una estructura con una

altura sobre el nivel del resto de la membrana de  $\sim 400$  pm. Esta estructura podría ser un dominio de dimensiones nanométricas o nanodominio. Esta suposición tendrá que ser corroborada haciendo escaneos de áreas menores y con el modo FM-AFM para poder resolver con detalle estas estructuras en la siguiente visita al laboratorio del Dr. Kobayashi. Sin embargo, la posible existencia de estos dominios favorece la idea de la selectividad por la presencia de interfases y zonas de lípido muy ordenado en fases gel. En membranas biológicas la cantidad de esterol varía entre el 20 y el 40 mol% y es aquí en donde las bicapas estudiadas muestran diferencias en cuanto a la presencia de dominios. La presencia de ergosterol sigue presentando dominios en este rango mientras que para bicapas con colesterol estos mismos dominios son casi imperceptibles desde una concentración de 20 mol%. La hipótesis estructural de la selectividad que se ha manejado a lo largo de este trabajo sugiere que moléculas como los polienos cuya acción sea favorecida por la coexistencia de fases, en particular gel-líquido, tendrían en estas bicapas de mezclas ternarias una fuerte preferencia por aquellas con contenido de ergosterol.

### **6.5. AmB y A21 se agregan alrededor y dentro de los dominios.**

Aunque los resultados obtenidos en este sentido son preliminares se pueden plantear algunas conclusiones sobre la adsorción y agregación de AmB y A21 sobre las bicapas estudiadas. Al igual que otras toxinas, como la  $\alpha$ -hemolisina y Cyt2Aa2 (Maté et al., 2014; Tharad et al., 2019), AmB y A21 tienden a agregarse en los bordes o interfases de los dominios presentes en bicapas que presentan segregación de fase a las concentraciones utilizadas para la bicapa con ergosterol, mientras que para la bicapa sin esterol esto se observó solo para el caso de A21. A diferencia de AmB, A21 se agrega tanto en los bordes como en el centro de los dominios de fase gel (eSM). Para la bicapa sin esterol AmB muestra un efecto de adelgazamiento de la bicapa, no llega a ser un efecto de detergente, pero se modifica claramente la estructura de la bicapa. A21 muestra un efecto de detergente sobre la bicapa, particularmente sobre la región líquida. Esto sugiere un mecanismo de acción diferente entre AmB y A21 para este caso. En el caso de agregar 20 mol% ergosterol a la bicapa se observa claramente que los dominios de fase gel se modifican en presencia de A21. El dominio se ensancha y su diferencia de altura con respecto del resto de la bicapa se reduce. Este efecto es parecido al observado por Dos Santos y colaboradores, donde Nys produce dominios de fase gel en bicapas de POPC/eSM o POPC/DPPC (Dos Santos et al., 2017). Sin embargo, ellos no observan agregación del polieno para las concentraciones utilizadas, algo que sí se observa en los resultados presentados en este trabajo. Los resultados sugieren que la presencia de dominios de fase gel favorecen la adsorción, y posiblemente la inserción, de AmB y A21, ya sea por la presencia de bordes o por la fase gel de mayor orden presente en la membrana. Las implicaciones de este resultado sumado a los resultados de Dos Santos y colaboradores son importantes para el mejoramiento del uso y acción antimicótica de polienos. Dos Santos y colaboradores sugieren que la presencia de dominios de fase gel promueve la selectividad de polienos entre una membrana y otra. En este trabajo se observó que ergosterol mantiene la presencia de dominios en una bicapa de cantidades equimolares de POPC y eSM hasta concentraciones de 40 mol% de esterol, mientras que agregar colesterol reduce el tamaño y la cobertura de dominios de manera significativa desde 20 mol% de contenido.

Adicionalmente, se observa una diferencia entre la acción de AmB y A21 sobre la bicapa que presenta colesterol. A21 no presenta un efecto de detergente a las concentraciones utilizadas. Además, A21 presenta un claro efecto de agregación sobre la bicapa. Este efecto no se observó en las otras dos mezclas de lípidos bajo la acción de A21 (POPC:eSM 1:1 + 0 y 20 mol% ergosterol) en donde los presuntos agregados eran de menor tamaño dentro de los dominios. Por otro lado, AmB tiene un efecto de formación de hoyos de gran tamaño que sugieren un efecto de detergente sobre la bicapa con colesterol. Esta diferencia podría tener consecuencias en la selectividad de estos fármacos hacia membranas celulares de hongo contra las de mamífero. Los estudios de canal unitario realizados para caracterizar A21 mostraron que la concentración umbral para observar actividad de canales en membranas de POPC:ergosterol 7:3 era muy parecida a la actividad de AmB, 10 vs 5  $\mu\text{M}$  respectivamente (Antillón et al., 2016). Mientras que para membrana de POPC:colesterol 7:3 existe una gran diferencia en esta concentración umbral entre A21 y AmB, 200 vs 15  $\mu\text{M}$  respectivamente. Con eso en mente se puede relacionar esta selectividad con los resultados obtenidos aquí. Para las bicapas con ergosterol la aparición de agregados se observa a una concentración similar para ambos fármacos,  $\sim 1 \mu\text{M}$ . Mientras que para bicapas con colesterol no sólo presentan un efecto a concentraciones diferentes (2  $\mu\text{M}$  para AmB y 5  $\mu\text{M}$  para A21) sino que además el efecto es distinto. Recordando que la concentración umbral para actividad ionofórica de A21 en bicapas de POPC:colesterol 7:3 es de 200  $\mu\text{M}$  podemos proponer que en el caso de las bicapas soportadas A21 no se ha insertado en la membrana y solo se está acumulando en la superficie.

De los resultados y la discusión se puede concluir lo siguiente: i) A21 presenta efecto detergente sobre regiones en fase líquido además los dominios de fase gel facilitan la inserción de A21 en la bicapa; ii) AmB presenta efecto detergente sobre fases líquidas de la membrana con y sin la presencia de fase gel. Las membrana celulares de mamífero no presentan grandes dominios de fase gel, pero las observaciones de Aresta-Branco y colaboradores (Aresta-Branco et al., 2011a) sobre la existencia de dominios de fase gel en *Saccharomyces cerevisiae* agregan sustento a la hipótesis estructural de la selectividad de polienos. Aún hace falta más información que explique las diferencias entre A21 y AmB.

## 6.6. Espacio conformacional de ergosterol y colesterol

De los cálculos cuánticos y de las simulaciones de dinámica molecular salta a la vista de inmediato que ergosterol es mayormente plano. En particular en el caso del campo de fuerza CHARMM36 la geometría plana representa más del 60%. Mientras tanto colesterol tiene una población menor de confórmeros con geometría plana. Es con el campo de fuerza Slipids en dónde tiene mayor presencia la especie plana con 41%. Otro detalle interesante es una región “vacía” o “prohibida” en la superposición de confórmeros de ergosterol. Esto podría deberse al doble enlace presente en la región de la cola de ergosterol que limita la flexibilidad de esta.

Dada la mayor preferencia de ergosterol por una geometría plana se propone que ergosterol tendrá una interacción más favorable con lípidos cuya geometría sea también plana. Esto implica lípidos con mayor parámetro de orden, i.e. que dentro de la membrana su ángulo de inclinación respecto a la normal de la bicapa sea cercano a cero. Lípidos como SM y DPPC cuyo grado de saturación implica que a temperatura ambiente se encuentren

en fase gel tendrán mayor orden. Por otro lado, lípidos con menor orden, e.g. POPC que se encuentra en fase líquida a temperatura ambiente no lograrán una interacción favorable con una molécula tan rígida como el ergosterol. El colesterol sí tendría una interacción con lípidos como POPC dado que posee mayor flexibilidad. En este caso colesterol posee tanto conformeros con geometrías planas como dobladas hacia alguna de las caras. Esto favorece la interacción de colesterol con ambos tipos de lípido, ordenado y saturado o desordenado e insaturado.

En la literatura hay mucha evidencia de que los esteroides, a grosso modo, licuan membranas de gel y ordenan membranas líquidas. En términos generales promueven la formación de una fase de líquido ordenado (Beattie et al., 2005), la cual es un intermedio entre líquido desordenado y gel. Debido a esto creemos que colesterol logra transformar la bicapa equimolar de POPC/eSM que presenta segregación de fases a una bicapa homogénea a concentraciones más bajas de lo que lo hace ergosterol ya que colesterol tiene interacciones favorables con ambos lípidos, licua uno y ordena otro. Mientras que ergosterol tiene interacciones más favorables con lípidos ordenados como eSM y los lleva a una fase de líquido ordenado. En la región de líquido desordenado ergosterol podría intervenir de manera directa o indirecta, e. g. a través de las moléculas de eSM que se encuentran en fase líquida.

Los resultados de los espacios conformacionales de ergosterol y colesterol presentados aquí contradicen la hipótesis y estudios anteriores de Mannock y colaboradores (Mannock et al., 2010a, 2010b). Mediante espectroscopía de fluorescencia por reflexión total interna ellos encuentran que ergosterol y colesterol ordenan de manera similar bicapas de DPPC en fase cristal-líquido, pero ergosterol promueve un mayor número de enlaces de hidrógeno con los grupos carbonilos de la columna de glicerol de los fosfolípidos. Esto los lleva a proponer que diferencias en la dinámica y la conformación de estos esteroides podrían explicar las diferencias observadas. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo ellos proponen que colesterol posee un conformero de mínima energía completamente extendida o alargada (equivalente a la conformación L de este trabajo). Por otro lado, ergosterol posee dos conformeros dominantes, uno con ergosterol extendido y el otro con la cola de hidrocarburos doblada hacia la cara suave. Estos resultados en conjunto con la hipótesis del desfase hidrofóbico explicarían las diferencias entre ergosterol y colesterol dado que el largo efectivo de colesterol sería mayor que el de ergosterol y por lo tanto tendría menor desfase hidrofóbico. Esta hipótesis predice que ergosterol desordena en mayor medida lípidos en fase gel como DPPC o eSM, algo que parece contradecir lo observado en este trabajo. Sin embargo, las estructuras tridimensionales utilizadas para plantear esta hipótesis se realizaron con estructuras químicas minimizadas con el campo de fuerza de Dreiding el cual considera una fuerza y geometrías generalizadas en lugar de asignar una a cada átomo lo que puede ocasionar errores en las predicciones. El estudio presentado aquí utiliza campos de fuerza atomísticos por lo que se tiene un mayor grado de confianza, aunque no sea infalible.

## **6.7. Predicciones de los campos de fuerza**

Las jerarquías de las energías obtenidas con cálculos cuánticos y con los distintos campos de fuerza muestran claramente que la molécula de ergosterol requiere de mayor

refinamiento dadas las ligeras discrepancias en las poblaciones conformacionales obtenidas para cada esteroles. La molécula de colesterol no presenta demasiadas diferencias entre los cálculos cuánticos a diferentes niveles de cálculo y los campos de fuerza utilizados, CHARMM36 y Slipids. Debido a esto se seguirá trabajando en refinar los parámetros que describen al ergosterol en los distintos campos de fuerza de manera que los cálculos y simulaciones que se hagan tengan mayor grado de confianza. Esto es importante ya que se podrían generar hipótesis erróneas a partir de cálculos y simulaciones cuyos parámetros no son los adecuados.

## **6.8. Importancia de la estructura química de los esteroides**

Inicialmente se consideró la presencia de enlaces dobles en la estructura de los esteroides como un elemento que tiene efectos importantes sobre las conformaciones posibles (ver figura 31). Sin embargo, la isomería cis-trans juega un papel igualmente importante. Si solo importara la presencia y número de enlaces dobles en la estructura, las conformaciones de coprosterol y colestanol serían idénticas ya que ambos tienen la misma fórmula química, a saber,  $C_{27}H_{48}O$ . Sin embargo, entre los anillos A y B se presentan como isómeros cis (coprosterol) y trans (colestanol). La figura 34 muestra las estructuras planas, dos dimensional, y un confórmero en tres dimensiones visto de forma lateral y superior de cada uno de los siguientes esteroides: colesterol, ergosterol, colestanol y coprosterol. Las imágenes se obtuvieron de la página web de PubChem. Se observa claramente como los dobles enlaces modifican el confórmero de ergosterol respecto al de colesterol, pero además entre colestanol y coprosterol existe una gran diferencia en la torsión de la cabeza hidroxilada, en una configuración tipo silla, debido a la configuración cis del coprosterol. Mientras que colesterol y colestanol tienen una geometría muy parecida, con la cola de hidrocarburos doblada hacia la cara suave y la cabeza hidroxilada en el plano de los anillos, a pesar de ser diferentes químicamente. La idea de que el estudio de la dinámica y espacio conformacional de los esteroides podría explicar los fenómenos observados en bicapas y membranas no es nuevo. Mannock y colaboradores (Mannock et al., 2010a) ya lo habían propuesto e incluso comenzado a estudiar con base en la hipótesis del desfase hidrofóbico. Como ya se mencionó anteriormente, estos estudios no usaron todo el potencial de los campos de fuerza atómicos por lo que los resultados estaban limitados a sólo una conformación plana para colesterol y dos confórmeros fuera del plano para ergosterol. En este trabajo demostramos que existen más confórmeros posibles y que los confórmeros más probables son diferentes a los encontrados por Mannock y colaboradores.

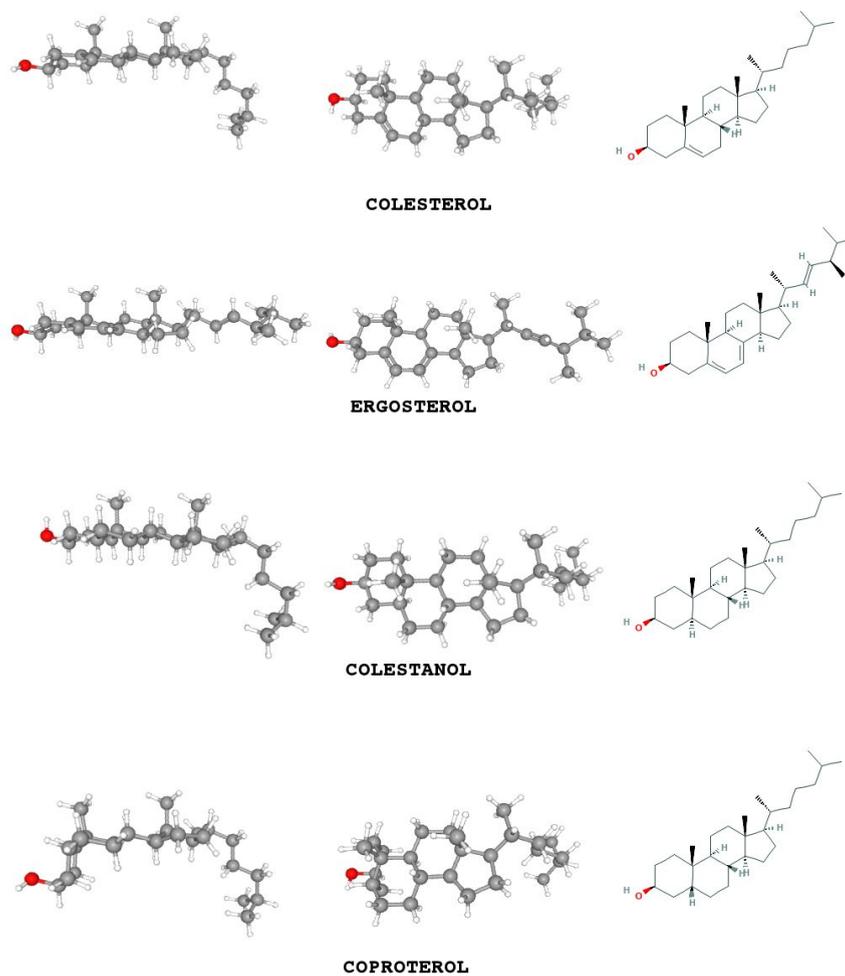


Figura 34. Representación química en dos dimensiones y conformación probable en tres dimensiones vista de forma lateral y superior de: Colesterol (CAS: 57-88-5), ergosterol (CAS: 57-87-4), colestanol (CAS: 80-97-7) y coprosterol (CAS: 360-68-9). Estructuras obtenidas de la página web de PubChem.

## Capítulo 7: Conclusiones

### 7.1. Conclusiones

De los resultados de AFM y de DM en cuanto a las diferencias en el efecto de ergosterol y colesterol sobre bicapas equimolares de POPC/eSM se concluye lo siguiente:

- La membrana compuesta de cantidades equimolares de POPC y eSM, que presenta formación de dominios, se vuelve una membrana homogénea al incrementar el contenido de colesterol o ergosterol. Este efecto es más rápido al agregar colesterol.
- La fuerza de ruptura de la bicapa se ve afectada al agregar concentraciones bajas e intermedias de esterol.
  - El colesterol aumenta la fuerza de ruptura de la membrana en ambas regiones, los dominios y el resto de la membrana.
  - El ergosterol no modifica la fuerza de ruptura de la región enriquecida en POPC. Sin embargo, presenta un efecto mucho mayor en la zona enriquecida en eSM.
  - Para cantidades elevadas de esterol la fuerza de ruptura es la misma para ambos esteroides y además es similar al valor de la región enriquecida en POPC en el caso libre de esterol.
- El efecto diferenciado de ergosterol y colesterol sobre la formación de dominios y la respuesta mecánica de los lípidos involucrados sugiere una interacción diferente entre estos esteroides y los lípidos.
  - Ergosterol muestra una interacción con regiones enriquecidas en eSM
  - Colesterol muestra una interacción similar en toda la membrana.
- La libertad conformacional de los esteroides es diferente.
  - Ergosterol tiene una conformación plan como la más probable mientras que colesterol no muestra ninguna estrictamente plana dentro de las tres conformaciones más probables.
  - La configuración plana, más rígida, de ergosterol sugiere que tendrá una interacción favorable con lípidos cuya conformación sea también plana u ordenado como eSM. La configuración curva, más flexible, de colesterol sugiere que podría tener interacciones favorables tanto con lípidos planos y ordenados como eSM, como con lípidos con alguna curvatura o desordenados como POPC.
- La distinta modulación de los dominios por parte de ergosterol y colesterol podrían estar involucrados en la interacción de la membrana con moléculas de interés farmacológico como los antimicóticos poliénicos, los cuales presentan una acción diferenciada entre membrana con colesterol y con ergosterol.
- La presencia de dominios de fase gel de gran tamaño (diámetros de micras) y el aumento en la diferencia de altura relativa (de 1 a 2 nm) que se observa para bicapas con ergosterol a 5 y 20 mol% contrasta con la desaparición de dichos dominios para el caso de colesterol. Estas diferencias en área de fase gel, región de interfase y región expuesta (escalón entre fases) podrían ser la mayor razón de la selectividad de polienos por membranas de hongo.

De los resultados de la adsorción de AmB y A21 se concluye que.

- AmB se adsorbe y agrega en los bordes de los dominios entre la fase gel y la fase líquida para bicapas POPC/eSM con ergosterol.
- A21 se adsorbe y agrega en los bordes y dentro de los dominios entre la fase gel y la fase líquida para bicapas POPC/eSM con y sin ergosterol.
- A21 ensancha los dominios de fase gel.
- A21 presenta un efecto detergente sobre la fase líquida en bicapas POPC/eSM con y sin esterol.
- AmB presenta un efecto de adelgazamiento sobre la fase líquida en bicapas POPC/eSM y de detergente en bicapas POPC/eSM con colesterol.

Los resultados la una acción de polienos dependiente de la estructura de la bicapa, en particular de la presencia de dominios, nos permite avanzar en la propuesta sobre el mecanismo molecular de acción antifúngica de polienos:

- La adsorción e inserción de polienos sobre membranas lipídicas se ve favorecida por la presencia de segregación de fases, i.e. por la presencia de dominios. Esto se debe tanto a la presencia de una fase gel como por la interfaz de ésta con la fase líquida.
- La presencia de ergosterol en la bicapa aumenta diferencia relativa de alturas entre las fases lo que favorece aún más la adsorción y la inserción de polienos en la bicapa.
- La diferencia entre la acción ionofórica de polienos sobre membranas celulares de mamífero y de hongo se pueden explicar en términos de la presencia de ergosterol y esfingolípidos en la membrana celular de hongo, lo que induce dominios de fase gel de mayor tamaño y con mayor grosor que los que se encuentran en la membrana celular de mamífero que presenta colesterol. Además, A21 requiere de la presencia de estos dominios para insertarse e inducir inestabilidad en la fase líquida de las bicapas, para las concentraciones estudiadas, contrario a AmB, lo que está en concordancia con la menor actividad citotóxica en glóbulos rojos y tejido renal por parte de A21.

Adicionalmente, del proceso de investigación realizado se llega a otra conclusión importante en el aspecto técnico:

- El uso de microscopía de fuerza atómica y de simulaciones de dinámica molecular de manera simultánea y complementaria demostró ser una batería de herramientas muy adecuada y útil para el estudio a nivel molecular de bicapas lipídicas y bio-moléculas con acción sobre ella y que permite obtener información molecular, estructural y dinámica validada.

En este trabajo de tesis quedan establecidas las bases para futuros estudios de sistemas similares. Considerando que tanto AFM como simulaciones de DM siguen presentando avances significativos y refinamiento, su uso como herramienta principal para el estudio de bicapas promete ser de gran utilidad para aclarar los temas que actualmente se encuentra en fuerte debate, como las balsas lipídicas vs dominios.

## 7.2. Perspectivas

Los resultados presentados en este trabajo invitan a continuar expandiendo la hipótesis estructural de la selectividad de polienos. En particular se sugiere probar membranas de DOPC/eSM y de DPPC/eSM para tener una comparación del comportamiento del sistema cuando se tiene un fosfolípido saturado (DPPC), insaturado (DOPC) y mixto (POPC) que fue el que se utilizó en este trabajo. Las conclusiones que surjan de esta comparación ayudarían en gran medida nuestro entendimiento del efecto directo de lípidos muy similares químicamente en la estructura y dinámica de la membrana. Finalmente se puede extender este estudio a utilizar otro tipo de esteroides, en particular observar el efecto de los dobles enlaces y la isomería cis-trans. Colesterol posee un enlace doble, ergosterol tres, así que utilizar coprosterol, que no cuenta con enlaces dobles, y 7-dehidrocolesterol, que tiene dos, así como colestanol que es el isómero trans de coprosterol serían buenos candidatos para entender la importancia de los distintos esteroides y su estructura química dentro de la membrana celular. Por último, la hipótesis de una interacción entre ergosterol y esfingomielina que logra ordenar y extender de manera extrema los dominios altos es un caso digno de estudio que merece un trabajo dedicado aparte, considerando otros esfingolípidos y otros esteroides. Todo esto servirá para mejorar nuestro entendimiento de los polienos y lograr reducir su toxicidad colateral.

## Agradecimientos

Este trabajo de tesis fue realizado en el laboratorio de biofísica del Instituto de Ciencias Físicas de la UNAM a cargo del Dr. *Iván Ortega Blake* a quien agradezco todo su apoyo y confianza. Los experimentos de microscopía de fuerza atómica mediante modulación de frecuencia se llevaron a cabo en el laboratorio Nakabayashi-Yoshikawa de la Universidad de Saitama en colaboración con el Dr. *Seiichiro Nakabayashi* y el Dr. *Naritaka Kobayashi* a quienes agradezco la oportunidad de trabajar junto a ellos.

Este trabajo recibió apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante una beca de Doctorado y mediante el proyecto PEI 252300.

Este trabajo recibió apoyo financiero de la Dirección General de Asunto del Personal Académico mediante los proyectos PAPIIT IG100416 e IG100920 para la compra y mantenimiento de material.

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de muchas personas con quienes estoy sumamente agradecido.

Dr. *Iván Ortega Blake*, mi asesor. No me hubiera propuesto hacer un trabajo de esta envergadura de no haber sido por el apoyo, la confianza y la guía que me brindó desde el primer día. Muchas gracias por creer en mí, por asesorarme todo el camino tanto académica como personalmente. Gracias por confiarme un trabajo como este en el cual se debía comenzar prácticamente desde cero. He aprendido mucho de usted y siempre le estaré agradecido por esta experiencia de vida que queda plasmada en mi persona.

Agradezco a los miembros de mi comité tutor: Dr. *Humberto Saint-Martin* y Dr. *Carlos Muñoz*. Gracias por su atención, dedicación y su paciencia. Sus consejos siempre fueron muy acertados y pertinentes. Gracias sobre todo por su apoyo en los primeros semestres de este proyecto, en los cuales no se veían avances.

Al Dr. *Jorge Hernández Cobos* por todo su apoyo en la realización de los cálculos cuánticos y las simulaciones de dinámica molecular y por su amistad.

Al Dr. *Armando Antillón Díaz* por prestar sus conocimientos para el desarrollo de una rutina computacional para el análisis de los datos y por su amistad.

A los Drs. *Kobayashi* y *Nakabayashi* por recibirme y prestarme sus instalaciones en la Universidad de Saitama. Fue una experiencia inolvidable.

Agradezco a los miembros del jurado, Dra. *Karla J. Santacruz Gómez*, Dr. *Fernando Favela Rosales*, Dr. *Diego González Halphen*, Dr. *Félix M. Goñi Urcelay*. Primero por aceptar la invitación y segundo por su tiempo y dedicación para mejorar este escrito y el trabajo en general.

*Tammy*, mi esposa, gracias por todo tu apoyo. Sin tus palabras de aliento y cariño este trabajo de alto rendimiento no hubiera logrado ver la luz del día. Tu apoyo ha significado sacrificios y esfuerzos sobrehumanos de tu parte, lo cual agradezco infinitamente. Este tiempo que llevamos juntos, que es más de la mitad de mi vida, es lo mejor que he vivido. Juntos hemos aprendido a superar adversidades, salir con la cara en alto y siempre con un aprendizaje. Ahora a emprender una nueva aventura no apta para los débiles de corazón.

*Gricel y Arturo*, mis padres. Muchas gracias por su apoyo, su cariño y su ejemplo de seguir adelante sin importar las dificultades que presente la vida.

*Tammy y Pablo*, mis suegros. Agradezco enormemente el apoyo que me han brindado a mí y a mi familia, mi esposa y mis hijos.

A mis amigos incondicionales, *Roberto M., Mayra G., Carlos G., Adriana L., Cristina S., Ricardo A., Sofía R., Inti A., David V., Alejandro F., Paulino M., Raksha S. y Tanu S.*, gracias por su apoyo. Convivir y discutir temas de todo tipo logró mantener mi sanidad mental todos estos años.

A los miembros, actuales y pasados, del grupo de biofísica. *Javier González, Rosmarbel Morales, Javier Íñiguez, Berenice Cotero, Karla Recamier, Kaleb Ramírez, Erasmo Ovalle, Itzel Morales y Miriam García*. Todos saben lo que significa dedicar parte de tu vida a la ciencia y particularmente a la biofísica, que es multi e interdisciplinaria. Sus consejos y su paciencia para escuchar las quejas fueron de gran ayuda. También en los momentos de alegría estuvieron ahí y me siento orgulloso de formar parte de esta gran familia con presencia en todo el mundo.

Arturo Galván Hernández  
Cuernavaca, Morelos, México  
2020

## Bibliografía

- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., et al. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1-2, 19–25. doi:10.1016/j.softx.2015.06.001.
- Alessandrini, A., and Facci, P. (2014). Phase transitions in supported lipid bilayers studied by AFM. *Soft Matter* 10, 7145–7164. doi:10.1039/c4sm01104j.
- Alessandrini, A., Seeger, H. M., Di Cerbo, A., Caramaschi, T., and Facci, P. (2011). What do we really measure in AFM punch-through experiments on supported lipid bilayers? *Soft Matter* 7, 7054. doi:10.1039/c1sm05453h.
- Anderson, T. M., Clay, M. C., Cioffi, A. G., Diaz, K. A., Hisao, G. S., Tuttle, M. D., et al. (2014). Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat. Chem. Biol.* 10, 400–406.
- Andree, H. A., Stuart, M. C., Hermens, W. T., Reutelingsperger, C. P., Hemker, H. C., Frederik, P. M., et al. (1992). Clustering of lipid-bound annexin V may explain its anticoagulant effect. *J. Biol. Chem.* 267, 17907–17912.
- Andreoli, T. E. (1973). On the anatomy of amphotericin B-cholesterol pores in lipid bilayer membranes. *Kidney International* 4, 337–345. doi:10.1038/ki.1973.126.
- Antillón, A., de Vries, A. H., Espinosa-Caballero, M., Falcón-González, J. M., Flores Romero, D., González-Damián, J., et al. (2016). An Amphotericin B Derivative Equally Potent to Amphotericin B and with Increased Safety. *PLoS One* 11, e0162171.
- Aresta-Branco, F., Cordeiro, A. M., Marinho, H. S., Cyrne, L., Antunes, F., and de Almeida, R. F. M. (2011a). Gel domains in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: highly ordered, ergosterol-free, and sphingolipid-enriched lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 286, 5043–5054.
- Aresta-Branco, F., Cordeiro, A. M., Susana Marinho, H., Cyrne, L., Antunes, F., and de Almeida, R. F. M. (2011b). Gel Domains in the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 5043–5054. doi:10.1074/jbc.M110.154435.
- Asakawa, H., and Fukuma, T. (2009). The molecular-scale arrangement and mechanical strength of phospholipid/cholesterol mixed bilayers investigated by frequency modulation atomic force microscopy in liquid. *Nanotechnology* 20, 264008.
- Bagatolli, L. A. (2006). To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758, 1541–1556. doi:10.1016/j.bbamem.2006.05.019.
- Baginski, M., and Czub, J. (2009). Amphotericin B and its new derivatives - mode of action. *Curr. Drug Metab.* 10, 459–469.
- Baginski, M., Resat, H., and Borowski, E. (2002). Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1567, 63–78.
- Balbuena, P., and Seminario, J. M. (1999). *Molecular Dynamics: From Classical to Quantum*

*Methods*. Elsevier.

- Beattie, M. E., Veatch, S. L., Stottrup, B. L., and Keller, S. L. (2005). Sterol Structure Determines Miscibility versus Melting Transitions in Lipid Vesicles. *Biophysical Journal* 89, 1760–1768. doi:10.1529/biophysj.104.049635.
- Becke, A. D. (1988). Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A* 38, 3098–3100. doi:10.1103/physreva.38.3098.
- Becke, A. D. (1993). Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics* 98, 5648–5652. doi:10.1063/1.464913.
- Bennett, W. F. D., Drew Bennett, W. F., Shea, J.-E., and Peter Tieleman, D. (2018). Phospholipid Chain Interactions with Cholesterol Drive Domain Formation in Lipid Membranes. *Biophysical Journal* 114, 2595–2605. doi:10.1016/j.bpj.2018.04.022.
- Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D., and van Drunen, R. (1995). GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications* 91, 43–56. doi:10.1016/0010-4655(95)00042-e.
- Bolton, E. E., Chen, J., Kim, S., Han, L., He, S., Shi, W., et al. (2011a). PubChem3D: a new resource for scientists. *J. Cheminform.* 3, 32.
- Bolton, E. E., Chen, J., Kim, S., Han, L., He, S., Shi, W., et al. (2011b). PubChem3D: a new resource for scientists. *J. Cheminform.* 3, 32.
- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R., and Denning, D. (2017). Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi* 3, 57. doi:10.3390/jof3040057.
- Borrell, J. H., Teresa Montero, M., and Domènech, Ò. (2017). Mapping phase diagrams of supported lipid bilayers by atomic force microscopy. *Microscopy Research and Technique* 80, 4–10. doi:10.1002/jemt.22655.
- Bossche, H. V., and Vanden Bossche, H. (2002). Echinocandins – an update. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 12, 151–167. doi:10.1517/13543776.12.2.151.
- Brajtburg, J., Elberg, S., Schwartz, D. R., Vertut-Croquin, A., Schlessinger, D., Kobayashi, G. S., et al. (1985). Involvement of oxidative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 27, 172–176. doi:10.1128/aac.27.2.172.
- Brian, A. A., and McConnell, H. M. (1984). Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 6159–6163. doi:10.1073/pnas.81.19.6159.
- Britz, E., and Govender, N. P. (2016). Global emergence of a multi-drug resistant fungal pathogen, *Candida auris*. *Southern African Journal of Infectious Diseases* 31, 69–70. doi:10.1080/23120053.2016.1221613.
- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983). CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry* 4, 187–217. doi:10.1002/jcc.540040211.
- Brutyan, R. A., and McPhie, P. (1996). On the one-sided action of amphotericin B on lipid

- bilayer membranes. *J. Gen. Physiol.* 107, 69–78.
- Butt, H. J., Downing, K. H., and Hansma, P. K. (1990). Imaging the membrane protein bacteriorhodopsin with the atomic force microscope. *Biophys. J.* 58, 1473–1480.
- Campoy, S., and Adrio, J. L. (2017). Antifungals. *Biochemical Pharmacology* 133, 86–96. doi:10.1016/j.bcp.2016.11.019.
- Carmona, E. M., and Limper, A. H. (2017). Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. *Clin. Chest Med.* 38, 393–402.
- Carrillo-Tripp, M., Saint-Martin, H., and Ortega-Blake, I. (2004). Minimalist molecular model for nanopore selectivity. *Phys. Rev. Lett.* 93, 168104.
- Case, D. A., Cheatham, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., et al. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry* 26, 1668–1688. doi:10.1002/jcc.20290.
- Cass, A., Finkelstein, A., and Krespi, V. (1970). The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* 56, 100–124.
- Castellana, E. T., and Cremer, P. S. (2006). Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science Reports* 61, 429–444. doi:10.1016/j.surfrep.2006.06.001.
- Castelli, M. V., Derita, M. G., and López, S. N. (2017). Novel antifungal agents: a patent review (2013 – present). *Expert Opin. Ther. Pat.* 27, 415–426.
- Chudzik, B., Koselski, M., Czuryło, A., Trębacz, K., and Gagoś, M. (2015). A new look at the antibiotic amphotericin B effect on *Candida albicans* plasma membrane permeability and cell viability functions. *European Biophysics Journal* 44, 77–90. doi:10.1007/s00249-014-1003-8.
- Cohen, B. E. (1998). Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *International Journal of Pharmaceutics* 162, 95–106. doi:10.1016/S0378-5173(97)00417-1.
- Cotero, B. V., Rebolledo-Antúnez, S., and Ortega-Blake, I. (1998). On the role of sterol in the formation of the amphotericin B channel. *Biochim. Biophys. Acta* 1375, 43–51.
- Cross, S. E., Jin, Y.-S., Rao, J., and Gimzewski, J. K. (2007). Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat. Nanotechnol.* 2, 780–783.
- de Almeida, R. F. M., Fedorov, A., and Prieto, M. (2003). Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys. J.* 85, 2406–2416.
- de Kruijff, B., and Demel, R. A. (1974). Polyene antibiotic–sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. 3. Molecular structure of the polyene antibiotic–cholesterol complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 339, 57–70.
- de Lange, M. J. L., Bonn, M., and Müller, M. (2007). Direct measurement of phase coexistence in DPPC/cholesterol vesicles using Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* 146, 76–84.

- Demel, R. A., and De Kruffyff, B. (1976). The function of sterols in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 457, 109–132.
- Deng, X., Xiong, F., Li, X., Xiang, B., Li, Z., Wu, X., et al. (2018). Application of atomic force microscopy in cancer research. *J. Nanobiotechnology* 16, 102.
- Dos Santos, A. G., Marquês, J. T., Carreira, A. C., Castro, I. R., Viana, A. S., Mingeot-Leclercq, M.-P., et al. (2017). The molecular mechanism of Nystatin action is dependent on the membrane biophysical properties and lipid composition. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19, 30078–30088.
- Dufrêne, Y. F., Ando, T., Garcia, R., Alsteens, D., Martinez-Martin, D., Engel, A., et al. (2017). Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology* 12, 295–307. doi:10.1038/nnano.2017.45.
- Edstrom, R. D., Meinke, M. H., Yang, X. R., Yang, R., Elings, V., and Evans, D. F. (1990). Direct visualization of phosphorylase–phosphorylase kinase complexes by scanning tunneling and atomic force microscopy. *Biophys. J.* 58, 1437–1448.
- Ellis, D. (2002). Amphotericin B: spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 7–10. doi:10.1093/jac/49.suppl\_1.7.
- Enkavi, G., Javanainen, M., Kulig, W., Róg, T., and Vattulainen, I. (2019). Multiscale Simulations of Biological Membranes: The Challenge To Understand Biological Phenomena in a Living Substance. *Chem. Rev.* 119, 5607–5774.
- Enoch, D. A. (2006). Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *Journal of Medical Microbiology* 55, 809–818. doi:10.1099/jmm.0.46548-0.
- Escribá, P. V., and Nicolson, G. L. (2014). Membrane structure and function: Relevance of lipid and protein structures in cellular physiology, pathology and therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838, 1449–1450. doi:10.1016/j.bbamem.2014.03.008.
- Fanos, V., and Cataldi, L. (2001). Renal transport of antibiotics and nephrotoxicity: a review. *J. Chemother.* 13, 461–472.
- Favela-Rosales, F., Galván-Hernández, A., Hernández-Cobos, J., Kobayashi, N., Carbajal-Tinoco, M. D., Nakabayashi, S., et al. (2019). A molecular dynamics study proposing the existence of statistical structural heterogeneity due to chain orientation in the POPC-cholesterol bilayer. *Biophysical Chemistry*, 106275. doi:10.1016/j.bpc.2019.106275.
- Feller, S. E., Yin, D., Pastor, R. W., and MacKerell, A. D. (1997). Molecular dynamics simulation of unsaturated lipid bilayers at low hydration: parameterization and comparison with diffraction studies. *Biophysical Journal* 73, 2269–2279. doi:10.1016/s0006-3495(97)78259-6.
- Finkelstein, A. (1973). Aqueous pores created in thin lipid membranes by the antibiotics nystatin, amphotericin B and gramicidin A: implications for pores in plasma membranes. *Drugs and Transport Processes*, 241–250. doi:10.1007/978-1-349-02273-1\_14.
- Finkelstein, A., and Holz, R. (1973). Aqueous pores created in thin lipid membranes by the

- polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *Membranes* 2, 377–408.
- Frisz, J. F., Klitzing, H. A., Lou, K., Hutcheon, I. D., Weber, P. K., Zimmerberg, J., et al. (2013). Sphingolipid domains in the plasma membranes of fibroblasts are not enriched with cholesterol. *J. Biol. Chem.* 288, 16855–16861.
- Fukuma, T., Higgins, M. J., and Jarvis, S. P. (2007). Direct imaging of lipid–ion network formation under physiological conditions by frequency modulation atomic force microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 98, 106101.
- Fukuma, T., Onishi, K., Kobayashi, N., Matsuki, A., and Asakawa, H. (2012). Atomic–resolution imaging in liquid by frequency modulation atomic force microscopy using small cantilevers with megahertz–order resonance frequencies. *Nanotechnology* 23, 135706.
- Gallis, H. A., Drew, R. H., and Pickard, W. W. (1990). Amphotericin B: 30 Years of Clinical Experience. *Clinical Infectious Diseases* 12, 308–329. doi:10.1093/clinids/12.2.308.
- Ganis, P., Avitabile, G., Mechlinski, W., and Schaffner, C. P. (1971). Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative. *Journal of the American Chemical Society* 93, 4560–4564. doi:10.1021/ja00747a037.
- García-Arribas, A. B., Ahyauch, H., Sot, J., López-González, P. L., Alonso, A., and Goñi, F. M. (2016a). Ceramide-Induced Lamellar Gel Phases in Fluid Cell Lipid Extracts. *Langmuir* 32, 9053–9063.
- García-Arribas, A. B., Alonso, A., and Goñi, F. M. (2016b). Cholesterol interactions with ceramide and sphingomyelin. *Chem. Phys. Lipids* 199, 26–34.
- García-Arribas, A. B., Busto, J. V., Alonso, A., and Goñi, F. M. (2015). Atomic force microscopy characterization of palmitoylceramide and cholesterol effects on phospholipid bilayers: a topographic and nanomechanical study. *Langmuir* 31, 3135–3145.
- Gaussian, and Incorporated (2013). *Gaussian 09 IOps Reference 2nd Ed.*
- Gelbart, W. M., Ben-Shaul, A., and Roux, D. (2012). *Micelles, Membranes, Microemulsions, and Monolayers*. Springer Science & Business Media.
- Goennenwein, S., Tanaka, M., Hu, B., Moroder, L., and Sackmann, E. (2003). Functional incorporation of integrins into solid supported membranes on ultrathin films of cellulose: impact on adhesion. *Biophys. J.* 85, 646–655.
- Goñi, F. M. (2014). The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1838, 1467–1476. doi:10.1016/j.bbamem.2014.01.006.
- Goñi, F. M. (2019). “Rafts”: A nickname for putative transient nanodomains. *Chem. Phys. Lipids* 218, 34–39.
- González-Damián, J., and Ortega-Blake, I. (2010). Effect of membrane structure on the action of polyenes II: nystatin activity along the phase diagram of ergosterol- and cholesterol-containing POPC membranes. *J. Membr. Biol.* 237, 41–49.
- Gould, S. A. C., Drake, B., Prater, C. B., Weisenhorn, A. L., Manne, S., Hansma, H. G., et al.

- (1990). From atoms to integrated circuit chips, blood cells, and bacteria with the atomic force microscope. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* 8, 369–373. doi:10.1116/1.576398.
- Gray, K. C., Palacios, D. S., Dailey, I., Endo, M. M., Uno, B. E., Wilcock, B. C., et al. (2012). Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2234–2239.
- Grimme, S., Antony, J., Ehrlich, S., and Krieg, H. (2010). A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H–Pu. *The Journal of Chemical Physics* 132, 154104. doi:10.1063/1.3382344.
- Gruszecki, W. I., Gagoś, M., Hereć, M., and Kernén, P. (2003). Organization of antibiotic amphotericin B in model lipid membranes. A mini review. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8, 161–170.
- Guirao-Abad, J. P., Sánchez-Fresneda, R., Alburquerque, B., Hernández, J. A., and Argüelles, J.-C. (2017). ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans*. *International Journal of Medical Microbiology* 307, 241–248. doi:10.1016/j.ijmm.2017.03.005.
- Haile, J. M. (1997). *Molecular Dynamics Simulation: Elementary Methods*. University of Texas Press.
- Haile, J. M., Johnston, I., John Mallinckrodt, A., and McKay, S. (1993). Molecular Dynamics Simulation: Elementary Methods. *Computers in Physics* 7, 625. doi:10.1063/1.4823234.
- Hammer, B., Hansen, L. B., and Nørskov, J. K. (1999). Improved adsorption energetics within density-functional theory using revised Perdew–Burke–Ernzerhof functionals. *Physical Review B* 59, 7413–7421. doi:10.1103/physrevb.59.7413.
- Han, Y., Wang, J., Wang, K., and Dong, S. (2016). Fabrication of atomic force microscope spherical tips and its application in determining the mechanical property of cancer cells. *Micro & Nano Letters* 11, 881–884. doi:10.1049/mnl.2016.0319.
- Henderson, E., Haydon, P. G., and Sakaguchi, D. S. (1992). Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science* 257, 1944–1946.
- Holz, R., and Finkelstein, A. (1970). The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* 56, 125–145.
- Hsuchen, C.-C., -C. Hsuchen, C., and Feingold, D. S. (1973). Selective Membrane Toxicity of the Polyene Antibiotics: Studies on Lecithin Membrane Models (Liposomes). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 4, 309–315. doi:10.1128/aac.4.3.309.
- HsuChen, C.-C., and Feingold, D. S. (1973). Polyene antibiotic action on lecithin liposomes: Effect of cholesterol and fatty acyl chains. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 51, 972–978. doi:10.1016/0006-291x(73)90022-3.
- Hsueh, Y.-W., Gilbert, K., Trandum, C., Zuckermann, M., and Thewalt, J. (2005). The Effect of Ergosterol on Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers: A Deuterium NMR and Calorimetric Study. *Biophys. J.* 88, 1799–1808.

- Huang, W., Zhang, Z., Han, X., Tang, J., Wang, J., Dong, S., et al. (2002). Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. *Biophys. J.* 83, 3245–3255.
- Hung, W.-C., Lee, M.-T., Chung, H., Sun, Y.-T., Chen, H., Charron, N. E., et al. (2016). Comparative Study of the Condensing Effects of Ergosterol and Cholesterol. *Biophys. J.* 110, 2026–2033.
- Ip, S., Li, J. K., and Walker, G. C. (2010). Phase segregation of untethered zwitterionic model lipid bilayers observed on mercaptoundecanoic-acid-modified gold by AFM imaging and force mapping. *Langmuir* 26, 11060–11070.
- Israelachvili, J. N. (1977). Refinement of the fluid-mosaic model of membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 469, 221–225. doi:10.1016/0005-2736(77)90185-7.
- Jackman, J. A., Kim, M. C., Zhdanov, V. P., and Cho, N.-J. (2016). Relationship between vesicle size and steric hindrance influences vesicle rupture on solid supports. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18, 3065–3072.
- Jämbeck, J. P. M., and Lyubartsev, A. P. (2012). Derivation and Systematic Validation of a Refined All-Atom Force Field for Phosphatidylcholine Lipids. *The Journal of Physical Chemistry B* 116, 3164–3179. doi:10.1021/jp212503e.
- Jass, J., Tjärnhage, T., and Puu, G. (2000). From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys. J.* 79, 3153–3163.
- Jass, J., Tjärnhage, T., and Puu, G. (2003). Atomic Force Microscopy Imaging of Liposomes. *Methods in Enzymology*, 199–213. doi:10.1016/s0076-6879(03)67013-8.
- Jiménez-Rojo, N., García-Arribas, A. B., Sot, J., Alonso, A., and Goñi, F. M. (2014). Lipid bilayers containing sphingomyelins and ceramides of varying N-acyl lengths: a glimpse into sphingolipid complexity. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 456–464.
- Johnson, K. L., Kendall, K., and Roberts, A. D. (1971). Surface Energy and the Contact of Elastic Solids. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 324, 301–313. doi:10.1098/rspa.1971.0141.
- Kaizuka, Y., and Groves, J. T. (2004). Structure and dynamics of supported intermembrane junctions. *Biophys. J.* 86, 905–912.
- Kalb, E., Frey, S., and Tamm, L. K. (1992). Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1103, 307–316.
- Kamiński, D. M. (2014). Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. *European Biophysics Journal* 43, 453–467. doi:10.1007/s00249-014-0983-8.
- Kaufmann, S., Borisov, O., Textor, M., and Reimhult, E. (2011). Mechanical properties of mushroom and brush poly(ethylene glycol)-phospholipid membranes. *Soft Matter* 7, 9267. doi:10.1039/c1sm05746d.

- Khadka, N. K., Ho, C. S., and Pan, J. (2015). Macroscopic and Nanoscopic Heterogeneous Structures in a Three-Component Lipid Bilayer Mixtures Determined by Atomic Force Microscopy. *Langmuir* 31, 12417–12425.
- Kirat, K. E., El Kirat, K., Morandat, S., and Dufrêne, Y. F. (2010). Nanoscale analysis of supported lipid bilayers using atomic force microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1798, 750–765. doi:10.1016/j.bbamem.2009.07.026.
- Klauda, J. B., Venable, R. M., Alfredo Freites, J., O'Connor, J. W., Tobias, D. J., Mondragon-Ramirez, C., et al. (2010). Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. *The Journal of Physical Chemistry B* 114, 7830–7843. doi:10.1021/jp101759q.
- Klose, C., Ejsing, C. S., García-Sáez, A. J., Kaiser, H.-J., Sampaio, J. L., Surma, M. A., et al. (2010). Yeast lipids can phase-separate into micrometer-scale membrane domains. *ẏ. Biol. Chem.* 285, 30224–30232.
- Kobayashi, N., Asakawa, H., and Fukuma, T. (2010). Nanoscale potential measurements in liquid by frequency modulation atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 81, 123705.
- Kobayashi, N., Maruyama, M., Mori, Y., Fukukita, S., Adachi, H., Takano, K., et al. (2018). Atomic-Scale Imaging of Surface and Hydration Structures of Stable and Metastable Acetaminophen Crystals by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy. *The Journal of Physical Chemistry C* 122, 21983–21990. doi:10.1021/acs.jpcc.8b06928.
- Kodama, M., Kawasaki, Y., and Ohtaka, H. (2012). The main transition enthalpy of the gel-to-liquid crystal phases for a series of asymmetric chain length d-erythro (2S, 3R) sphingomyelins. *Thermochimica Acta* 532, 22–27. doi:10.1016/j.tca.2011.01.011.
- Kraft, M. L. (2013). Plasma membrane organization and function: moving past lipid rafts. *Mol. Biol. Cell* 24, 2765–2768.
- Ladbrooke, B. D., Williams, R. M., and Chapman, D. (1968). Studies on lecithin-cholesterol-water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 150, 333–340. doi:10.1016/0005-2736(68)90132-6.
- Lawrence, J. C., Saslowsky, D. E., Edwardson, J. M., and Henderson, R. M. (2003). Real-time analysis of the effects of cholesterol on lipid raft behavior using atomic force microscopy. *Biophys. ẏ.* 84, 1827–1832.
- Lecuyer, H., and Dervichian, D. G. (1969). Structure of aqueous mixtures of lecithin and cholesterol. *ẏ. Mol. Biol.* 45, 39–57.
- Lee, C., Yang, W., and Parr, R. G. (1988). Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B* 37, 785–789. doi:10.1103/physrevb.37.785.
- Liang, X., Mao, G., and Ng, K. Y. S. (2004). Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. *ẏ. Colloid Interface Sci.* 278, 53–62.
- Lichtenberg, D., Ahyayauch, H., Alonso, A., and Goñi, F. M. (2013). Detergent solubilization

- of lipid bilayers: a balance of driving forces. *Trends Biochem. Sci.* 38, 85–93.
- Lichtenberg, D., Goñi, F. M., and Heerklotz, H. (2005). Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem. Sci.* 30, 430–436.
- Li, M., Chen, M., Sheepwash, E., Brosseau, C. L., Li, H., Pettinger, B., et al. (2008). AFM Studies of Solid-Supported Lipid Bilayers Formed at a Au(111) Electrode Surface Using Vesicle Fusion and a Combination of Langmuir–Blodgett and Langmuir–Schaefer Techniques. *Langmuir* 24, 10313–10323. doi:10.1021/la800800m.
- Lind, T. K., and Cárdenas, M. (2016). Understanding the formation of supported lipid bilayers via vesicle fusion—A case that exemplifies the need for the complementary method approach (Review). *Biointerphases* 11, 020801.
- Lind, T. K., Cárdenas, M., and Wacklin, H. P. (2014). Formation of supported lipid bilayers by vesicle fusion: effect of deposition temperature. *Langmuir* 30, 7259–7263.
- Lin, W.-C., Blanchette, C. D., Ratto, T. V., and Longo, M. L. (2006). Lipid asymmetry in DLPC/DSPC-supported lipid bilayers: a combined AFM and fluorescence microscopy study. *Biophys. J.* 90, 228–237.
- MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., et al. (1998). All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins†. *The Journal of Physical Chemistry B* 102, 3586–3616. doi:10.1021/jp973084f.
- Maekawa, T., Chin, H., Nyu, T., Sut, T. N., Ferhan, A. R., Hayashi, T., et al. (2019). Molecular diffusion and nano-mechanical properties of multi-phase supported lipid bilayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 21, 16686–16693.
- Mannock, D. A., Lewis, R. N. A. H., McMullen, T. P. W., and McElhaney, R. N. (2010a). The effect of variations in phospholipid and sterol structure on the nature of lipid–sterol interactions in lipid bilayer model membranes. *Chem. Phys. Lipids* 163, 403–448.
- Mannock, D. A., Ruthven N A, and McElhaney, R. N. (2010b). A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of ergosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1798, 376–388. doi:10.1016/j.bbamem.2009.09.002.
- Marenich, A. V., Cramer, C. J., and Truhlar, D. G. (2009). Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *The Journal of Physical Chemistry B* 113, 6378–6396. doi:10.1021/jp810292n.
- Marrink, S. J., Jelger Risselada, H., Yefimov, S., Peter Tieleman, D., and de Vries, A. H. (2007). The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B* 111, 7812–7824. doi:10.1021/jp071097f.
- Marti, O., Drake, B., Gould, S., and Hansma, P. K. (1988). Probing Surfaces With The Atomic Force Microscope. *Scanning Microscopy Technologies and Applications*. doi:10.1117/12.944502.
- Matamala, A. R. (2016). A BOX-MODEL APPROACH TO MOLECULAR SHAPE. *Journal of the*

*Chilean Chemical Society* 61, 3250–3254. doi:10.4067/S0717-97072016000400020.

- Maté, S. M., Vázquez, R. F., Herlax, V. S., Daza Millone, M. A., Fanani, M. L., Maggio, B., et al. (2014). Boundary region between coexisting lipid phases as initial binding sites for *Escherichia coli* alpha-hemolysin: a real-time study. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1832–1841.
- Matsumori, N., Tahara, K., Yamamoto, H., Morooka, A., Doi, M., Oishi, T., et al. (2009). Direct interaction between amphotericin B and ergosterol in lipid bilayers as revealed by 2H NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 11855–11860.
- McKiernan, A. E., Ratto, T. V., and Longo, M. L. (2000). Domain Growth, Shapes, and Topology in Cationic Lipid Bilayers on Mica by Fluorescence and Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* 79, 2605–2615. doi:10.1016/S0006-3495(00)76499-X.
- McMullen, T. P. W., Ruthven N A, and McElhaney, R. N. (2004). Cholesterol–phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 8, 459–468. doi:10.1016/j.cocis.2004.01.007.
- Mesa-Arango, A. C., Trevijano-Contador, N., Román, E., Sánchez-Fresneda, R., Casas, C., Herrero, E., et al. (2014). The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 6627–6638.
- Mingeot-Leclercq, M.-P., Deleu, M., Brasseur, R., and Dufrêne, Y. F. (2008). Atomic force microscopy of supported lipid bilayers. *Nat. Protoc.* 3, 1654–1659.
- Miyata, K., and Fukuma, T. (2018). Quantitative comparison of wideband low-latency phase-locked loop circuit designs for high-speed frequency modulation atomic force microscopy. *Beilstein J. Nanotechnol.* 9, 1844–1855.
- Morales-Pennington, N. F., Wu, J., Farkas, E. R., Goh, S. L., Konyakhina, T. M., Zheng, J. Y., et al. (2010). GUV preparation and imaging: minimizing artifacts. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 1324–1332.
- Mornet, S., Lambert, O., Duguet, E., and Brisson, A. (2005). The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy. *Nano Lett.* 5, 281–285.
- Morris, V. J., Kirby, A. R., and Gunning, A. P. (2010). *Atomic Force Microscopy for Biologists*.
- Moss, J. T., and Wilson, J. P. (1992). Current Treatment Recommendations for Leishmaniasis. *Annals of Pharmacotherapy* 26, 1452–1455. doi:10.1177/106002809202601120.
- Mou, J., Czajkowsky, D. M., and Shao, Z. (1996). Gramicidin A aggregation in supported gel state phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry* 35, 3222–3226.
- Mou, J., Czajkowsky, D. M., Zhang, Y., and Shao, Z. (1995a). High-resolution atomic-force microscopy of DNA: the pitch of the double helix. *FEBS Lett.* 371, 279–282.
- Mou, J., Yang, J., Huang, C., and Shao, Z. (1994a). Alcohol induces interdigitated domains in unilamellar phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry* 33, 9981–9985.

- Mou, J., Yang, J., and Shao, Z. (1994b). Tris(hydroxymethyl)aminomethane (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) induced a ripple phase in supported unilamellar phospholipid bilayers. *Biochemistry* 33, 4439–4443.
- Mou, J., Yang, J., and Shao, Z. (1995b). Atomic force microscopy of cholera toxin B-oligomers bound to bilayers of biologically relevant lipids. *J. Mol. Biol.* 248, 507–512.
- Mouri, R., Konoki, K., Matsumori, N., Oishi, T., and Murata, M. (2008). Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membranes as evidenced by surface plasmon resonance. *Biochemistry* 47, 7807–7815.
- Myint, H. (1999). AmBisome: an overview of current use. *Hospital Medicine* 60, 123–126. doi:10.12968/hosp.1999.60.2.1041.
- Nečas, D., and Klapetek, P. (2012). Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. *Open Physics* 10. doi:10.2478/s11534-011-0096-2.
- Nelson, N., and Schwartz, D. K. (2018). Single-Molecule Resolution of Antimicrobial Peptide Interactions with Supported Lipid A Bilayers. *Biophys. J.* 114, 2606–2616.
- Nicolson, G. L. (2014). The Fluid–Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1838, 1451–1466. doi:10.1016/j.bbamem.2013.10.019.
- Odds, F. C., Brown, A. J. P., and Gow, N. A. R. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology* 11, 272–279. doi:10.1016/s0966-842x(03)00117-3.
- Oldfield, E., and Chapman, D. (1972). Dynamics of lipids in membranes: Heterogeneity and the role of cholesterol. *FEBS Lett.* 23, 285–297.
- Ollila, O. H. S., Samuli Ollila, O. H., Róg, T., Karttunen, M., and Vattulainen, I. (2007a). Role of sterol type on lateral pressure profiles of lipid membranes affecting membrane protein functionality: Comparison between cholesterol, desmosterol, 7-dehydrocholesterol and ketosterol. *Journal of Structural Biology* 159, 311–323. doi:10.1016/j.jsb.2007.01.012.
- Ollila, S., Hyvönen, M. T., and Vattulainen, I. (2007b). Polyunsaturation in lipid membranes: dynamic properties and lateral pressure profiles. *J. Phys. Chem. B* 111, 3139–3150.
- Osmulski, P. A., Wlodyga, K., Huang, T. H.-M., and Gaczynska, M. E. (2015). Atomic Force Microscopy of Triple Negative Breast Cancer Cells: A Predictive Value of Mechanical Phenotype. *Biophysical Journal* 108, 141a. doi:10.1016/j.bpj.2014.11.783.
- Ovalle-García, E., and Ortega-Blake, I. (2007). Joining patch-clamp and atomic force microscopy techniques for studying black lipid bilayers. *Applied Physics Letters* 91, 093901. doi:10.1063/1.2776356.
- Ovalle-García, E., Torres-Heredia, J. J., Antillón, A., and Ortega-Blake, I. (2011). Simultaneous Determination of the Elastic Properties of the Lipid Bilayer by Atomic Force Microscopy: Bending, Tension, and Adhesion. *The Journal of Physical Chemistry B* 115, 4826–4833. doi:10.1021/jp111985z.
- Palacios, D. S., Dailey, I., Siebert, D. M., Wilcock, B. C., and Burke, M. D. (2011).

- Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6733–6738.
- Paternostre, M., Ollivon, M., and Bolard, J. (1996). Liposomes: Preparation and Membrane Protein Reconstitution. *Manual on Membrane Lipids*, 202–247. doi:10.1007/978-3-642-79837-5\_9.
- Patra, M. (2005). Lateral pressure profiles in cholesterol-DPPC bilayers. *Eur. Biophys. J.* 35, 79–88.
- Pearlman, D. A., Case, D. A., Caldwell, J. W., Ross, W. S., Cheatham, T. E., DeBolt, S., et al. (1995). AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Computer Physics Communications* 91, 1–41. doi:10.1016/0010-4655(95)00041-d.
- Pencer, J., Nieh, M.-P., Harroun, T. A., Krueger, S., Adams, C., and Katsaras, J. (2005). Bilayer thickness and thermal response of dimyristoylphosphatidylcholine unilamellar vesicles containing cholesterol, ergosterol and lanosterol: A small-angle neutron scattering study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1720, 84–91.
- Perdew, J. P. (1986). Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. *Physical Review B* 33, 8822–8824. doi:10.1103/physrevb.33.8822.
- Perdew, J. P., Burke, K., and Wang, Y. (1996). Generalized gradient approximation for the exchange–correlation hole of a many–electron system. *Physical Review B* 54, 16533–16539. doi:10.1103/physrevb.54.16533.
- Perdew, J. P., Burke, K., and Wang, Y. (1998). Erratum: Generalized gradient approximation for the exchange–correlation hole of a many–electron system [Phys. Rev. B54, 16 533 (1996)]. *Physical Review B* 57, 14999–14999. doi:10.1103/physrevb.57.14999.
- Perdew, J. P., Chevary, J. A., Vosko, S. H., Jackson, K. A., Pederson, M. R., Singh, D. J., et al. (1992). Atoms, molecules, solids, and surfaces: Applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation. *Physical Review B* 46, 6671–6687. doi:10.1103/physrevb.46.6671.
- Perdew, J. P., Chevary, J. A., Vosko, S. H., Jackson, K. A., Pederson, M. R., Singh, D. J., et al. (1993). Erratum: Atoms, molecules, solids, and surfaces: Applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation. *Physical Review B* 48, 4978–4978. doi:10.1103/physrevb.48.4978.2.
- Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., and Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect. Dis.* 17, e383–e392.
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., et al. (2004). UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25, 1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084.
- Ranz, H. T. (2015). Structural Behavior of Free versus Supported Ternary Lipid Bilayer Membranes: A Study Using Coarse-Grain Molecular Dynamics. Available at:

<https://search.proquest.com/docview/1695282775?pq-origsite=gscholar>.

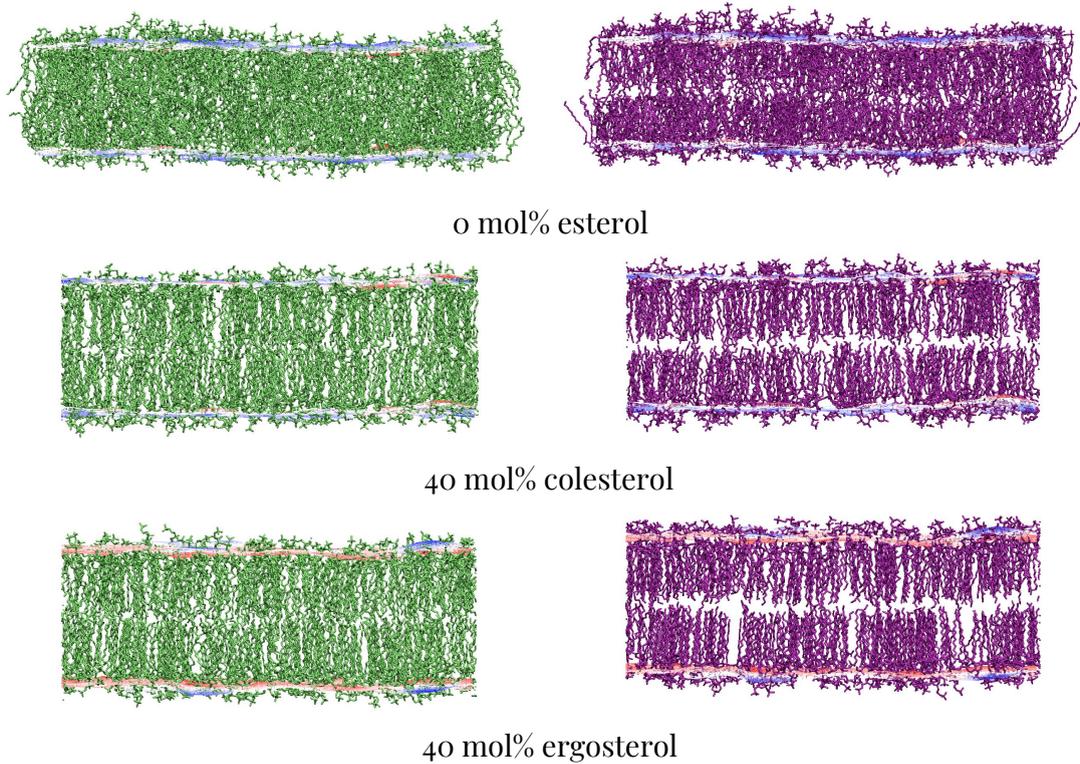
- Ratto, T. V., and Longo, M. L. (2002). Obstructed diffusion in phase-separated supported lipid bilayers: a combined atomic force microscopy and fluorescence recovery after photobleaching approach. *Biophys. J.* 83, 3380–3392.
- Rautemaa-Richardson, R., and Richardson, M. D. (2017). Systemic fungal infections. *Medicine* 45, 757–762. doi:10.1016/j.mpmed.2017.09.007.
- Richter, R., Mukhopadhyay, A., and Brisson, A. (2003). Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study. *Biophys. J.* 85, 3035–3047.
- Richter, R. P., Bérat, R., and Brisson, A. R. (2006). Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view. *Langmuir* 22, 3497–3505.
- Rinia, H. A., Snel, M. M. E., van der Eerden, J. P. J. M., and de Kruijff, B. (2001). Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Letters* 501, 92–96. doi:10.1016/S0014-5793(01)02636-9.
- Rolston, K. (2001). Overview of systemic fungal infections. *Oncology* 15, 11–14.
- Römer, W., Lam, Y. H., Fischer, D., Watts, A., Fischer, W. B., Göring, P., et al. (2004). Channel activity of a viral transmembrane peptide in micro-BLMs: Vpu(1–32) from HIV-1. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 16267–16274.
- Sangalli-Leite, F., Scorzoni, L., Mesa-Arango, A. C., Casas, C., Herrero, E., Maria José Soares, et al. (2011). Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. *Microbes and Infection* 13, 457–467. doi:10.1016/j.micinf.2011.01.015.
- Schäfer, E., Vache, M., Kliesch, T.-T., and Janshoff, A. (2015). Mechanical response of adherent giant liposomes to indentation with a conical AFM-tip. *Soft Matter* 11, 4487–4495. doi:10.1039/c5sm00191a.
- Schaftenaar, G., Vlieg, E., and Vriend, G. (2017). Molden 2.0: quantum chemistry meets proteins. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 31, 789–800.
- Schlenkrich, M., Brickmann, J., MacKerell, A. D., and Karplus, M. (1996). An Empirical Potential Energy Function for Phospholipids: Criteria for Parameter Optimization and Applications. *Biological Membranes*, 31–81. doi:10.1007/978-1-4684-8580-6\_2.
- Sens, P., and Plastino, J. (2015). Membrane tension and cytoskeleton organization in cell motility. *J. Phys. Condens. Matter* 27, 273103.
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., and Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 361–374.
- Shekhova, E., Kniemeyer, O., and Brakhage, A. A. (2017). Induction of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production by Itraconazole, Terbinafine, and Amphotericin B as a Mode of Action against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61. doi:10.1128/AAC.00978-17.
- Shinozaki, Y., Siitonen, A. M., Sumitomo, K., Furukawa, K., and Torimitsu, K. (2008). Effect of Ca<sup>2+</sup> on Vesicle Fusion on Solid Surface: An In vitro Model of Protein-Accelerated

- Vesicle Fusion. *Japanese Journal of Applied Physics* 47, 6164–6167.  
doi:10.1143/jjap.47.6164.
- Silin, V. I., Wieder, H., Woodward, J. T., Valincius, G., Offenhausser, A., and Plant, A. L. (2002). The role of surface free energy on the formation of hybrid bilayer membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 14676–14683.
- Silva, L., Coutinho, A., Fedorov, A., and Prieto, M. (2006). Competitive binding of cholesterol and ergosterol to the polyene antibiotic nystatin. A fluorescence study. *Biophys. J.* 90, 3625–3631.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572.  
doi:10.1038/42408.
- Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731.
- Steltenkamp, S., Müller, M. M., Deserno, M., Hennesthal, C., Steinem, C., and Janshoff, A. (2006). Mechanical properties of pore-spanning lipid bilayers probed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 91, 217–226.
- Sterling, T. R., and Merz, W. G. (1998). Resistance to amphotericin B: emerging clinical and microbiological patterns. *Drug Resistance Updates* 1, 161–165.  
doi:10.1016/s1368-7646(98)80034-4.
- Stewart, E. R., Eldridge, M. L., McHardy, I., Cohen, S. H., and Thompson, G. R., 3rd (2018). Liposomal Amphotericin B as Monotherapy in Relapsed Coccidioidal Meningitis. *Mycopathologia* 183, 619–622.
- Sudhakar, S., Jachowski, T. J., Kittelberger, M., Maqbool, A., Hermsdorf, G. L., Abdosamadi, M. K., et al. (2019). Supported Solid Lipid Bilayers as a Platform for Single-Molecule Force Measurements. *Nano Lett.* doi:10.1021/acs.nanolett.9b03761.
- Suga, K., and Umakoshi, H. (2013). Detection of nanosized ordered domains in DOPC/DPPC and DOPC/Ch binary lipid mixture systems of large unilamellar vesicles using a TEMPO quenching method. *Langmuir* 29, 4830–4838.
- Svetlizky, D., Levi, O., Benhar, I., and Eliaz, N. (2019). Mechanical properties of Bio-Ferrography isolated cancerous cells studied by atomic force microscopy. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 91, 345–354.
- Tabor, D. (1977). Surface forces and surface interactions. *Journal of Colloid and Interface Science* 58, 2–13. doi:10.1016/0021-9797(77)90366-6.
- Tamm, L. K., and McConnell, H. M. (1985). Supported phospholipid bilayers. *Biophysical Journal* 47, 105–113. doi:10.1016/s0006-3495(85)83882-0.
- Tanford, C. (1980). *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*. John Wiley & Sons.
- Tharad, S., Promdonkoy, B., and Toca-Herrera, J. L. (2019). Lipid phase influences the binding of Bacillus thuringiensis Cyt2Aa2 toxin on model lipid membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 511, 409–415.
- Veatch, S. L., and Keller, S. L. (2002). Organization in Lipid Membranes Containing

- Cholesterol. *Physical Review Letters* 89. doi:10.1103/physrevlett.89.268101.
- Venegas, B., González-Damián, J., Celis, H., and Ortega-Blake, I. (2003). Amphotericin B channels in the bacterial membrane: role of sterol and temperature. *Biophys. J.* 85, 2323–2332.
- Voigtländer, B. (2019a). Forces Between Tip and Sample. *Atomic Force Microscopy*, 161–176. doi:10.1007/978-3-030-13654-3\_10.
- Voigtländer, B. (2019b). Intermittent Contact Mode/Tapping Mode. *Atomic Force Microscopy*, 231–253. doi:10.1007/978-3-030-13654-3\_14.
- Wang, Y., Gkeka, P., Fuchs, J. E., Liedl, K. R., and Cournia, Z. (2016). DPPC-cholesterol phase diagram using coarse-grained Molecular Dynamics simulations. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 2846–2857.
- Whyte, B. S., Peterson, R. P., and Hartsel, S. C. (1989). Amphotericin B and Nystatin show different activities on sterol-free vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 609–614.
- Wilcock, B. C., Endo, M. M., Uno, B. E., and Burke, M. D. (2013). C2'-OH of Amphotericin B Plays an Important Role in Binding the Primary Sterol of Human Cells but Not Yeast Cells. *Journal of the American Chemical Society* 135, 8488–8491. doi:10.1021/ja403255s.
- Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C., and London, E. (2001). Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and ceramide. *J. Biol. Chem.* 276, 33540–33546.
- Yoshida, A. (2015). Non-Invasive Imaging of F-Actin Dynamics in Living Cells by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* 108, 453a. doi:10.1016/j.bpj.2014.11.2471.
- Yoshina-Ishii, C., and Boxer, S. G. (2003). Arrays of mobile tethered vesicles on supported lipid bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3696–3697.

## **Apéndice A. Grosor de la región gel de la bicapa POPC/eSM con 20 mol% de ergosterol.**

Cómo se mostró en los resultados la bicapa cuya composición es de una razón equimolar de POPC y esfingomielina de huevo con ergosterol a una concentración de 20 mol% registra una región de fase gel con un grosor de ~8 nm. En el texto se ofreció una explicación, sin embargo, considero pertinente agregar más información a dicha explicación apoyado con resultados preliminares de simulaciones de dinámica molecular realizados por el grupo de biofísica. Como continuación del trabajo presentado en esta tesis se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular a nivel atómico con el paquete GROMACS y el campo de fuerza Slipids de las mezclas utilizadas. A saber, POPC y esfingomielina 16:0 (16:0 SM) a una razón equimolar ya sea solos o en conjunto con ergosterol y colesterol a 20 y 40 mol%. Los resultados muestran claramente que la presencia de esterol ordena de manera sustancial las cadenas de hidrocarburos de los lípidos, aunque en mayor medida de la esfingomielina (16:0 SM). Este efecto se observa más marcado a mayor concentración de esterol y además el efecto se nota mejor con ergosterol. Adicionalmente a este ordenamiento se observa un fenómeno muy peculiar en el espacio entre monocapas, particularmente entre regiones de esfingomielina. Este espacio inter-capa se incrementa al aumentar la concentración de esterol y a 40 mol% de ergosterol el espacio se nota muy ancho. La figura S1 muestra un corte transversal de las bicapas simuladas. Se presentan de color verde las moléculas de POPC y de morado las de 16:0 SM. Se muestran sólo bicapas con 0 mol% y 40 mol% esterol ya que a esta concentración se observa de manera clara el efecto a resaltar. Se puede observar en la figura que inicialmente (0 mol%) POPC se encuentra en un estado desordenado y PSM se encuentra más ordenado, aunque no tanto como se podría esperar de un esfingolípido. Para el caso de 40 mol% de esterol se observa claramente como ambos esterol ordenan las cadenas de hidrocarburos de POPC y de 16:0 SM comparadas con el caso binario. Sin embargo, este efecto de orden se observa de manera más dramática para el caso de PSM con ergosterol. Adicionalmente se observa una mayor agrupación de las moléculas de 16:0 SM en el caso de 40 mol% ergosterol que en los otros dos, sobre todo en la monocapa inferior. También a esta concentración de esterol se observa un incremento en la distancia entre las monocapas cuando se presentan únicamente las moléculas de 16:0 SM, algo que no se observa cuando se observan únicamente las moléculas de POPC, y esta diferencia se nota mayor para el caso de ergosterol. De ser un efecto real, este último fenómeno suma a la explicación ofrecida en el texto acerca de una extensión o elongación máxima para la esfingomielina por parte del ergosterol dado que existe este espacio inter-capa que aumenta el grosor de la bicapa. Hasta ahora no tenemos una evaluación cuantitativa del fenómeno, sólo cualitativa, y se sigue investigando la causa de esta elevación por parte de 16:0 SM además de que se busca qué otra componente (POPC, esterol) ocupa ese espacio “vacío”. Se espera que en los próximos meses se tengan datos numéricos de las diferencias, así como una explicación molecular del origen de este fenómeno.



*Figura S1. Cortes transversales de las bicapas simuladas. Bicapas compuestas de POPC/16:0 SM en una razón equimolar con 0 y 40 mol% de colesterol o ergosterol. En la columna izquierda se muestra POPC en cada caso (verde) y en la columna derecha se observa 16:0 SM para cada bicapa (morado). Simulaciones llevadas a cabo con GROMACS y Slipids a 295 K con un total de 1024 lípidos por bicapa. Tiempo de simulación: 500 ns para 0 mol% y 1000 ns para los otros dos casos. Resultados preliminares del grupo de biofísica compuesto por el Dr. Fernando Favela, el Dr. Jorge Hernández Cobos, el Dr. Iván Ortega Blake y el M. en C. Arturo Galván Hernández.*