



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



Simulaciones computacionales de colorantes sensibles al voltage (CSV) insertos en membranas biológicas modelo

Seminario de Investigación y/o desarrollo para obtener el título de grado
universitario:

Licenciada en Ciencias Básicas con Orientación en Química

Alumna: Micaela Janet Sosa

Directora: Dra. Vanesa Viviana Galassi

Codirector: Dr. Mario Gabriel Del Pópolo

Fecha: 3 de abril del 2020

Indice

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Propiedades eléctricas de la membrana plasmática.....	3
1.1.1 Potencial de reposo.....	5
1.1.2 Potencial de acción.....	6
1.2 Determinación de potenciales de membrana.....	7
1.3 Colorantes sensibles al voltaje CSVs.....	9
1.3.1 Mecanismos de sensibilidad al voltaje de los CSVs.....	9
1.3.2 Propiedades ópticas.....	9
1.3.3 Antecedentes en simulaciones computacionales de colorantes sensibles al voltaje.....	13
1.4 Indocianina Verde.....	15
Objetivos	

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Simulaciones computacionales.....	18
2.1.1 Descripción matemática de un sistema molecular en simulaciones computacionales.....	19
2.1.2 Métodos <i>ab initio</i>	20
2.1.3 Teoría del funcional de la densidad y método de Khon -Sham.....	21
2.1.4 Métodos empíricos.....	24
2.2 Métodos de muestreo.....	27
2.2.1 Dinámica molecular.....	27
2.3 Métodos de muestreo aumentado para la determinación de energías libres de partición.....	28
2.4 Métodos de cálculo de propiedades ópticas en fase condensada.....	30

3. METODOLOGÍA

3.1 Sistema de estudio.....	31
3.1.1 Modelo molecular del colorante.....	31
3.2 Generación del potencial transmembrana.....	33
3.3 Simulaciones de dinámica molecular.....	38
3.4 Potencial de fuerza media.....	39
3.4.1 Cálculo del Potencial de Fuerza Media.....	39
3.5 Análisis configuracional del colorante inserto en la membrana.....	40
3.5.1 Localización del colorante en la membrana.....	41
3.5.2 Análisis de la localización de los grupos sulfonatos.....	41
3.5.3 Orientación del colorante en la membrana.....	41
3.5.4 Análisis conformacional del colorante en membranas de POPC.....	42
3.6 Cálculo de las propiedades ópticas.....	42

4. RESULTADOS

4.1 PMF y Energía libre de partición.....	45
4.2 Localización del colorante en la membrana.....	46
4.3 Análisis de la localización de los grupos sulfonatos.....	50
.....	51
4.4 Orientación del colorante en la membrana.....	52
4.5 Análisis conformacional de ICG en membranas de POPC.....	54

4.6 Propiedades ópticas.....	56
5. CONCLUSIONES.....	58
6. PROYECCIONES.....	59
7. BIBLIOGRAFÍA.....	60

Capítulo 1

Introducción

1.1 Propiedades eléctricas de la membrana plasmática

La membrana plasmática está compuesta mayoritariamente de fosfolípidos que se disponen de manera tal de formar una bicapa lipídica, esta disposición le da la característica de presentar un interior hidrofóbico y extremos hidrofílicos otorgándole la funcionalidad de compartimentalizar reservorios acuosos. De esta manera, la membrana representa una barrera física entre el interior celular y su medio circundante, y como tal entre otras funciones, se encarga de regular el transporte selectivo de sustancias hacia dentro y fuera de la célula que rodea. Una de las características que le permite llevar a cabo esta función es su capacidad de permeabilidad selectiva. [1]

La funcionalidad de la membrana depende del equilibrio dinámico entre contribuciones eléctricas que conforman el potencial eléctrico total a través de la membrana (ver Figura 1.1). Una de las contribuciones se debe al movimiento asimétrico de iones desde el medio extracelular al medio interno de la célula y viceversa que junto con la característica de permeabilidad selectiva de la membrana producen una diferencia de energía potencial eléctrica a través de la misma denominado “potencial transmembrana” ($\Delta\Psi_m$). Este potencial presenta un rango entre -50 y -200 mV [1] y se compone de diferentes contribuciones. Por otro lado, las interacciones entre los grupos cargados de las cabezas polares de los lípidos y los iones de la solución acuosa presentes en la de la superficie de la membrana generan un potencial de superficie (Ψ_s). El potencial de superficie se encarga de controlar la concentración de los iones localizados cerca de la superficie de la membrana. Y por último, en el interior de la membrana, se encuentra el potencial dipolar de membrana ($\Delta\Psi_d$) que surge como resultado de la alineación paralela de los dipolos de los fosfolípidos y el agua, (ver Figura 1.2) y varía en

magnitud tanto longitudinal como lateralmente a través de la bicapa, de acuerdo con la composición de la membrana y la densidad de empaquetamiento de fosfolípidos [2].

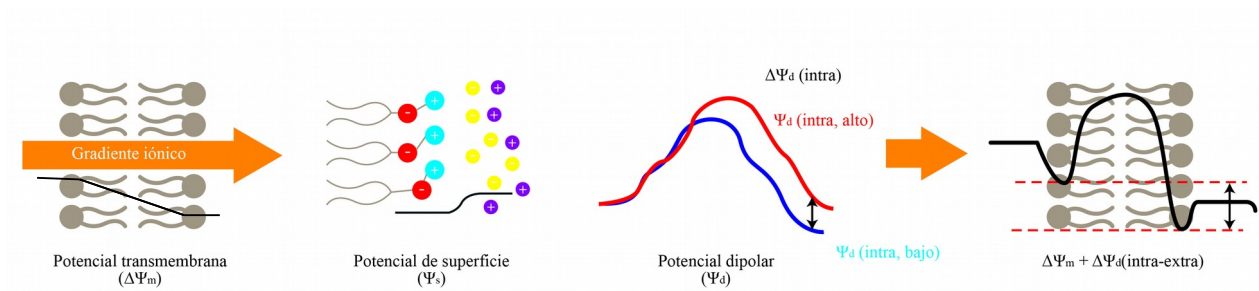


Figura 1.1: Contribuciones al potencial total de la membrana celular: potencial de transmembrana ($\Delta\Psi_m$), potencial de superficie (Ψ_s) y el potencial dipolar de membrana (Ψ_d). Ψ_d consiste en componentes extra e intracelulares Ψ_d (extra), Ψ_d (intra), y por la asimetría de composición entre hemicapas de membranas biológicas, de una componente de transmembrana, $\Delta\Psi_d$ (intra-extra). Las curvas roja y azul en el potencial dipolar representan los dos estados de este potencial debido a los estados de alto y baja energía que transita Ψ_d (intra) dependiente de la conformación de los canales iónicos. Adaptada de [2].

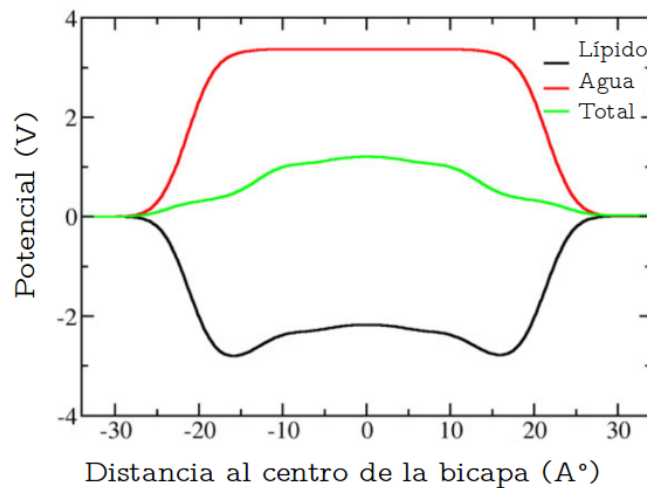


Figura 1.2: Forma del potencial dipolar (Ψ_d) e individuales contribuciones en el mismo, calculado por simulaciones de dinámica molecular de una membrana modelo de POPC. La curva roja representa el perfil de potencial eléctrico producido por la alineación de los dipolos del agua. La curva negra es el potencial producido por la alineación paralela de los fosfolípidos. La curva verde es la suma de ambas contribuciones y representa el potencial dipolar total. Adaptada de [2].

Los gradientes electroquímicos generados que dan origen al potencial de transmembrana son muy importantes para los seres vivos, debido a que provocan el movimiento de sustancias a través de la membrana y con ello generan energía aprovechable

para la célula.

Cambios en el potencial de membrana suelen ser consecuencia de cambios conformacionales en las proteínas transmembrana llamadas canales iónicos. Estas macromoléculas constituyen compuertas que se abren o cierran para modificar la permeabilidad de la membrana dando lugar a corrientes de iones que median la variación del potencial de membrana [1].

Las células eléctricamente excitables como las células musculares, células secretoras, cardiomiocitos y neuronas, ejercen sus funciones generando señales eléctricas en términos de cambios del potencial de membrana [3,4]. La determinación de dichos cambios permite verificar el correcto funcionamiento eléctrico de las células o en caso contrario detectar enfermedades relacionadas al mal funcionamiento de circuitos eléctricos.

Las membranas presentan diferentes estadios del potencial eléctrico.

1.1.1 Potencial de reposo

El potencial de reposo de la membrana plasmática es el potencial eléctrico que se encuentra cuando no se está transmitiendo señal eléctrica. Este tipo de potencial se genera debido a los gradientes iónicos que atraviesan la membrana plasmática en estado no excitado y recibe contribuciones de los potenciales de superficie y dipolar.

En condiciones fisiológicas, los iones involucrados en la generación del potencial de transmembrana son dos, sodio (Na^+) y potasio (K^+). La membrana es permeable a Na^+ y K^+ pero no así a los iones cloruro Cl^- presentes en el interior celular ni a otros aniones que componen el citosol. La difusividad selectiva a la membrana produce una desigualdad de cargas a través de ella, desarrollando un voltaje que se opone al gradiente de concentración de estos iones mientras están atravesando la membrana. Cuando el gradiente eléctrico equilibra con exactitud al gradiente de concentración se produce un equilibrio donde no hay flujo neto del ión .

El potencial de equilibrio (E_x) de un ión X se calcula mediante la ecuación de Nernst:

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln\left(\frac{[X]_2}{[X]_1}\right) \quad (1)$$

donde R es la constante de los gases, T la temperatura del sistema, z la carga del ión, F la constante de Faraday y $[X]_2$, $[X]_1$ la concentración del ión extra e intra celular, respectivamente. La coexistencia de los potenciales de equilibrio de K^+ y de Na^+ producen el potencial de reposo.

Por ejemplo, las neuronas presentan un potencial de equilibrio (E_K) de -92 mV para el ión potasio y (E_{Na}) de +62 mV para el ión sodio ambos a 37°C.

En las neuronas el potencial de reposo tiene un valor entre -60 y -80 mV, que es un valor intermedio entre los potenciales de equilibrio de los cationes mencionados, pero es más cercano al E_K debido a que este es el que más contribuye al potencial transmembrana [1].

1.1.2 Potencial de acción

Los potenciales de acción de las neuronas son señales breves, de solo 1-2 milisegundos de duración, pero de gran amplitud que surgen en respuesta a un estímulo. El estímulo abre los canales iónicos reguladores de Na^+ presentes en la membrana celular y estos canales permiten una rápida redistribución (submilisegundo) de los iones Na^+ desde el medio extracelular al citosol, generando una reducción en la magnitud del potencial denominada “despolarización”.

Si la despolarización llega a un valor umbral, como se muestra en la Figura 1.3, se desencadena la apertura sucesiva de canales de Na^+ en la membrana de las neuronas produciendo un aumento elevado del potencial transmembrana denominado “potencial de acción”. Luego se abren los canales reguladores de K^+ permitiendo la salida de este ión al exterior, lo que produce una repolarización hasta sobrepasar el valor del potencial de reposo. Un aumento en la magnitud del potencial de membrana que sobrepase el valor de el potencial de reposo se denomina “hiperpolarización”. Finalmente a medida que disminuye el paso de potasio y aumenta el paso de sodio se restituye el potencial de reposo [1].

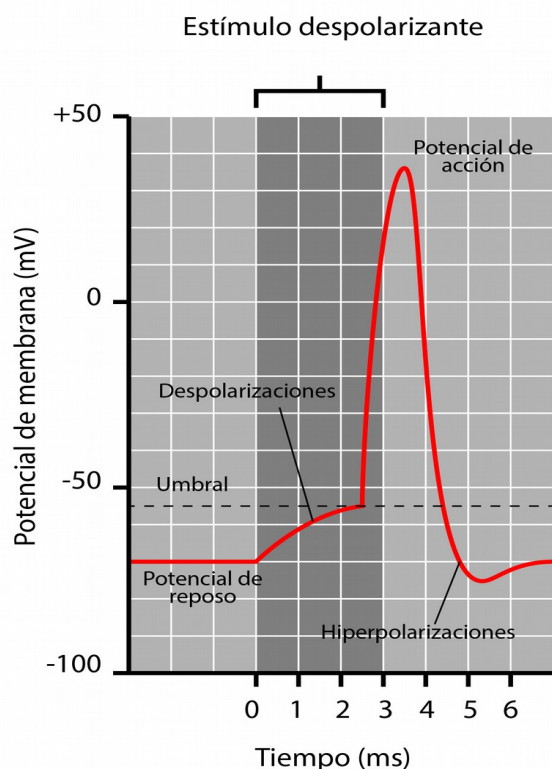


Figura 1.3: Perfil de un potencial de acción de una membrana excitable. Adaptada de [1].

Si bien los cambios en el potencial de membrana son pequeños en mV, determinan grandes cambios en el campo eléctrico (V/cm) porque la membrana es muy delgada. Por lo tanto, 100 mV a través de aproximadamente 3 nm de espesor de la membrana equivale a un cambio de 300000 V/cm en el campo eléctrico local.

La propagación del potencial de acción y las corrientes sinápticas también dan lugar a corrientes extracelulares e intracelulares, lo que significa que también habrá gradientes de voltaje en estos lugares. Sin embargo, estas corrientes extracelulares fluyen a través de distancias de mm (en lugar de nm) y, por lo tanto, los gradientes de potencial son más pequeños en seis órdenes de magnitud [5].

1.2 Determinación de potenciales de membrana

Las técnicas ópticas para monitorear actividad eléctrica en las células nerviosas han adquirido gran relevancia en el área de la biofísica por presentar grandes ventajas de medición respecto al método de determinación convencional (Patch Clamp). Este último método utiliza

microelectrodos que se colocan en la superficie de las células y miden la corriente a través del contacto directo con la membrana plasmática, lo que provoca que sea un método de determinación altamente invasivo [6].

Las ventajas de las mediciones ópticas respecto al método convencional son: la posibilidad de medir diferencias en el potencial eléctrico de membranas que son muy pequeñas para ser medidas con microelectrodos [7]; la mayor resolución espacial y temporal del orden de los submicrones y los submicrosegundos respectivamente; la capacidad de registrar simultáneamente voltajes transitorios en diferentes sitios del sistema nervioso, permitiendo monitorear la actividad eléctrica de cada neurona en un circuito [8]; y la baja invasividad en comparación con los microelectrodos que implican contacto directo con las células y fuerte excitación de las mismas [7].

Estas técnicas se basan principalmente en el uso de colorantes sensibles al voltaje (CSVs) extrínsecos para medir el potencial transmembrana. El grado de invasividad de las técnicas ópticas está dado por el efecto farmacológico o efecto fotodinámico que produce el colorante en el organismo.

A pesar del gran potencial de las técnicas ópticas de monitoreo de potencial transmembrana, quedan muchos desafíos por afrontar en el desarrollo de sensores. El primero es la necesidad de que el sensor este físicamente en contacto con la membrana, ya que de no ser así, no podría sentir el cambio en el potencial eléctrico de la misma. Más allá de la longitud de Debye, 10 \AA , el campo eléctrico se disipa rápidamente a medida que el sensor se aleja de la membrana, es decir, el desplazamiento del mismo por sólo un nanómetro podría atenuar considerablemente la sensibilidad de la medición. De aquí subyace la importancia de conocer y controlar la localización del sensor en escala nanométrica. El segundo desafío tiene que ver con la restricción de que la membrana es una superficie bidimensional e implica una limitación física en el número de cromóforos que pueden usarse para informar los cambios. Este desafío requiere el uso de cromóforos muy eficientes con el fin de no iluminar intensamente a la membrana y provocarle fotodaño. Por lo tanto es importante conocer y determinar la eficiencia cuántica de los sensores [8].

1.3 Colorantes sensibles al voltaje CSVs.

Los colorantes sensibles al voltaje son moléculas anfífilas fluorescentes que se embeben en la membrana celular y pueden sentir diferencias de voltaje cambiando sus propiedades espectrales. Los cambios en las propiedades espectrales pueden ser en la longitud de onda de absorción u emisión máxima o en la intensidad de fluorescencia [9].

1.3.1 Mecanismos de sensibilidad al voltaje de los CSVs

Es probable que múltiples mecanismos con diferentes escalas de tiempos contribuyan a la sensibilidad general al voltaje de los CSVs. Sin embargo, en muchos casos un mecanismo particular parece ser dominante y es el que se utiliza para describir el cromóforo. La Figura 1.3 ejemplifica los principales mecanismos de sensibilidad al voltaje: redistribución, reorientación, electrocromismo, FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia), híbrido, agregación, intrínseco, electroóptico y *q-dots* (nanopartículas) [8].

1.3.2 Propiedades ópticas

Para comprender los posibles mecanismos mediante los cuales los CSVs responden al cambio en el potencial de transmembrana se debe comprender la química-física que subyace a la absorción y emisión de un fotón.

Los colorantes tienen en su estructura molecular una región denominada cromóforo que es donde ocurre la excitación electrónica. Los cromóforos absorben la energía de un fotón, dada por $h\nu$ donde h es la constante de Planck y ν la frecuencia del fotón, sólo si esta energía de excitación coincide con la diferencia de energía entre el estado fundamental y el estado excitado del cromóforo. Como consecuencia de la absorción se produce una redistribución de los electrones en el colorante. Una vez que la molécula es promovida al estado electrónico excitado, decae inmediatamente a través de procesos de relajación fundamentalmente vibracionales. Esta relajación puede ser instantánea al estado fundamental, o puede permanecer en un estado vibracionalmente relajado pero electrónicamente excitado durante unos nanosegundos, para luego decaer emitiendo un fotón. A este decaimiento radiativo se lo denomina fluorescencia. El hecho de que el estado excitado haya tenido la oportunidad de relajarse antes de emitir un fotón, adoptando una conformación que sea más estable para la distribución de electrones, produce una longitud de onda más larga (menor energía) en

comparación con la banda de longitudes de onda que se utiliza para excitar un cromóforo dado, a lo que se denomina desplazamiento de Stokes [5].

Electrocromismo

El electrocromismo es la propiedad que presentan algunos colorantes de cambiar la estabilidad relativa de sus estados electrónicos fundamental y excitado debido a la presencia de un campo eléctrico externo. Esto produce que los colorantes, cuando no están bajo la presencia de un campo eléctrico y son excitados por fotones, presenten una longitud de onda de absorción y emisión determinada, pero al estar bajo la influencia de uno, cambian su longitud de onda de absorción y/o emisión [5].

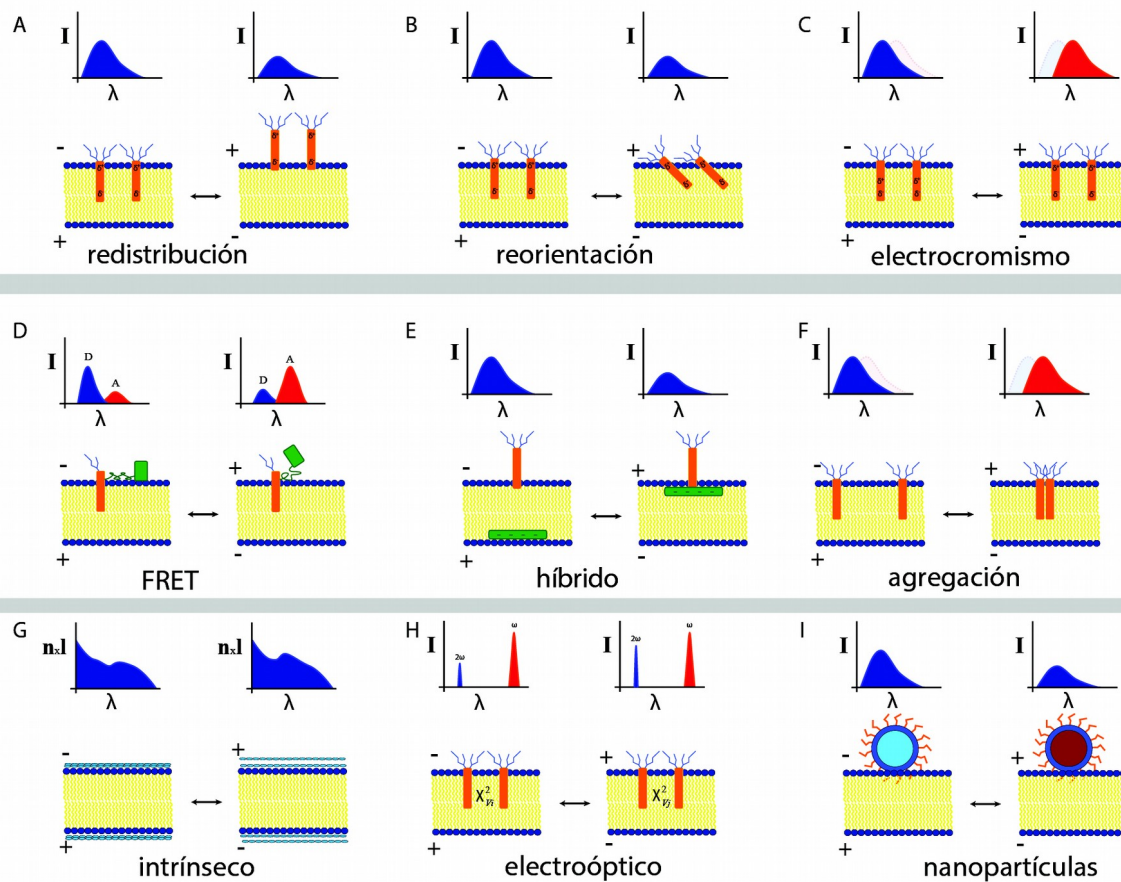


Figura 1.3: Mecanismos que pueden estar involucrados en la sensibilidad al voltaje de colorantes. I es la intensidad de fluorescencia, λ la longitud de onda de absorción. Las cargas positiva y negativa indican la dirección del campo eléctrico. El potencial de membrana se invierte debido al movimiento de cargas positivas del medio extracelular al medio interno de la célula en membranas celulares ó en simulaciones de membranas modelo, produciendo un desbalance iónico a través de la misma. (A) redistribución, implica el movimiento de entrada o salida del colorante en la membrana debido a una diferencia de voltaje; (B) reorientación, donde el campo eléctrico que actúa sobre el dipolo del colorante y produce un torque que cambia la alineación del colorante con respecto a la membrana; (C) electrocromismo, donde el potencial de membrana cambia la energía relativa del estado basal y los estados excitados del cromóforo alterando la excitación y longitud de onda de emisión del cromóforo. (D) FRET (transferencia de energía de resonancia de fluoróforos Förster), son proteínas fluorescentes donde los cambios espectrales y conformacionales inducidos por el voltaje alteran la eficiencia de la fluorescencia. Aquí D hace referencia a la energía de transferencia de Dexter donde disminuye la intensidad por colisiones con otras moléculas y A hace referencia a interacciones alostericas que cambian el ambiente del fluoróforo; (E) híbrido, el enfriamiento por colisión se usa en algunos esquemas híbridos, donde los movimientos inducidos por voltaje conducen a la transferencia de energía, alterando el rendimiento cuántico de fluorescencia y la vida útil, (F) dimerización/agregación inducida por voltaje, donde el cambio de voltaje induce la agregación de cromóforos, alterando los espectros; (G) imágenes intrínsecas (cambios complejos del índice de refracción debido a la actividad potencial de acción); (H) electroóptico, donde los cambios en el voltaje alteran la $\chi^{(2)}$ efectiva, modulando la señal del segundo armónico (SHG); (I) nanopartículas, no es un mecanismo per se sino que se utiliza como un nuevo cromóforo o como un "amplificador" de sensibilidad para los cromóforos cercanos existentes [8].

1.3.3 Antecedentes en simulaciones computacionales de colorantes sensibles al voltaje

En el ámbito científico se encuentran una gran variedad de trabajos experimentales abocados a estudiar los colorantes sensibles al voltaje. En particular, en el trabajo de Slovin et. al. [9] se buscó demostrar las ventajas espaciales y temporales que tienen las técnicas ópticas para monitorear actividad eléctrica en tejidos excitables de mamíferos. Se utilizaron CSVs para estudiar la evolución temporal a largo plazo de imágenes de potencial de áreas corticales individuales o interconectadas en cerebro de primates. A partir de estos resultados se lograron explorar las respuestas espacio-temporales de las poblaciones neuronales a diferentes estímulos visuales, como así también examinar la arquitectura funcional y la dinámica retinotópica de dichas poblaciones. Se demostró que esa técnica no causa daño acumulado significativo a la arquitectura cortical y que tiene la capacidad de obtener resultados con una alta relación señal/ruido.

Por el contrario, los trabajos basados en simulaciones computacionales destinados a aportar información molecular subyacente a los mecanismos de sensibilidad al potencial son más escasos. Durante los últimos años, algunos trabajos de investigación que implican simulaciones computacionales se han llevado a cabo para investigar si las herramientas computacionales pueden usarse para explicar y predecir la unión de moléculas anfífilas como los colorantes sensibles al voltaje a las membranas lipídicas, utilizando los datos experimentales disponibles como referencia. Entre ellos se pueden mencionar:

El trabajo de Matson et. al. [10], se enfocó en elucidar el mecanismo detrás de la respuesta de los colorantes de estireno, di-4-ANEPPS, di-8-ANEPPS, y RH421 con membranas modelos a través de una combinación de técnicas experimentales y cálculos de estructura electrónica. En ese trabajo se buscó resolver si la respuesta al voltaje por estos CSVs se debe al electrocromismo, como resultado de la interacción del campo con la estructura electrónica del colorante, o si también recibe aporte del cambio del entorno: en la alineación y grado de oligomerización molecular de la sonda en la membrana. Se llevó a cabo un análisis de las propiedades ópticas de los colorantes en diferentes entornos, de polaridad y viscosidad variables con el fin de comparar las propiedades de las tres sondas y evaluar los mecanismos de interacción con el entorno.

En el trabajo de Hinner et. al. [11] se desarrolló un trabajo que aportó al estudio de la

interacción de los CSVs con biomembranas. En este trabajo se realizaron simulaciones de dinámica molecular (MD) de un colorante sensible al voltaje de tipo estireno, el di-4-ASPBS, en una biomembrana modelo. Se utilizó un modelo de grano grueso, el que fue validado por comparación con simulaciones atomísticas. El modelo de grano grueso presenta significativas ventajas de eficiencia como por ejemplo permitir el cálculo de energía libre de partición del colorante con bajo costo computacional. Este trabajo también puso en evidencia que el aumento de la longitud de la cadena de la cola lipofílica aumenta la energía libre de unión del colorante a la membrana y mostró el impacto diferencial de la introducción de grupos éster de ácido fosfórico en la cabeza o la cola de estos anfífilos.

En el trabajo de Kulkarni et. al. [4] se realizaron simulaciones de MD para el diseño racional de indicadores de voltaje fluorescentes ultrasensibles llamados VoltageFluor (VF), con el objetivo de mejorar el rendimiento de respuesta. Los VF usan el mecanismo de transferencia de electrones fotoinducida (PeT) como interruptor de detección de voltaje. La tasa de PeT se ve modificada por el potencial transmembrana de manera que en una hiperpolarización el PeT se acelera y la fluorescencia se apaga, mientras que durante una despolarización, la tasa de PeT decrece y la fluorescencia incrementa. Las simulaciones de MD predijeron un aumento aproximadamente del 16% en la sensibilidad del voltaje que resulta de una mejor orientación de VF con la membrana. Esto se fundamentó en que la interacción entre el electrón transferido y el potencial de membrana es más alta cuando el vector de transferencia de electrones (r) y los vectores de campo eléctrico (E) están alineados y, es mínima, cuando son perpendiculares, según la ecuación $\Delta E/F \propto \Delta G = qrE \cos \theta$ [12,13], donde $\Delta E/F$ es la sensibilidad de voltaje fraccional de un colorante, ΔG es el cambio en energía asociado con el cambio en longitud de onda, q es la carga efectiva transferida, r es la distancia que viaja esa cantidad q , E es el campo eléctrico y θ es el ángulo entre el vector r y el vector E . Además se confirmó ese hallazgo teórico habiéndose sintetizado 10 VF y establecido que todos ellos mostraron el incremento esperado de aproximadamente el 19% en el rendimiento. Ese desarrollo sinérgico de la teoría y el experimento permitió la estimación computacional y teórica de la orientación del colorante VF en bicapas lipídicas y propuso la estructura de un colorante con sensibilidad de voltaje mejorada sobre otras estructuras conocidas de la familia de los VF basado en PeT. Finalmente se utilizó este nuevo indicador de voltaje para monitorear los picos de voltaje en las neuronas del hipocampo de rata y las neuronas dopaminérgicas derivadas de células madre pluripotentes

humanas.

En el trabajo de Zhang et. al. [14] se diseñó, sintetizó y caracterizó una serie de colorantes fluorescentes en el infrarrojo cercano (NIR), que muestran excelentes propiedades fotofísicas, incluidos grandes desplazamientos de Stokes, altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, buena fotoestabilidad y baja citotoxicidad. Se diseñó un nuevo sensor para Hg^{2+} basado en los colorantes NIR para verificar la aplicabilidad práctica de estos CSVs. Se realizaron cálculos de la teoría funcional de densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) para los colorantes RA1-4, RB1-4 usando el programa Gaussian 09 con el funcional y base B3LYP / 6-31G para obtener cálculos teóricos de emisión y absorción, como así también comprender el mecanismo detrás de las propiedades de fluorescencia mejoradas de estos colorantes. Los cálculos de los compuestos RA1-4, RB1-4 se realizaron para la transición HOMO-LUMO usando geometrías optimizadas del estado fundamental S_0 y el primer estado excitado S_1 . Se confirmó la potencialidad de estos colorantes por medidas de fluorescencia en células vivas.

1.4 Indocianina Verde

El colorante indocianina verde (ICG, por sus siglas en inglés), cuya estructura molecular se esquematiza en la Figura 1.4, es una tricarbocianina fluorescente, molécula anfifílica, que presenta características que lo hacen ser un colorante promisorio para medir potenciales de acción en membranas biológicas.

El ICG puede sufrir cambios en su fluorescencia en respuesta a modificaciones en el potencial de membrana en el régimen de submilisegundos. Estudios experimentales sobre este colorante han demostrado que presenta una respuesta aproximadamente lineal al potencial de membrana y que puede detectar con precisión potenciales de acción a velocidades de disparo comunes en las neuronas de mamíferos y medir actividad eléctrica en cardiomiocitos. Presenta una robustez que le permite ser usada para medir el voltaje en muchos ambientes y tejidos [15].

El ICG es el único colorante aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (Food and Drugs Administration, FDA) [16] para uso clínico como un agente de contraste administrado intravenosamente. Se ha utilizado en angiografía oftálmica, en pruebas de gasto cardíaco y función hepática, y además, su

fluorescencia se utiliza como guía en una serie de aplicaciones quirúrgicas. Además, gracias a que se ha utilizado en pacientes por más de 50 años, se sabe que tiene baja toxicidad [15].

Es un colorante que se excita electrónicamente con longitudes de onda en la región del infrarrojo 780 nm y su emisión se encuentra a 818-873 nm. La longitud de onda larga permite sensor actividad eléctrica transdermalmente hasta 2 cm de profundidad debido a que la dispersión de la luz que limita la profundidad de la penetración óptica, depende de la cuarta potencia inversa de la longitud de onda. La excitación y emisión de ICG está más desplazada al infrarrojo que los demás CSVs descritos con actividad óptica en el infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés). Esto representa una potencialidad para generar imágenes de actividad eléctrica con mayor profundidad de lo que se obtiene actualmente. La ICG marcando células excitables, puede visualizarse transdermalmente con alta resolución espacial [15].

Estas características proveen en un buen motivo para estudiar la fisicoquímica que subyace a la respuesta óptica de ICG a cambios en el potencial de membrana.

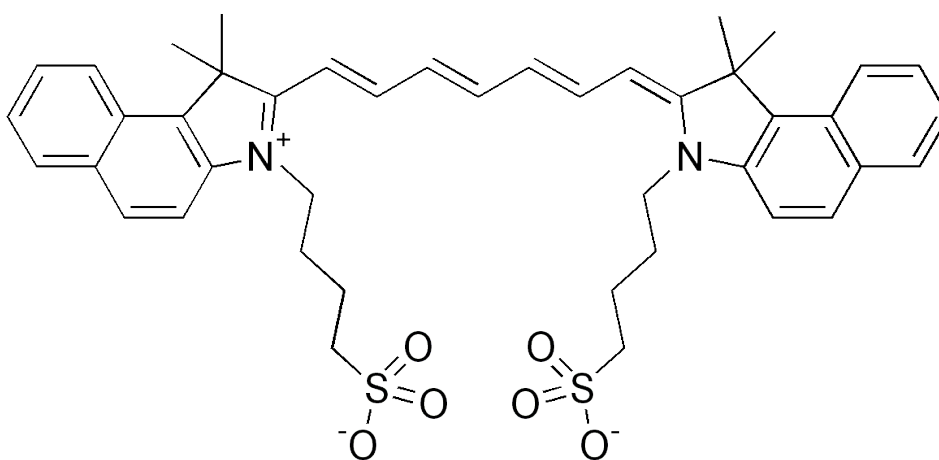


Figura 1.4: Estructura molecular del ICG. Molécula Fluorescente que presenta excitación y relajación electrónica en el infrarrojo cercano.

Objetivos

La creciente incidencia de enfermedades neurodegenerativas, consecuencia del aumento de la expectativa de vida, motiva la necesidad de contar con métodos de diagnóstico con mayor resolución espacio-temporal. De esta manera, se plantea el desafío de mejorar los métodos convencionales de determinación de actividad eléctrica a nivel fisiológico e *in vitro*.

Los métodos ópticos de medición surgen como una alternativa a los métodos clásicos electrofisiológicos. En los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo en diseñar y sintetizar nuevas moléculas que sean sensibles al voltaje y en diseñar la instrumentación para imágenes de voltaje. Para una síntesis efectiva y un diagnóstico eficiente es crucial dilucidar la fisicoquímica que está involucrada en la respuesta óptica de los colorantes sensibles al voltaje a cambios en el potencial transmembrana.

La presente tesis abordó el modelado, construcción y análisis de un colorante sensible al voltaje, ICG, embebido en una membrana lipídica en dos sistemas con diferente polarización. Como objetivo general se buscó relacionar los cambios en la respuesta óptica de ICG con cambios en el potencial transmembrana, estudiando los determinantes moleculares que implican la respuesta diferencial. Se buscó deconvulcionar las contribuciones configuracionales del efecto electrocrómico en la respuesta óptica.

Objetivos específicos

1. Parametrizar un campo de fuerza atómico para la sonda ICG y equilibrar sistemas de membranas modelo polarizadas con la sonda integrada en la interfase para un sistema sin polarización y otro sistema con polarización a través de la membrana.

2. Calcular perfiles de energía libre de transferencia a bicapas lipídicas modelo.

3. Simular los espectros de absorción de ICG en membranas de diferente polaridad. Para este último objetivo se validarán los resultados evaluando, si el espectro de absorción de ICG en el sistema polarizado presenta un corrimiento de la longitud de onda de absorción (λ_{abs}) respecto de la λ_{abs} del sistema sin polarización, hacia longitudes de onda superiores y del orden del presentado en estudios experimentales [17].

Capítulo 2

Marco teórico

2.1 Simulaciones computacionales

Los avances rápidos y continuos de desarrollo de hardware en informática durante los últimos 60 años, así como el aumento en la cantidad de cálculos que un ordenador realiza por segundo y en la capacidad de almacenamiento, han hecho posible llevar a cabo análisis de modelos que describen sistemas de muchas partículas, por ejemplo sistemas en fase líquida. Esto ha contribuido a resolver el problema de no poder determinarse analíticamente ciertos cálculos para un sistema de muchas partículas interactuantes debido a la complejidad matemática de los mismos. Las simulaciones computacionales resuelven numéricamente las ecuaciones que modelan el sistema creado utilizando aproximaciones intermoleculares derivadas de la teoría y logran obtener ciertas propiedades del sistema. Si bien los modelos se utilizan para explicar el comportamiento del sistema y determinar sus propiedades microscópicas, estas últimas deben compararse con datos experimentales de propiedades macroscópicas para ser validadas [18].

Las simulaciones computacionales se encuentran junto al experimento y la teoría como una tercera herramienta para abordar un problema y tienen un papel valioso ya que proporcionan resultados relativamente exactos que de otro modo solo serían solucionados por métodos aproximados, o podrían ser intratables [18].

2.1.1 Descripción matemática de un sistema molecular en simulaciones computacionales

Para llevar a cabo simulaciones computacionales de un sistema molecular se debe ser capaz de definir una función de energía potencial (V) que describa las interacciones intra e intermoleculares del sistema. Esta ecuación puede provenir del formalismo de la química cuántica (QM, por sus siglas en inglés) o de la mecánica molecular (MM). Además, debido a que el estado microscópico de un sistema puede ser especificado en términos de las posiciones y los momentos de un set de partículas, ya sean átomos o moléculas, se puede escribir la energía total del sistema (H) como la suma de las funciones de energía cinética (K) y energía potencial (V) de las N partículas que componen el sistema.

Las energías mencionadas dependen del conjunto de coordenadas q_i y momentos p_i de cada partícula presente. Adoptando una notación condensada:

$$q = (q_1, q_2, \dots, q_N)$$

$$p = (p_1, p_2, \dots, p_N)$$

la energía total H es:

$$H(q, p) = K(p) + V(q) \quad (2)$$

Para un sistema atómico simple, la energía cinética K toma la forma

$$K = \sum_{i=1}^N \sum_{\alpha} \frac{p_{i\alpha}^2}{2m_i} \quad (3)$$

donde m_i es la masa molecular, y el índice α corre sobre los diferentes componentes (x, y, z) del momento del átomo i .

Una vez especificada la función de energía potencial (V) es posible construir, a partir de H , una ecuación de movimiento que gobierna toda la evolución temporal del sistema y describe todas sus propiedades mecánicas. La solución de esta ecuación generalmente se utiliza para calcular, a partir de V , las fuerzas f_i y los torques τ_i que actúan sobre las moléculas.

Por lo general, H (o V) es la entrada básica a un programa de simulación por computadora. El enfoque utilizado casi universalmente en la simulación por computadora separa V en términos que involucren interacciones de pares, tripletes, etc. [18].

2.1.2 Métodos *ab initio*

Los métodos *ab initio* se utilizan para obtener la estructura electrónica de un sistema mecanocuántico. Este método utiliza el hamiltoniano molecular verdadero y no hace uso de datos empíricos en el cálculo.

La estructura electrónica de un estado k , se obtiene definiendo una función de onda (Ψ_k), que depende de las coordenadas de todas las partículas del sistema. La resolución de Ψ_k utiliza la aproximación de Born- Oppenheimer la cual toma a los núcleos de los átomos en posiciones fijas, generando una configuración específica.

Para obtener Ψ_k se debe resolver la ecuación de Schrödinger estableciendo una configuración nuclear fija $R^{(N)}$ a un instante t determinado (independiente del tiempo). Sean Ψ_k las autofunciones del operador H_e y sean E_k los respectivos autovalores, la ecuación resultante es :[18,19]

$$H_e(r^{(n)}, R^{(N)})\Psi_k(r^{(n)}, R^{(N)})=E_k(R^{(N)})\Psi_k(r^{(n)}, R^{(N)}) \quad (4)$$

donde, H_e es el hamiltoniano del sistema en estudio, Ψ_k es la función de onda para los núcleos y los electrones en el estado k , $r^{(n)}$ es el conjunto completo de posiciones de los n electrones, y $R^{(N)}$ es el conjunto completo para las posiciones de los N núcleos. Esta función se encuentra separada en dos términos, una parte dependiendo de los electrones, y otra parte correspondiente a los núcleos [18,19].

Luego si tomamos la aproximación de Born-Huang se puede expresar la función de onda total Φ como una expansión de las autofunciones Ψ_k y coeficientes χ_l dependientes del tiempo:

$$\Phi(r^{(n)}, R^{(N)}; t)=\sum_{l=0}^{\infty}\Psi_l(r^{(n)}, R^{(N)})\chi_l(r^{(n)}, R^{(N)}) \quad (5)$$

donde las funciones χ_l son tiempo dependientes.

Ahora si se coloca a Φ en la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo, [Ec. 6] se obtiene la dinámica del sistema mecanocuántico, es decir, como cambia la estructura electrónica en el tiempo

$$i\hbar\frac{\partial\Phi(r^{(n)}, R^{(N)}; t)}{\partial t}=\hat{H}\Phi(r^{(n)}, R^{(N)}; t) \quad (6)$$

donde el operador hamiltoniano (\hat{H}) se define como:

$$\hat{H} = -\sum_{I=1}^N \frac{\hbar^2}{2M_I} \nabla_I^2 - \sum_{i=1}^n \frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_i^2 + \hat{V}_{n-e}(r^{(n)}, R^{(N)}) = -\sum_{I=1}^N \frac{\hbar^2}{2M_I} \nabla_I^2 + \hat{H}_e(r^{(n)}, R^{(N)}) \quad (7)$$

con V_{n-e} siendo la suma de todas las interacciones coulombianas (núcleo-núcleo, electrones-electrones y núcleo-electrones), m_e es la masa del electrón, M_I la masa del núcleo I , \hbar es la constante de planck reducida y \hat{H}_e es el hamiltoniano para el subsistema electrónico [18].

El método de Hartree-Fock obtiene la función de onda molecular Ψ_k por medio de una función ψ antisimetrizada que es producto de una función variacional de prueba f_p con la función antisimétrica de spin f_s y se busca que Ψ minimize la integral variacional $\int \Psi_k^* \hat{H} \Psi_k d\tau$.

Ψ_k se define como:

$$\Psi_k = \sum_i c_i \psi_i \quad (8)$$

donde c_i es el set de coeficientes que minimizan la integral variacional y determina el valor de Ψ , mientras que ψ_i son las funciones de onda base u orbitales atómicos.

El método de interacción de configuraciones (CI), mejora la función de onda de Hartree-Fock usando un conjunto de “funciones de configuración” que difieren del conjunto ψ_i en que tiene en cuenta todas las asignaciones posibles de los electrones a los orbitales disponibles, tanto del estado fundamental como excitados no ocupados.

Si bien el nivel de exactitud en el comportamiento del sistema en los métodos *ab initio* es máximo, presentan la desventaja de limitar el tamaño del sistema y no poder llevarse a cabo en moléculas grandes, de lo contrario, el tiempo de simulación crecería enormemente. Es por eso que el desarrollo de esta metodología no desplazó a la dinámica molecular clásica basada en potenciales empíricos [19].

Al resolver la ecuación de Schrödinger se pueden obtener propiedades moleculares como la geometría molecular, momentos dipolares, energía de los estados excitados, entre otras.

2.1.3 Teoría del funcional de la densidad y método de Kohn-Sham

La teoría del funcional de la densidad (DFT) es un método utilizado para calcular estructura electrónica que trabaja con el funcional de la densidad electrónica de la molécula en

lugar de la función de onda como lo hacen los métodos *ab initio*. Esto le confiere un menor requerimiento de cómputo y accesibilidad a sistemas mucho más complejos. DFT emplea un funcional, F_{HK} , que define la densidad electrónica de la configuración del estado fundamental, $\rho_0(r)$:

$$F_{HK}[\rho_0] = \langle \Psi_0[\rho_0] | H_e | \Psi_0[\rho] \rangle \quad (9)$$

donde $H'_e = K[\rho] + V_{ee}[\rho]$, K es el operador de energía cinética electrónico y V_{ee} es el potencial que define las interacciones entre electrones. Debido a la carga positiva en los núcleos se genera un potencial externo (V_{ext}) que actúa sobre los electrones. Por lo tanto la energía del estado fundamental se define como:

$$E[\rho_0] = F_{HK}[\rho_0] + \int V_{ext}(r) \rho_0(r^{(n)}, R^{(N)}) dr \quad (10)$$

DFT se sustenta de dos teoremas demostrados por Hohenberg- Khon [18].

- El primero establece que existe un único funcional para el estado fundamental $\rho_0(r)$ de un sistema de n partículas;
- El segundo establece que el funcional de energía $E[p]$ es mínimo en el estado fundamental ρ_0 .

El método de Khon-Sham es un enfoque que se desarrolla con el fin de encontrar un funcional F_{HK} universal. Este método hace uso de la aproximación de que los electrones no están interactuando entre sí. Por lo tanto, la energía de este sistema no interactuante se define como $E_s = K_s + \int V_s \rho_s dr$, donde el subíndice s significa electrones no interactuantes. V_s es un potencial local tal que hace a la densidad del estado fundamental del sistema en interacción, ρ_0 , igual a ρ_s .

Si el estado fundamental de los sistemas que no interactúan se degenera individualmente, se obtiene:

$$\rho_0(r) = \sum_{i=1}^{occ} f_i |\psi_i(r)|^2 \quad (11)$$

donde la sumatoria contabiliza sobre los orbitales ocupados (occ) y f_i es el número de ocupación del orbital (0, 1 ó 2). Los orbitales individuales $\psi_i(r)$ pueden obtenerse a partir de la ecuación de Schrödinger:

$$\hat{H}_{KS}\psi_i = \left[-\frac{\hbar^2}{2m_e}\nabla^2 + \hat{V}_S\right]\psi_i = \epsilon_i\psi_i \quad (12)$$

Así la energía total de Khon-Sham para un sistema interactuante se define por:

$$E_{KS} = \hat{K}_S[\rho] + \int dr \hat{V}_{ext}(r)\rho_0(r) + \frac{1}{2} \int \int dr dr' \frac{\rho_0(r)\rho_0(r')}{|r-r'|} + E_{xc}[\rho_0] \quad (13)$$

donde el primer término corresponde a la energía cinética del sistema de electrones no interactuantes, el segundo representa la energía de los electrones al estar bajo la influencia del campo externo generado por los núcleos, (este V_{ext} también incluye la interacción coulombiana entre los mismos núcleos), el tercer término es la energía potencial de repulsión entre electrones (aclarado aparte, $4\pi\epsilon_0=1$ por simplicidad). E_{xc} comprende el error de considerar energía cinética no interactuante y de tratar las interacciones interelectrónicas de forma clásica.

E_{xc} se denomina energía de correlación-intercambio. Como no es posible conocer E_{xc} con exactitud, es necesario plantear una aproximación. Una primera aproximación se denomina aproximación de densidad local (LDA) en la cual se integra sobre un término $\epsilon_{xc}[\rho_0(r)]$ que es la suma de un término de intercambio de un gas de electrones homogéneo. Una mejora a esa aproximación es calcular E_{xc} mediante las aproximaciones de gradiente generalizado (GGA por sus siglas en inglés), construidas a partir de funcionales f_{xc} de la densidad local $\rho_0(r)$ y su gradiente [18]:

$$E_{xc}^{GGA}[\rho_0(r)] \approx \int dr f_{xc}[\rho_0(r), \nabla\rho_0(r)] \quad (14)$$

Finalmente un enfoque simple para calcular la energía del estado fundamental para una configuración nuclear dada sería la siguiente:

1. Seleccionar un $\rho_0(r)$ de prueba y calcular V_S ;
2. Resolver las ecuaciones de Schrödinger para los orbitales individuales i a partir de la ecuación (12):
3. Calcular nuevamente $\rho_0(r)$ mediante la Ec. 9;
4. Iterar el proceso con el nuevo valor de $\rho_0(r)$ hasta llegar a la convergencia y calcular la energía del estado fundamental a partir de la ecuación (13) [18].

2.1.4 Métodos empíricos

El método de mecánica molecular (MM) es un método empírico que no usa el operador hamiltoniano ni una función de onda para describir electrónicamente el sistema. Por el contrario el sistema se visualiza como un conjunto de átomos a los cuales se les otorga una masa y posiciones en el espacio cartesiano y se describen las interacciones de los átomos tanto enlazantes como no enlazantes. La expresión matemática que contiene las descripciones de estas interacciones junto con los parámetros que las describen conforman el llamado campo de fuerza empírico. [19]

Campos de fuerza

Un campo de fuerza es una función utilizada para describir la energía potencial intra e intermolecular de una colección de átomos y los parámetros que determinan la energía de una determinada configuración. Es una expresión empírica debido a la necesidad de definir parámetros geométricos de equilibrio (distancias, ángulos) y constantes de fuerzas para los diferentes potenciales. Los parámetros utilizados se obtienen a partir de datos experimentales [18,19].

Los campos de fuerza representan la energía potencial del sistema de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} V = & \sum_{\text{enlaces}} \frac{1}{2} k_r (r_{ij} - r_o)^2 \\ & + \sum_{\text{ángulos}} \frac{1}{2} k_\theta (\theta_{ijk} - \theta_o)^2 \\ & + \sum_{\text{torsiones}} \sum_n k_{\phi,n} [\cos(n\phi_{ijkl} + \delta_n) + 1] \\ & + \sum_{\text{pares no enlazantes}} \left[\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} + \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right] \end{aligned} \quad (15)$$

El primer término representa la suma de los enlaces covalentes entre los átomos mediante una expresión tipo oscilador armónico, donde k_r es la constante de fuerza de tensión de enlace, r_o es la longitud de enlace de equilibrio y r_{ij} es la distancia entre los átomos i y j .

El segundo término contiene cambios de energía asociados con los movimientos de flexión, se constituye de la suma sobre todos los ángulos de enlace y generalmente tiene una forma tipo

oscilador armónico. El parámetro k_θ es la constante de fuerza de flexión, θ_{ijk} representa el ángulo formado entre los tres átomos i, j, k y θ_0 es el ángulo de equilibrio para los mismo átomos.

El tercer término es una serie de Fourier (ver Figura 2.1) constituida por los cambios de energía asociados con los movimientos de torsión, estos movimientos se definen por conjunto de cuatro átomos $ijkl$ conectados. El parámetro ϕ_{ijkl} es el ángulo de torsión formado por los cuatro átomos. El valor n , es la multiplicidad (es decir, el número de mínimos en una rotación de 2π alrededor del enlace $j-k$); muchos campos de fuerza fijan $n = 3$, la Figura 2.2 ejemplifica este término.

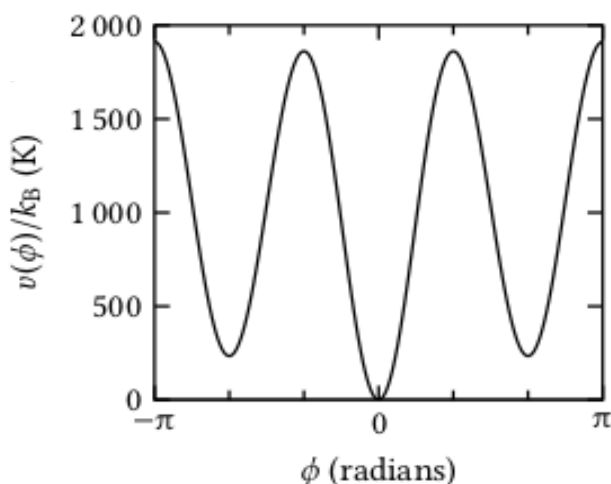


Figura 2.1: Perfil de energía potencial asociada a los movimientos de torsión [18].

El cuarto término es una suma sobre las interacciones de no enlace. Describe las interacciones electrostáticas descritas mediante un potencial de Coulomb entre las cargas atómicas q_i (y q_j) y las fuerzas de dispersión de London descritas mediante un potencial de Lennard- Jones, (ver figura 2.3). Este término excluye las interacciones entre los pares 1-2 y 1-3 en la misma molécula. Algunos campos de fuerza incluyen una interacción entre los pares 1-4. Los parámetros $A_{ij} = (4\epsilon\sigma_{ij})^{12}$ y $B_{ij} = (4\epsilon\sigma_{ij})^6$ son los parámetros de este potencial. Donde ϵ es la profundidad del potencial y σ es el valor de r que hace al potencial $v^{LJ}(r)=0$.

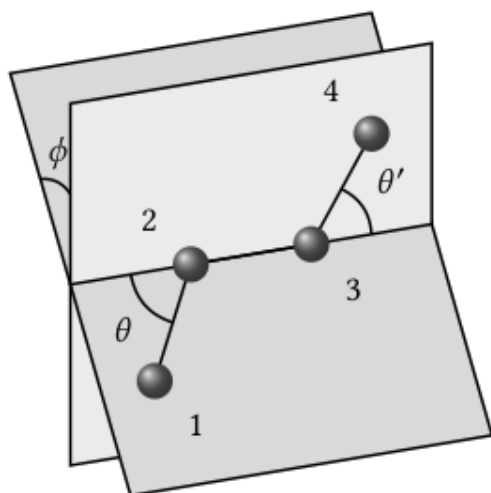


Figura 2.2: Representación gráfica de los parámetros definidos en los términos de flexión y torsión del campo de fuerza. 1,2,3 y 4 son los átomos $ijkl$. Los ángulos θ y θ' son de flexión y ϕ es el ángulo de torsión.[18]

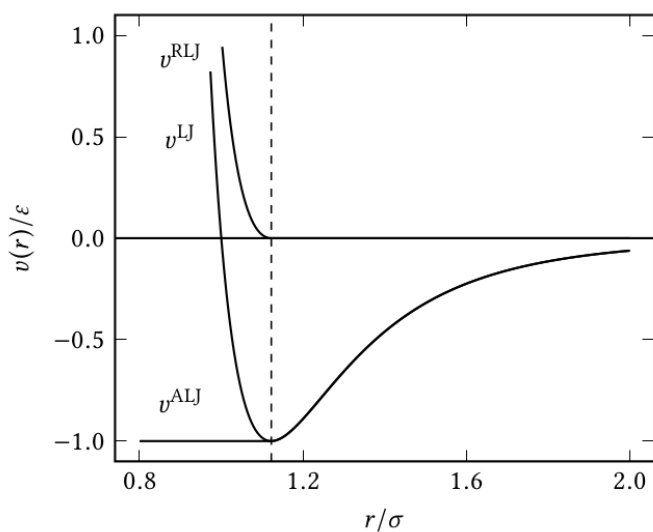


Figura 2.3: Comportamiento de las fuerzas de atracción v^{ALJ} y repulsión v^{RLJ} entre dos átomos representado por un Potencial de Lennard-Jones v^{LJ} [18].

El potencial específico usado para cada término de la ecuación (15), varía para los diferentes campos de fuerza. Algunos de los cambios más comunes que pueden sufrir son: el potencial armónico puede ser reemplazado por una forma funcional más realista, como el potencial Morse; los enlaces pueden ser fijados a sus valores de equilibrio; se pueden incluir ángulos dihedros impropios que se utilizan para imponer planaridad y el término de repulsión

de Lennard- Jones r_{ij}^{-12} se suele reemplazar por r_{ij}^{-9} .

Los campos de fuerza tienen niveles de descripción. Los “campos de fuerza atomísticos” proporcionan parámetros para cada átomo en un sistema, mientras que el denominado “campo de fuerza de átomos unidos” no parametriza los átomos de hidrógeno de los grupo metilo terminal y puente metileno, los incluye con el carbono tomando estos grupos como una sola partícula de masa 14 uma o 15 uma respectivamente [18].

2.2 Métodos de muestreo

Las técnicas de muestreo más célebres utilizadas al resolver un sistema de N partículas que interactúan a través de un potencial V como el de la ecuación (15) son dinámica molecular (DM) y el método de Monte Carlo. Este último se basa en la mecánica estadística y genera configuraciones representativas de las distribución de Boltzman, sin reproducir la dinámica del sistema. Monte Carlo utiliza un método estocástico, el de Metrópolis, para generar el muestreo [18].

2.2.1 Dinámica molecular

El método de simulaciones de dinámica molecular es una técnica computacional que se fundamenta en la resolución de las ecuaciones clásicas de movimiento de un sistema de N partículas (atómicas o subatómicas, según el formalismo usado) que interactúan a través de una energía potencial.

$$\frac{dr_i}{dt} = dv_i \quad (16)$$

$$\frac{dv_i}{dt} = \frac{f_i}{m_i} \quad (17)$$

donde t es el tiempo, f_i es la fuerza en la partícula, r_i la posición, v_i la velocidad y m_i la masa de la partícula i definida por $i= 1,2,\dots, N$. Estas ecuaciones también se aplican al movimiento del centro de masa de una molécula, donde f_i representa la fuerza total sobre la molécula i .

La f_i se calcula como el gradiente de la función energía del sistema:

$$f_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i} \quad (18)$$

donde V es el campo de fuerza. En lugar de V puede usarse el hamiltoniano cuántico, dependiendo del método [20].

Una vez obtenida f_i , se integra temporalmente dos veces a modo de obtener la evolución de velocidad y la posición de las partículas y producen la trayectoria del sistema. Al obtener la trayectoria de la simulación (posiciones y momentos de las partículas con evolución en el tiempo), estos datos son usados para describir propiedades microscópicas del sistema, siempre y cuando esta propiedad a medir pueda ser expresada en función de alguna de las cantidades mencionadas.

Uno de los métodos numéricos más utilizados por la dinámica molecular para integrar numéricamente este sistema de ecuaciones es el algoritmo de Verlet [18].

Algoritmo de Verlet

El algoritmo de Verlet es un método estándar, simple en su forma y fácil de programar, para la solución de las ecuaciones clásicas de movimiento [Ecs. (16) y (17)]. Este algoritmo utiliza un paso intermedio $\frac{1}{2} dt$ para calcular la velocidad. A partir de esta velocidad, obtiene la posición a un tiempo $t + dt$ y después de esto, realiza una evaluación de la fuerza para dar una aceleración $a(t + dt)$ para el último paso, ecuación (21), que completa la evolución de las velocidades [20].

$$v\left(t + \frac{1}{2} dt\right) = v(t) + \frac{1}{2} dt \cdot a(t) \quad (19)$$

$$r(t + dt) = r(t) + dt \cdot v\left(t + \frac{1}{2} dt\right) \quad (20)$$

$$v(t + dt) = v\left(t + \frac{1}{2} dt\right) + \frac{1}{2} dt \cdot a(t + dt) \quad (21)$$

2.3 Métodos de muestreo aumentado para la determinación de energías libres de partición

La energía libre es el potencial termodinámico de mayor importancia en sistemas donde las partículas alcanzan el equilibrio térmico mediante la interacción entre ellas. Un análisis

imprescindible a la hora de obtener información sobre las interacciones biomoleculares es el cálculo de la energía libre de partición de moléculas hidrofóbicas en membranas. Una manera de llevar a cabo esta determinación es por medio de la obtención del potencial de fuerza media (PMF) a través de simulaciones moleculares. El PMF es una aproximación a la energía libre que se obtiene midiendo el trabajo reversible intercambiado para llevar la molécula desde la solución hasta su localización termodinámicamente más probable en el seno de la membrana. El cálculo de PMF se lleva a cabo definiendo una variable colectiva (ξ).

El PMF se relaciona con el perfil de probabilidad $p_D(\xi)$ por medio de la relación de Boltzmann:

$$p_D(\xi) = e^{\frac{-PMF(\xi)}{RT}} \quad (22)$$

Umbrella sampling es un método de muestreo aumentado utilizado para calcular el PMF como una aproximación a la energía libre de un proceso. Este método toma el hamiltoniano del sistema y le agrega términos armónicos para restringir al sistema en valores discretos ξ_i de la variable colectiva. De este modo se obtiene un valor sesgado de la energía del sistema V' :

$$V'(\xi) = V + \sum_i \frac{1}{2} k_{vr} (\xi - \xi_i)^2 \quad (23)$$

donde k_{vr} es la constante armónica y ξ_i son los valores de variable colectiva a los cuales se restringe el sistema.

Los potenciales de restricción se imponen a una molécula de interés para limitarla a un lugar definido a lo largo de la variable colectiva ξ . Esto permite el muestreo del espacio de las fases en regiones que no son accesibles a la molécula, debido a la presencia de barreras energéticas mayores a la energía térmica (RT). Estas barreras obstruyen el muestreo homogéneo.

En la práctica, se efectúan simulaciones en paralelo para cada valor de ξ_i , denominadas ventanas, y se obtienen las distribuciones de probabilidad sesgada $p'_D(\xi)$ para cada una de ellas. La condición de convergencia es que dichas distribuciones presenten considerable superposición entre sus extremos, de modo tal de emular una distribución de probabilidad $p'_D(\xi)$ continua. El método de análisis de histogramas ponderados (WHAM) permite recuperar $p_D(\xi)$ sin sesgo y obtener el PMF a partir de la ecuación (22) [21].

2.4 Métodos de cálculo de propiedades ópticas en fase condensada

El cálculo de propiedades ópticas de estados excitados de un sistema molecular, requiere la resolución de la ecuación de Schrodinger dependiente del tiempo, [Ec. (6)], donde el estado de menor energía corresponde al estado basal de la molécula y el resto de los estados obtenidos son sus estados excitados. Este cálculo permite describir procesos de redistribución de la estructura electrónica tales como polarización o transferencia de carga.

El método de la teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) permite llevar a cabo el cálculo de estados excitados basándose en la propagación temporal del funcional de la densidad electrónica de una molécula, luego de la aplicación de una perturbación inicial, a través de la resolución temporal de las ecuaciones de Kohn-Sham.

Los métodos de mecánica cuántica (QM) son prohibitivos para moléculas en fase condensada, por lo que se utilizan potenciales híbridos de mecánica molecular y mecánica cuántica (QM/MM) para modelar la estructura del sistema [18].

El tratamiento mediante estos potenciales híbridos implica la división del sistema en dos subsistemas: la región excitable, compuesta por la molécula, que es tratada a través de métodos de estructura electrónica (QM), y el entorno cuya descripción es a nivel MM.

Las interacciones de la molécula con átomos del entorno se incorporan explícitamente utilizando un enfoque multiescala aditivo en el cual la energía total (\hat{H}_T) se construye con una suma de tres términos: un término clásico puro, un término cuántico puro y un término de acoplamiento [22].

$$\hat{H}_T = \hat{H}_{QM} + \hat{H}_{MM} + \hat{H}_{QM/MM} \quad (24)$$

En el caso de que la frontera entre ambos subsistemas no atraviese enlaces químicos, el término de acoplamiento sólo presenta términos no enlazantes tales como las interacciones coulómbicas entre la densidad electrónica y las cargas puntuales clásicas, además de los términos de dispersión que evitan que el entorno clásico colapse sobre el subsistema cuántico.

Capítulo 3

Metodología

3.1 Sistema de estudio

Se llevó a cabo el armado de una caja de simulación comprendida por dos bicapas lipídicas separadas por dos compartimientos acuosos. Las bicapas se constituyeron de 256 moléculas de palmitoilfosfatidilcolina (POPC), un fosfolípido neutro, repartidos equitativamente formando dos bicapas lipídicas de 128 fosfolípidos cada una con 64 fosfolípidos en cada hemicapa. Los dos compartimientos acuosos suman un total de 17129 moléculas de agua. Iones de la sal NaCl fueron agregados a la solución acuosa por medio de la herramienta *genion* de GROMACS (herramienta que permite configurar la concentración de los iones que se requiere y definir si se solicita neutralidad en el sistema), a fines de alcanzar una concentración fisiológica salina de 0,15 M en ambos compartimientos. Los compartimientos acuosos contenían aproximadamente 6 nm de espesor cada uno. La Figura 3.1 permite visualizar el sistema, la molécula de ICG el colorante que se desea estudiar se encuentra en el seno del compartimiento acuoso exterior. Este compartimiento se denomina de esta manera con el propósito de recordar que el exterior celular tiene carga neta positiva

3.1.1 Modelo molecular del colorante

Las coordenadas de la molécula de colorante fueron obtenidas utilizando el editor molecular Avogadro. La optimización de geometría se efectuó utilizando el paquete de cálculo de estructura electrónica Gaussian 09 utilizando DFT con el funcional B3LYP y la base 6-31G** [22]. Se obtuvo un set de cargas parciales a través del método de ajuste de la superficie electrostática (ESP de su sigla en inglés) utilizando el mismo nivel de teoría. Los demás parámetros del campo de fuerza para potenciales de enlace, flexión angular, torsiones y

potenciales de Lennard Jones para la parte dispersiva, fueron obtenidos por homología con moléculas disponibles en la base de datos del campo de fuerza GROMOS versión G54a7 [23]. Esto se efectuó utilizando el servidor Automated Topology Builder (ATB) [24].

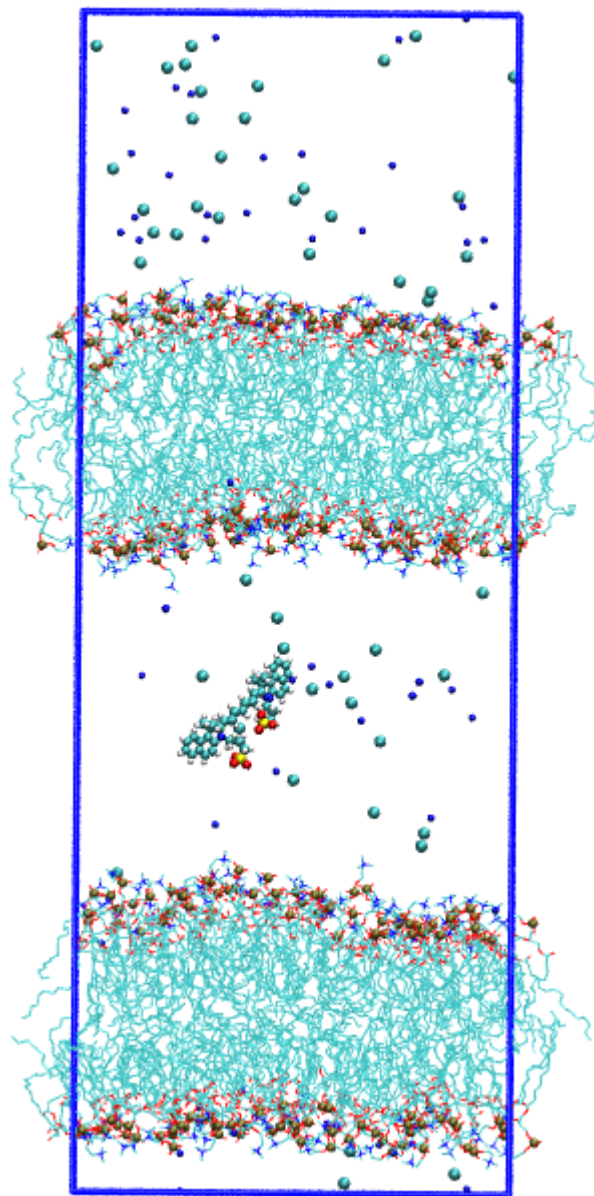


Figura 3.1: Caja de simulación utilizada para llevar a cabo las simulaciones de dinámica molecular. Se excluyeron las moléculas de agua para facilitar la visualización. Los lípidos de las membranas se representan en líneas con código atómico de colores: C en celeste, O en rojo, N en azul y P de la interfaz en esferas ocre. La ICG se halla representada en esferas con el mismo código atómico de colores (S en amarillo e H en blanco). Las esferas celestes y grandes en el espacio acuoso representaron los iones Cl^- y las esferas azules y pequeñas a los iones Na^+ .

Se eligió el campo de fuerza GROMOS ya que permite combinar una descripción de átomos unidos del entorno del colorante con la descripción atomística del ICG. Este campo de fuerza ha sido diseñado en base a la reproducción de energías libres de hidratación experimentales.

3.2 Generación del potencial transmembrana

Se prepararon dos sistemas de la manera descrita en la sección 3.1. La única diferencia entre ellos es la cantidad de iones sodio Na^+ respecto de iones cloruro Cl^- presentes en cada uno de los compartimientos acuosos del sistema. Si bien la totalidad de Na^+ repartidos en ambas soluciones acuosas (interna más externa) es 49 y la totalidad de iones Cl^- es 48, ya que se debe considerar la carga negativa que porta el colorante para alcanzar la neutralidad del sistema, la distribución de estos iones fue distinta para los dos sistemas en estudio.

Uno de los sistemas se compuso por 17 Cl^- con 18 Na^+ en el compartimiento exterior y por 31 Na^+ y 31 Cl^- en el interior. El colorante, con carga neta de -1, se localizó en el compartimiento exterior. Esa distribución de iones resultó en la ausencia de carga en ambos compartimientos, y por lo tanto, de diferencia de potencial a través de la membrana. A este sistema se lo llamó “0V”. El otro sistema, en cambio, se compuso por 17 Cl^- junto con el colorante de carga neta de -1 (lo que suma un total de 18 cargas negativas) y 22 Na^+ en la solución exterior y por 27 Na^+ y 31 Cl^- en la solución interior. Por lo tanto, se presentó un desbalance iónico de 8 cargas a través de la membrana, +4 en el compartimiento interior y -4 en el compartimiento exterior. Esta separación de cargas genera una diferencia de energía potencial eléctrica a través de la membrana que se denomina *potencial transmembrana*.

Si bien la carga neta dentro de cada compartimiento acuoso fue de +4 ó -4, esa carga se repartió dentro del compartimiento e influenció la mitad de la misma en cada bicapa que limitaba esa solución acuosa. Por lo tanto, cada bicapa recibió un aporte de +2 por un lado y -2 por el otro lado, provenientes de las soluciones acuosas. La Figura 3.2 esquematiza la distribución de las cargas.

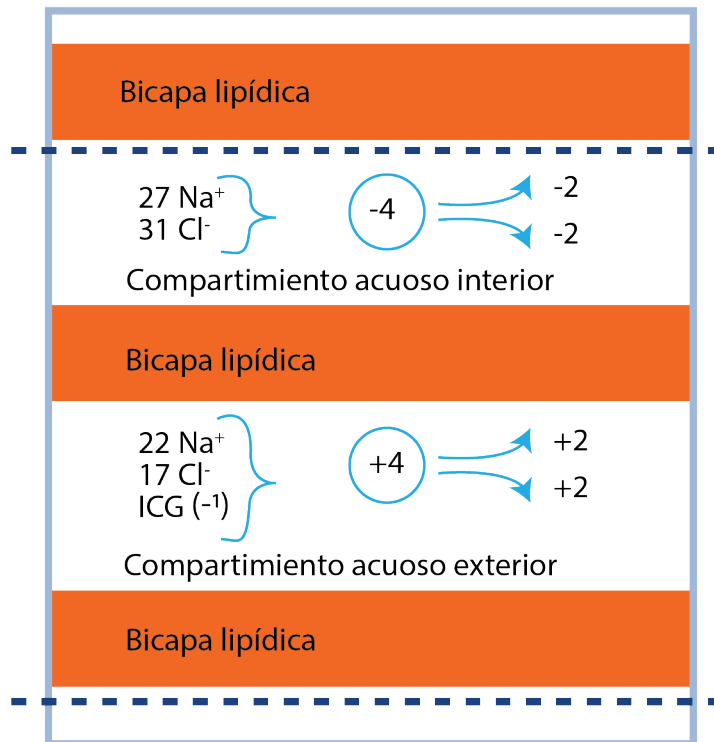


Figura 3.2: Distribución de carga sobre las bicapas lipídicas. Las líneas punteadas representan los límites de la caja de simulación que definen la periodicidad.

Con la distribución iónica obtenida se pudo conceptualizar a la membrana como un capacitor ideal, representado el mismo en la Figura 3.3. Para esta conceptualización, las soluciones acuosas representaron las placas conductoras y la membrana el material dieléctrico entre las placas, esta definición permitió obtener el voltaje a través de la bicapa lipídica utilizando la ecuación para calcular diferencia de potencial en un capacitor ideal:

$$V_c = \frac{1}{\epsilon_0} \cdot \frac{Qd}{A} \quad (25)$$

donde Q es la carga total de cada placa, A es el área de las placas y d es la distancia entre las ellas. El sistema polarizado presenta los valores $Q = 2$, $d = 2,25$ nm y el área promedio $A = 47,61$ nm² que reemplazados en la ecuación (25) arrojan una diferencia de potencial de 1,7 V.

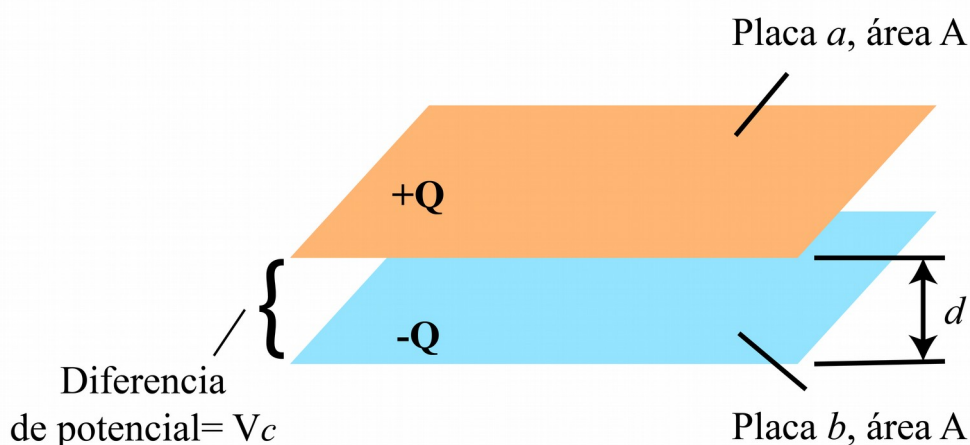


Figura 3.3: Capacitor ideal compuesto por dos capas paralelas conductoras separadas por un material dieléctrico.

Finalmente por medio de la manera descrita en esta sección se obtuvieron dos sistemas destinados a estudio, un sistema sin polarización al cual se le llamó **0V** y un sistema polarizado con 1,7 V llamado **1,7V**.

3.3 Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular fueron llevadas a cabo usando el paquete GROMACS 5.1.5 [20,26,27]. Para llevar a cabo las simulaciones se utilizó el termostato v-rescale con una constante de acoplamiento de 0,1 ps manteniendo la temperatura a 310 K. También se utilizó el esquema Berendsen para el acoplamiento de presión con una constante de acoplamiento de 1 ps y se aplicó semi-isotrópicamente, acoplando el tensor presión independientemente al plano paralelo a la membrana (xy), y al eje normal a la misma (z). La presión de referencia fue de 1,01325 bar tanto en el plano xy como en el eje z, y la compresibilidad de referencia del sistema fue de $5,3 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. Se utilizó una caja triclínica, en promedio, de 6,85 nm en x, 6,85 nm en y, 18,54 nm en z y se aplicaron condiciones periódicas de contorno. Las longitudes de los enlaces se restringieron con el algoritmo LINCS. La geometría del agua se restringió utilizando el algoritmo SETTLE. Las interacciones no enlazantes fueron calculadas usando el esquema de truncamiento de Verlet con un radio de corte de 1,0 nm. Se usó un paso de tiempo de 2 fs. Ambos sistemas fueron pre-optimizados y pre-equilibrados por al menos 12 ns.

Las moléculas de agua fueron descritas con el modelo atomístico de tres centros SPC. Los parámetros para ICG fueron obtenidos como se detalla en la sección 3.1. El campo de fuerza para las moléculas de POPC fue el de átomos unidos de Berger [28].

3.4 Potencial de fuerza media

Se calculó el perfil de PMF de partición del colorante a una de las bicapas por medio del método *Umbrella Sampling* (US), en conjunto con el método WHAM [29] ambos implementados en el paquete GROMACS.

El sistema en estudio presentó la condición de mantener constante el número de moléculas N , la presión P y la temperatura T por lo tanto es un sistema isocórico-isobárico en el cual la energía libre de Gibbs alcanza un valor mínimo en el equilibrio. El potencial de fuerza media (PMF), como se mencionó en la sección 2.3 permitió obtener una aproximación a la energía libre de partición de la molécula de ICG entre la fase acuosa y la membrana lipídica. El valor de esta energía informó sobre la afinidad que presenta el colorante con la membrana, como así también, proporcionó la ubicación de equilibrio de ICG encontrada en el mínimo de la curva de PMF.

3.4.1 Cálculo del Potencial de Fuerza Media

Para llevar a cabo el análisis de umbrella sampling, se definió la variable colectiva Z , definida como la componente z (dirección normal al plano de la membrana) de la distancia entre los centros de masa del colorante y de la bicapa en que se inserta el mismo, en similitud a la metodología usada en el trabajo de Galassi et.al 2015 [30].

Para realizar el análisis de US en primer lugar, se generó una trayectoria del colorante de la cual se extrajeron una serie de configuraciones que se usaron como la configuración inicial en las simulaciones individuales del US. Este primer paso se llevó a cabo a través del método descrito por Javanainen et. Al [31] donde obtienen la trayectoria pero no llevando el colorante del centro de la solución acuosa hasta el centro de la membrana, ya que esta metodología produce la deformación de la membrana, de lo contrario, se coloca el colorante en el centro de la membrana y luego se lo lleva hacia la solución acuosa. Para llevar a cabo esto, en primer lugar se colocó la molécula de ICG a un lado de una de las bicapas, para lo cual se debió ampliar suficientemente la caja de simulación en esta dimensión. Se aplicó una

alta presión lateral (10 bar) sobre la dimensión de la caja en la cual se adicionó el colorante. Se requirió la aplicación simultánea de restricciones de movimiento en el eje z a los átomos de oxígeno de las moléculas de agua y átomos de fósforo de los fosfolípidos para impedir que dichas moléculas difundan al espacio vacío generado al aumentar el tamaño de la caja. Finalmente, mediante una simulación de 2 ns, se logró obtener al colorante embebido en el seno de una de las bicapas al ingresarlo lateralmente. Una vez concretado ese proceso se procedió a remover las restricciones previamente asignadas y se relajó el sistema durante 12 ns.

Luego, para obtener las configuraciones iniciales para las simulaciones de US, se utilizó la herramienta *pulling* implementada en GROMACS y se trasladó al colorante 5 nm desde el centro de la membrana hasta la solución acuosa del compartimiento exterior (compartimiento con carga neta positiva para el caso del sistema polarizado).

A partir de la trayectoria generada, se extrajeron 23 configuraciones a lo largo de los 5 nm muestrados por la variable colectiva Z. En el análisis de US las 23 ventanas se ejecutaron en simulaciones independientes bajo restricciones armónicas que permitieron a la molécula de ICG muestrear regiones de interés de la superficie de energía potencial a lo largo de la variable colectiva Z, estas trayectorias se realizaron durante 50 ns.

El espaciado entre las posiciones de restricción de las ventanas fue de 0,2 nm desde 0 nm hasta los primeros 3,2 nm (ubicado a continuación de la zona interfacial membrana-agua) y luego de 0,3 nm hasta los 5 nm. En las primeras 15 ventanas, con menor espaciamiento, se aplicó una constante de fuerza de $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ en la restricción armónica, mientras que las siguientes 8 tuvieron una constante de fuerza de $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$.

Posteriormente se obtuvo el PMF a través del método de análisis de histogramas ponderados (WHAM, por sus siglas en inglés). Las simulaciones de US y el cálculo de PMF fueron efectuadas tanto para el sistema no polarizado (0V) como para el sistema con polarización (1,7V de potencial de transmembrana). Una vez obtenidos los PMFs para ambos sistemas, se calculó la energía libre de partición de ICG tomando la diferencia entre el valor de PMF en el seno de la solución y el valor del mínimo de energía.

3.5 Análisis configuracional del colorante inserto en la membrana.

A los fines de obtener el detalle molecular de la respuesta óptica que presenta el colorante a

cambios en el potencial eléctrico transmembrana, se propuso evaluar la contribución configuracional, del colorante inserto a la membrana, como así también la contribución electrocrómica a la respuesta óptica.

Para evaluar las contribuciones configuracionales, se tomaron las trayectorias de los mínimos de energía de cada sistema de estudio y se les realizaron análisis de:

- La profundidad con que se inserta el colorante en la membrana, siendo ésta el valor de Z en el mínimo de energía;
- La orientación que presenta en el mínimo de energía;
- La variación conformacional que presenta en su estado de equilibrio.

Para el cálculo de promedios configuracionales se descartaron los primeros 20 ns de las simulaciones de US. Este tiempo de simulación suele ser el tiempo que toma el sistema para equilibrarse.

3.5.1 Profundidad del colorante en la membrana

Hallar la localización más favorable del colorante a lo largo del trayecto muestreado por la variable colectiva (Z), da información acerca de la afinidad del colorante a la membrana, y de si ésta afinidad es sensible a cambios en el potencial de membrana.

Para llevar a cabo este análisis se extrajo el valor de Z correspondiente al mínimo de energía libre de los perfiles de PMF para cada sistema analizado (0V y 1,7V) y se compararon con el objeto de discernir si los cambios en el potencial transmembrana afectan la afinidad del colorante en la bicapa lipídica.

3.5.1.1 Análisis de la localización de los grupos sulfonatos

Los grupos sulfonatos presentan una densidad electrónica que podría hacer que estos grupos se comporten de manera diferente en presencia o ausencia de potencial. Para evaluar este comportamiento, se realizó un análisis que consistió en calcular la componente z (dirección normal al plano de la membrana) de la distancia entre los átomos de azufre (S1 o S2) respecto del plano medio formado por los átomos de fósforo de la hemicapa más cercana. Se llevó a cabo por medio de la herramienta *distance* de GROMACS. Evaluar esta distancia, la cual se encuentra en la misma dirección del campo eléctrico, informa el papel que cumplen

estos grupos en la respuesta diferencial de ICG. Una hipótesis sería que el alineamiento de los grupos sulfonatos con el colorante cambie en presencia de potencial, indicando que estos grupos funcionan como antenas. Este análisis además, provee información de la importancia de grupos funcionales en la molécula en cuanto a cambios en el potencial.

3.5.2 Orientación del colorante en la membrana

La orientación del colorante en la bicapa lipídica es un parámetro importante debido a que está involucrada en la regulación de la sensibilidad al voltaje de los CSVs de tipo electrocromicos. En este tipo de CSVs el mecanismo de sensibilidad al voltaje dominante es el electrocromismo. La magnitud del electrocromismo (o perturbación de las energías orbitales cromóforas), que da lugar a la sensibilidad al voltaje, es proporcional al ángulo que forman la dirección del campo eléctrico con la dirección de la distancia en la que viaja la transferencia de carga efectiva. Además como se mencionó en la Figura 1.3, el campo eléctrico puede causar un torque en la molécula y producir un cambio en la orientación.

Con el objeto de evaluar si la orientación se ve modificada al cambiar la polarización del sistema y con ello contribuir al estudio del aporte configuracional a la respuesta óptica del colorante, se determinó la orientación que presenta el ICG en la membrana, en el mínimo de energía, tanto para el sistema **0V** como para el sistema **1,7V**.

El análisis de la orientación que presenta el colorante en la membrana se llevó a cabo describiendo el ángulo de inclinación del ICG respecto del eje normal a la membrana. Este ángulo fue calculado definiendo un vector dentro de la molécula de ICG y calculando el ángulo que forma este vector con el eje normal a la membrana, z . Este estudio se realizó por medio de la herramienta *gangle* de GROMACS. El vector (v) se definió entre dos átomos de carbono distales de la cadena polivinílica de la molécula de ICG, como se muestra en la Figura 3.5.

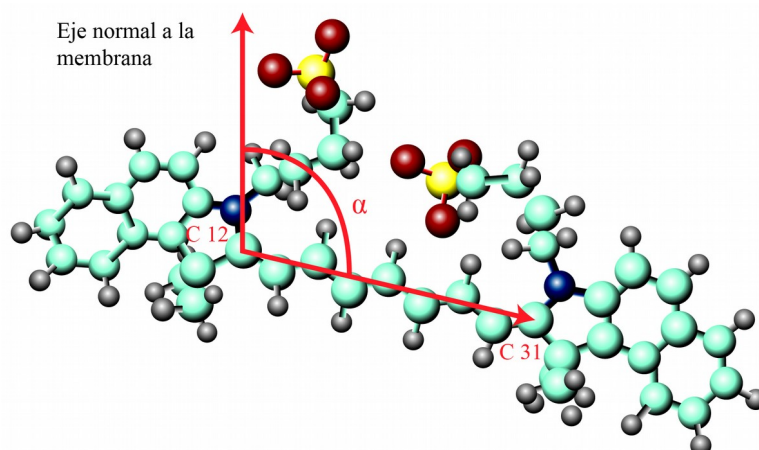


Figura 3.5: Ángulo de inclinación de ICG respecto al plano normal a la membrana. Los carbonos C12-C31 forman el vector (v) del ICG. La representación no muestra los dobles enlaces alternados del sistema conjugado.

Se seleccionaron estos dos átomos porque habiendo observado las simulaciones realizadas en el análisis de *umbrella sampling*, la cadena polivinílica preservaba cierta rigidez durante las simulaciones. Esto se debe a que los dobles enlaces que conforman el sistema conjugado extendido de ICG (ver Figura 1.4) no permiten la rotación interna de la molécula.

3.5.3 Análisis conformacional del colorante en membranas de POPC

Se efectuó un análisis que permitió agrupar las conformaciones visitadas a lo largo de la trayectoria del mínimo de energía del perfil de PMF. La agrupación de las conformaciones es en base a la similitud estructural entre ellas. Este análisis se efectuó utilizando el cálculo de la distancia cuadrática media (RMSD por sus siglas en inglés) entre las coordenadas de dos configuraciones del colorante presentes en la trayectoria. Para realizar este análisis fue necesario definir un radio de corte. El radio de corte cumplió la función de agrupar aquellas configuraciones en las que la suma de las diferencias átomo-átomo (mismo átomo de dos configuraciones distintas) de todos los átomos del ICG, no supere el valor de radio de corte fijado. Así, las estructuras con una RMSD menor a este radio, pertenecían a un mismo grupo de estructuras o *cluster*. Este análisis se efectuó a través del algoritmo *cluster* implementado en GROMACS, utilizando el método "gromos" y un radio de corte de 0,09 nm, que se ajustó para obtener 80% de las estructuras en los 15 *clusters* más poblados.

Se calculó la orientación de cada una de las configuraciones componentes de los *clusters*

para corroborar que no hubiera grandes variaciones configuracionales dentro de los mismos. Para ello, se obtuvo el promedio y la desviación estándar de la orientación del ICG en cada *cluster*.

3.6 Cálculo de las propiedades ópticas

Se investigaron los efectos de las interacciones moleculares y el potencial dipolar de la membrana en el espectro de absorción de la ICG en membranas de diferente polaridad. Este análisis se realizó por medio de cálculos con potenciales híbridos QM/MM.

Para este cálculo se utilizó el método de la teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) con el funcional B3LYP y la base 6-31G** con corrección de largo alcance a través del método Coulomb atenuado (CAM) [30]. Se utilizó la implementación en el paquete Gaussian 09 que permite incorporar el campo eléctrico proveniente de la membrana lipídica y la solución a través de la malla de cargas puntuales clásicas que las representa. De este modo, la función de onda del colorante resulta polarizada por el entorno clásico. Estos cálculos permitieron obtener la energía de la configuración electrónica de la entidad química en estado fundamental y estado excitado a través de cálculos de dinámica electrónica.

El subsistema cuántico sobre el que se efectuó la descripción electrónica estaba formado por el colorante, mientras que el entorno compuesto por la membrana y la solución acuosa se trató con el formalismo de la mecánica molecular.

Se calcularon las 10 transiciones de menor energía para las geometrías centrales de los 15 *clusters* más poblados de ICG, tanto para el sistema **0V** como para el de **1,7V**. Con el fin de obtener el espectro de absorción del colorante en cada sistema analizado, se realizó una suma pesada de las bandas gaussianas de absorción obtenidas de las geometrías centrales de los 15 *clusters* y se obtuvo el espectro de absorción para cada sistema. Las bandas gaussianas correspondientes a cada una de las configuraciones centrales de los 15 *clusters* se multiplicaron por un factor de peso (Wg) que se definió como la cantidad de configuraciones que componían el *cluster* en relación al total de configuraciones de los 15 *clusters*.

Se emuló un espectro del sistema termalizado por extrapolación de una Gaussiana centrada en la longitud de onda de excitación (λ_i), y una intensidad relativa proporcional a la constante de fuerza del oscilador (f_i), la cual está relacionada con la fuerza del dipolo del

colorante. Se definió un ancho de gaussiana arbitrario para cada una de las contribuciones de $\sigma = 1/3099,6 \text{ nm}$ [31].

$$\epsilon_i(c/\lambda_i) = \sum_{i=1}^{15} Wg_i \cdot 1,3062974 \times 10^8 \cdot \frac{f_i}{\sigma} \cdot e^{-\left(\frac{c/\lambda - c/\lambda_i}{\sigma}\right)^2} \quad (25)$$

donde el subíndice i se refiere a la excitación electrónica de interés y c es la velocidad de la luz. Finalmente se obtuvieron los espectros medios de absorción para ICG en los sistemas polarizado y no polarizado a través de una combinación lineal ponderada de las 15 contribuciones, donde los factores de peso de cada contribución estaba dado por la fracción de población en el *cluster* en cuestión.

Capítulo 4

RESULTADOS

4.1 PMF y Energía libre de partición

El diseño y mejoramiento racional de los CSVs requiere una comprensión detallada del mecanismo de respuesta óptica de CSVs al potencial de membrana. Para esto es necesario dilucidar los factores moleculares y energéticos incidentes en el mecanismo de respuesta.

A los fines de cumplimentar este requerimiento, se comenzó estudiando el proceso de partición de la ICG a membranas modelo de POPC tanto para el sistema sin polarización, sistema **OV** como para el sistema polarizado, sistema **1,7V**, desde un enfoque energético y configuracional.

Se efectuó el análisis del PMF por medio del cual se determinó la energía libre de partición del ICG y con ella se estimó la afinidad del colorante a la membrana para cada sistema en estudio. La energía libre (Δ PMF) se calculó como la diferencia entre la energía libre en la solución acuosa y el mínimo de energía, la gráfica de la Figura 4.1 ya tiene restado en cada punto el valor del PMF en solución acuosa por lo cual se ha definido el cero de energía cuando el colorante se encuentra en la solución acuosa.

Esto se llevó a cabo a través del método de *umbrella sampling* usando la variable colectiva Z , donde Z es la componente z (dirección normal al plano de la membrana) de la distancia entre los centros de masa del colorante y de la bicapa en que se inserta el mismo. La curva negra de la Figura 4.1 muestra el PMF para el sistema sin polarización y la curva roja muestra

el PMF para el sistema polarizado.

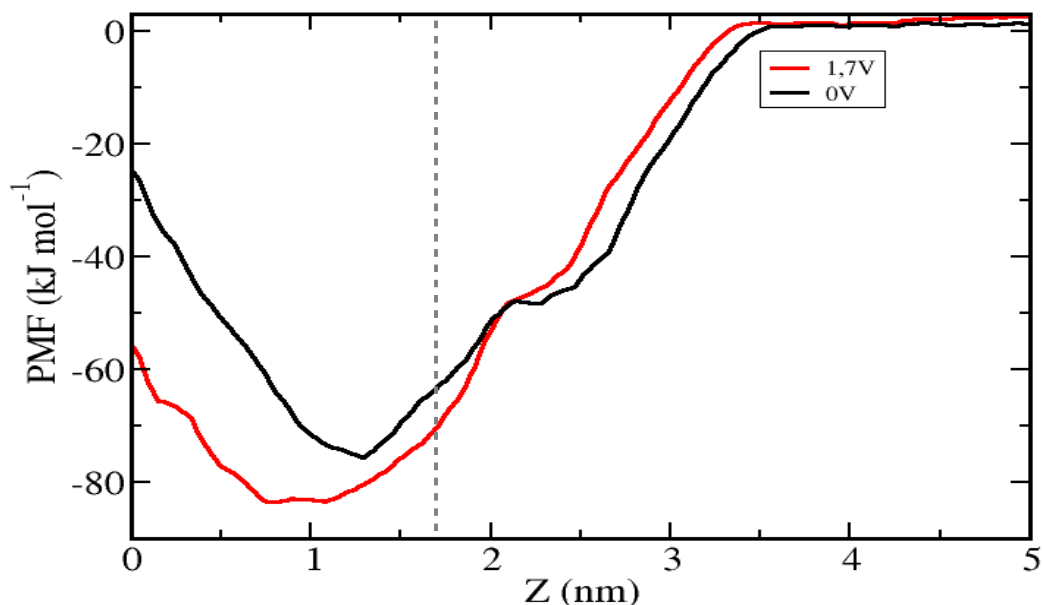


Figura 4.1: PMF para la inserción de ICG en la bicapa de POPC obtenida por US. La coordenada Z es la componente normal a la membrana de la distancia entre el centro de masa ICG y el centro de masa de bicapa en que se inserta. Curva negra: sistema no polarizado. Curva roja: Sistema con 1,7 V de potencial de transmembrana. La línea punteada representa la superficie de la membrana. En esta gráfica se ha llevado el cero de energía a cuando la molécula se encuentra en la solución acuosa.

La figura 4.1 muestra que el mínimo de energía es distinto en magnitud para cada sistema. Para el sistema en ausencia de potencial transmembrana, el ΔPMF es $\sim -75 \text{ kJ mol}^{-1}$ mientras que cuando está polarizada, aumenta a $\sim -83 \text{ kJ mol}^{-1}$. La energía libre muestra que en el sistema **1,7V** la inserción del colorante es más favorable que en el sistema **0V**.

La línea punteada de la Figura 4.1 presente a 1,7 nm representa la superficie de la membrana. Se puede observar que cerca de esta línea se encuentra un mínimo local, el cual representa la estabilidad que adquiere la molécula cuando se adsorbe a la membrana. Sin embargo, al atravesar la intersección agua-membrana el ICG encuentra su mínimo de energía total absorbido en la membrana.

4.2 Profundidad de inserción del colorante en la membrana

La figura 4.1 también da información sobre la localización más probable del colorante en

la membrana ya que se puede ver el valor de Z al que la energía libre presenta un mínimo. La localización más probable para ICG para el sistema $0V$ es de 1,3 nm medidos desde el centro de masa de la bicapa, mientras que para el sistema $1,7V$ la localización de equilibrio es de 0,8 nm. Esto indica que la localización de ICG depende de la polarización del sistema. En el sistema $1,7V$, cuando un campo eléctrico está presente, se vé que el mismo cambia el entorno molecular del colorante produciéndole una mayor profundidad de inserción además de que la inserción sea más favorable.

En la figura 4.2 se muestra el colorante absorbido en la membrana en el mínimo de energía para cada sistema analizado.

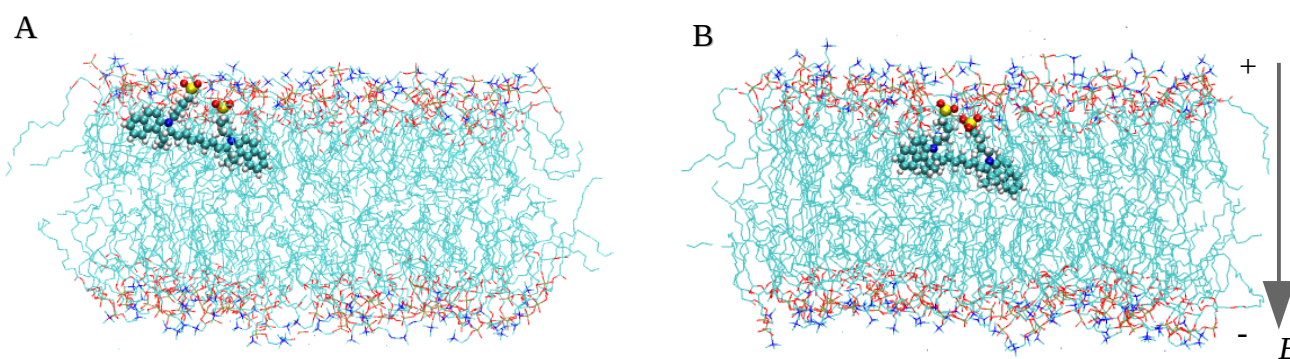


Figura 4.2: Configuraciones de ICG embebida en la bicapa de POPC obtenidas a partir de las trayectorias de dinámica molecular de las ventanas de US correspondientes a los mínimos en el PMF. E es el campo eléctrico. A) Sin diferencia de potencial. B) Con diferencia de potencial de 1,7V.

Para el caso del sistema $1,7V$ se observa que la presencia de un campo eléctrico a través de la membrana aumenta la afinidad del ICG por el interior hidrofóbico de la membrana.

4.2.1 Análisis de la localización de los grupos sulfonatos

El análisis del papel que cumplen los grupos sulfonatos de la ICG a la respuesta óptica diferencial del colorante, en la configuración del mínimo de energía, es interesante debido a que la densidad electrónica que presentan estos sulfonatos alrededor de ellos podría comportarse de manera distinta en presencia o ausencia de potencial. Para evaluar esta característica, se calculó la componente z (dirección normal a la membrana) de la distancia entre los azufres de los grupos sulfonatos de la ICG y el centro de masa de los fosforos que

integran la hemicapa más próxima a los sulfonatos.

Los resultados se muestran en la figura 4.2.1. Se puede ver que en el sistema **0V**, ambos azufres se localizan aproximadamente a 0,1 nm del plano medio de los átomos de P de la hemicapa *cis* (hemicapa donde se embebe el colorante). En cambio, en el sistema **1,7V** ambos S están más alejados de la región interfacial, consistentemente con una localización más profunda de la molécula de colorante en la bicapa. Se puede notar que uno de los S, en ambos sistemas, se acerca levemente más al centro de masa de los fósforos que el otro indicando la inclinación que presenta la molécula en ambos sistemas.

Además es interesante ver que para el sistema 0V los azufres tienen una probabilidad de quedar fuera de la membrana en una distancia de 0,2 nm del centro de masa de los fosforos de la bicapa.

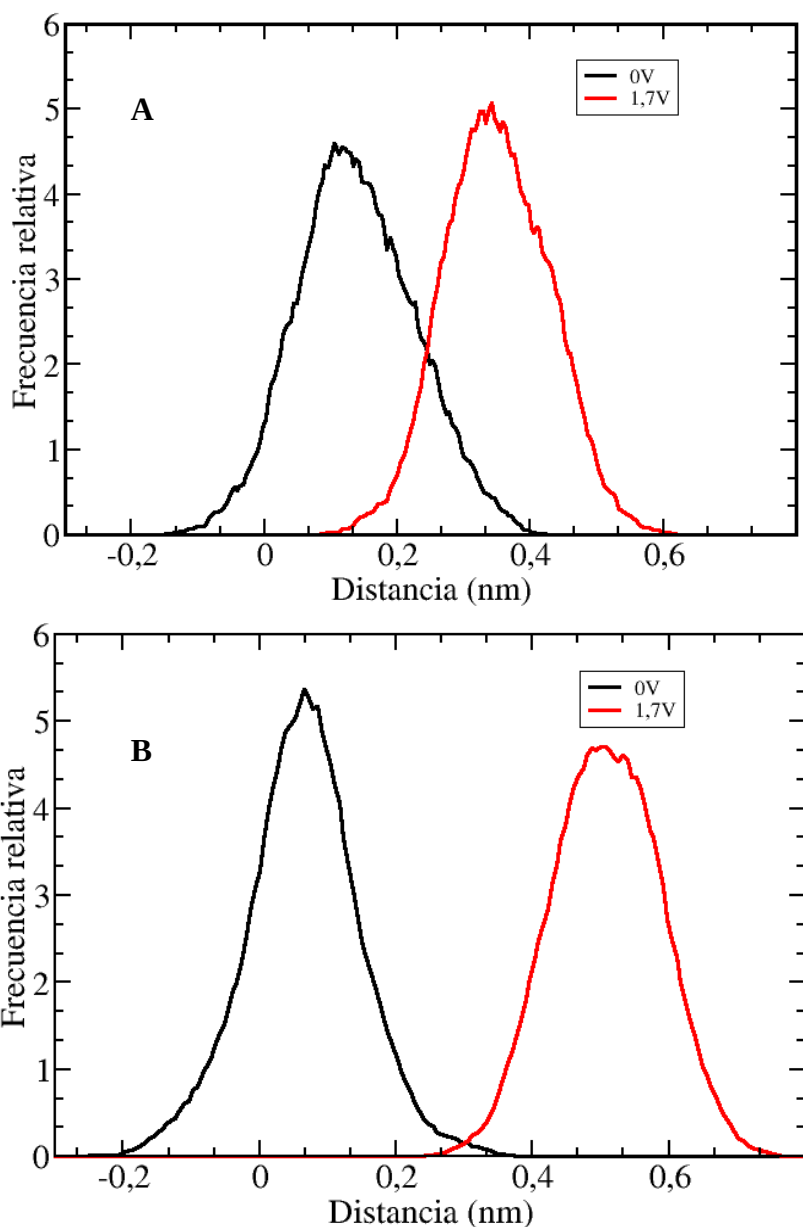


Figura 4.2.1: Histogramas de frecuencia de la componente z de la distancia entre el centro de masa de los átomos de P de la hemicapa proximal al ICG y los átomos de S del colorante. Curva negra: sistema no polarizado. Curva roja: sistema polarizado. A) S1. B) S2.

4.3 Orientación del colorante en la membrana

Como parte del análisis configuracional, se evaluó la contribución a la respuesta óptica diferencial proveniente de la geometría adoptada por el colorante en el mínimo de energía. Esta evaluación se realizó midiendo el efecto del campo eléctrico externo en la orientación del

ICG, respecto de la membrana lipídica a lo largo de la variable colectiva Z . Los resultados se muestran en la Figura 4.3 que además muestra las fluctuaciones en la orientación a través de las barras de error.

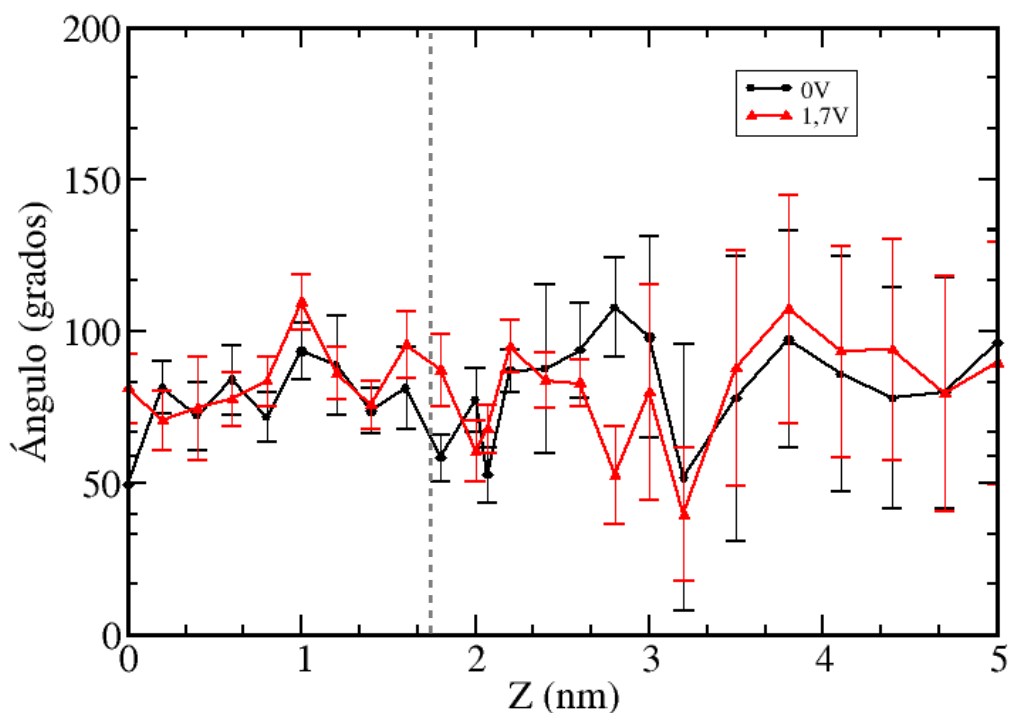


Figura 4.3: Ángulo medio formado entre el vector C12-C31 de ICG, como se mencionó en la sección 3.5.3, y el eje normal a la bicapa lipídica, en función de Z . Curva negra: sistema sin polarización. Curva roja: sistema polarizado. La línea punteada representa la superficie de la membrana.

Se puede apreciar que en la región de la membrana (Z en el rango de 0 a 2,5 nm), el colorante se orienta aproximadamente paralelo a la membrana (ángulo medio de $\sim 70^\circ$), con un bajo valor de desviación estándar que indica escasas fluctuaciones de orientación en el medio viscoso y anisotrópico de la membrana. A valores de Z mayores, cuando el colorante se encuentra en el medio acuoso isotrópico, se observa libre rotación del mismo plasmada en las elevadas barras de error.

En la figura 4.5 se muestran los histogramas de frecuencias del ángulo de inclinación obtenidos de la trayectoria de dinámica molecular correspondiente al mínimo de energía libre de cada sistema.

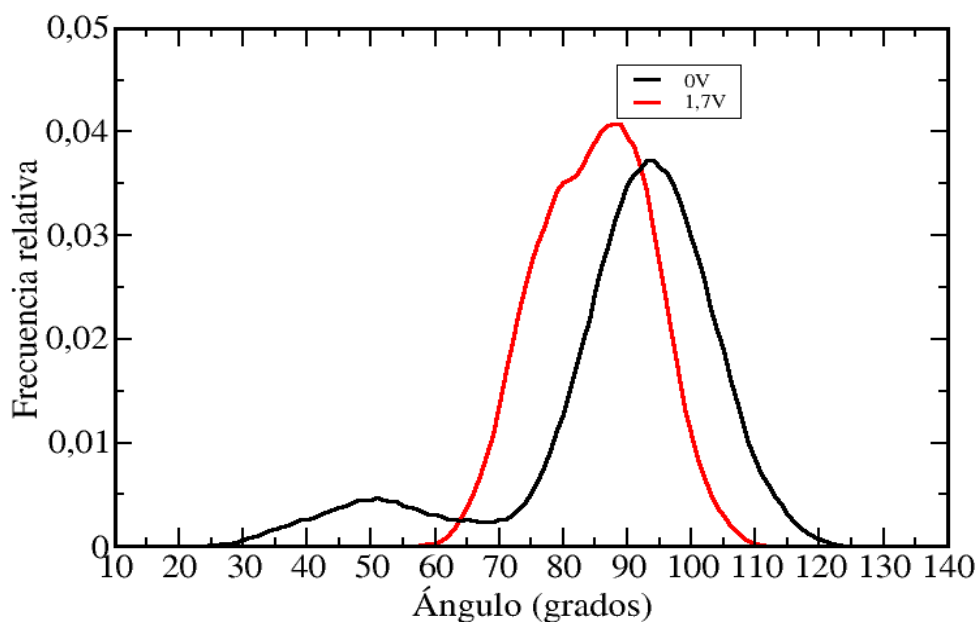


Figura 4.5: Histogramas del ángulo de inclinación de la ICG obtenidos a partir de las trayectorias de los mínimo de energía libre.

Se evidencia que el ángulo de inclinación en la localización más favorable energéticamente del colorante en la membrana, es levemente diferente, alrededor de 10° , entre los sistemas estudiados, el sistema **0V** presenta un ángulo medio de alrededor de 95° mientras que el sistema **1,7V** presenta un ángulo de alrededor de 85° . Esta diferencia indica, como se muestra en la Figura 1.3 de la sección 1.3.1 mecanismo de reorientación, que el campo eléctrico en el sistema **1,7V** realiza un torque en la molécula cambiando su orientación, la Figura 4.6 resume los análisis realizados mostrando a la molécula embebida en la interfase.

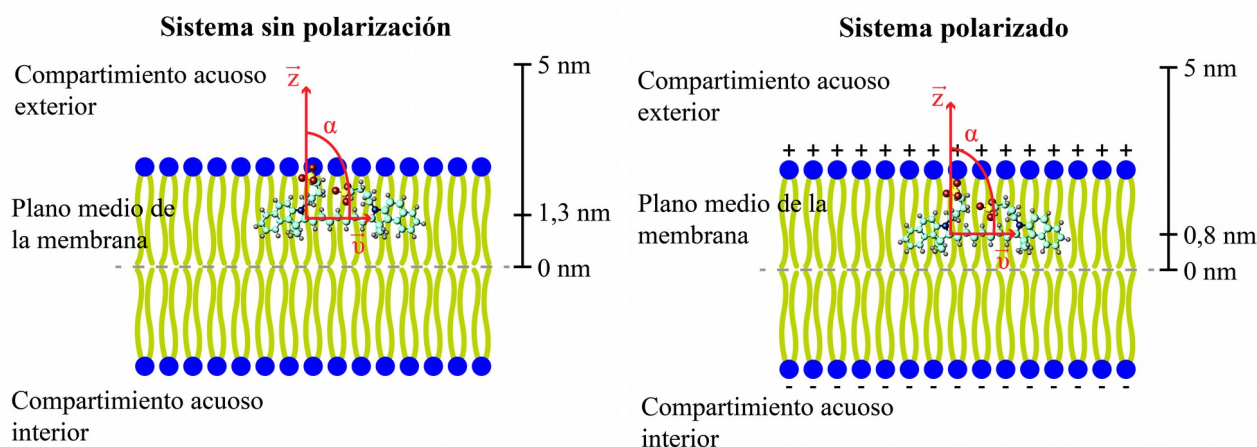


Figura 4.6: Diagrama de ICG inserto en la membrana. Se representa el ángulo de inclinación α formado por los vectores v y z . El vector v lo forman los carbonos C12-C31 de ICG y el vector z es el eje normal a la membrana. La línea punteada gris representa el plano medio de la membrana.

4.5 Análisis conformacional de ICG en membranas de POPC

Se hizo un análisis de la variabilidad conformacional que presenta el colorante al unirse a la membrana, a fines de obtener una muestra representativa de las configuraciones del mínimo de energía y a esta muestra poder calcularles los espectros de absorción. Para ello, se tomaron las trayectorias de los mínimos de energía libre y se llevó a cabo el análisis de similitud conformacional explicado en la sección 3.5.4.

Como se muestra en la figura 4.6, los 15 *clusters* más poblados se componen del 80 % de las configuraciones muestreadas en las trayectorias. Para cada configuración componente de los 15 *clusters* más poblados, se calculó la orientación de ICG y se obtuvo el ángulo promedio en cada *cluster* y la desviación estándar, lo que se representa en la figura 4.7. Las barras de error dan cuenta de las fluctuaciones de orientación relativamente bajas dentro de cada *cluster*. Se considera entonces que dentro de un *cluster* conformacional, las configuraciones son equivalentes dentro de las fluctuaciones térmicas, lo que permite conceptualizar a este análisis de *clusterización* conformacional como configuracional a su vez. De este modo, se consideró a cada uno de los 15 individuos (coordenadas centrales de los 15 *clusters* más poblados) como los componentes mayoritarios del muestreo, y se utilizaron en el cálculo de propiedades ópticas.

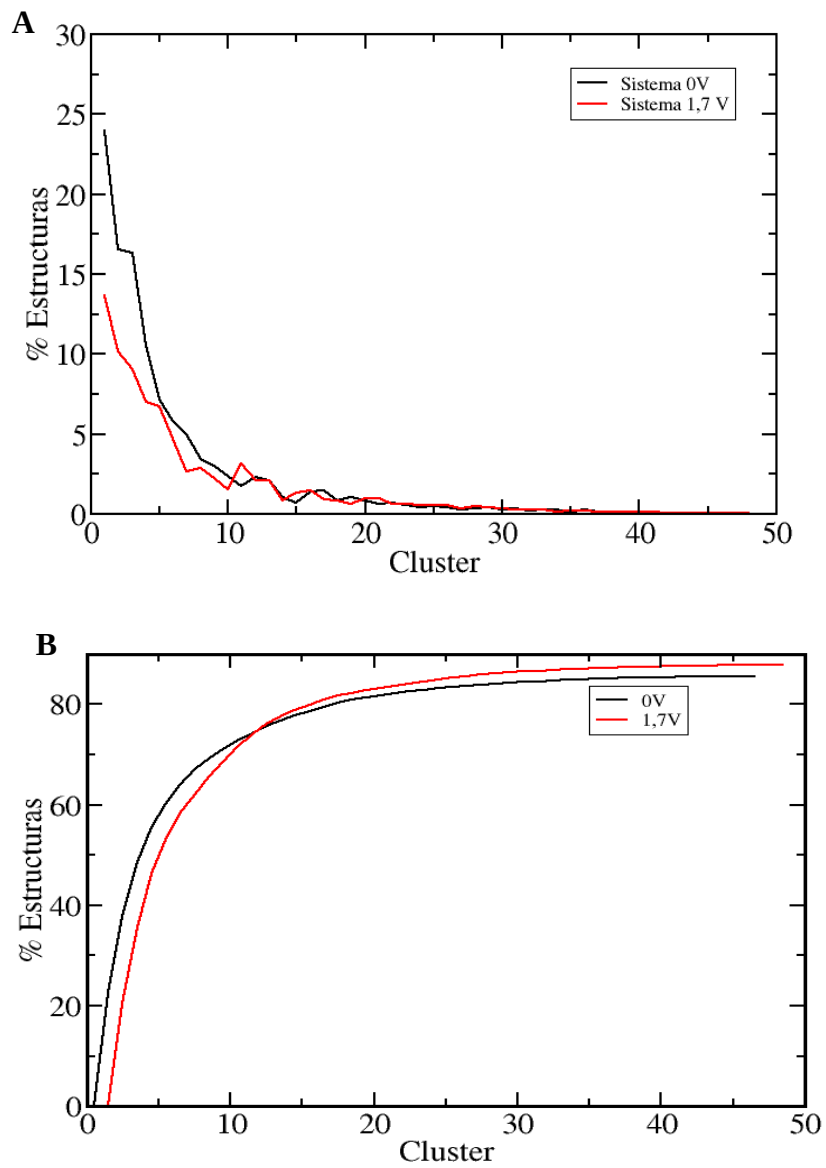


Figura 4.6: A) Porcentaje de estructuras presentes en cada cluster obtenido de el análisis de clustering de las 3000 configuraciones analizadas. B) porcentaje acumulado abarcado en función de la cantidad de clusters generados.

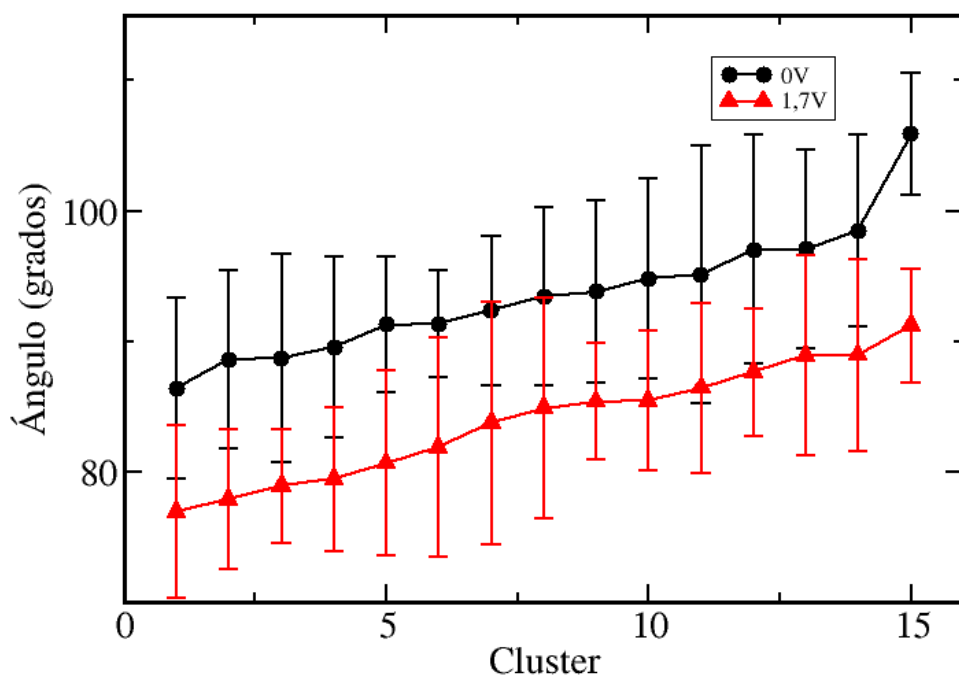


Figura 4.7: Promedio y desviación estándar del ángulo de inclinación de la molécula de ICG en cada cluster obtenido. Los clusters no están en orden de mayor población, los clusters se ordenaron, de manera tal de obtener una mejor visualización, en orden creciente de ángulo.

4.6 Propiedades ópticas

El método TD-DFT se utilizó para calcular la energía de absorción necesaria para excitar a la molécula de ICG del estado fundamental al estado excitado, para ambos sistemas en estudio. Los espectros de absorción se calcularon para cada *cluster* configuracional, el resultado se muestra en la Figura 4.8.

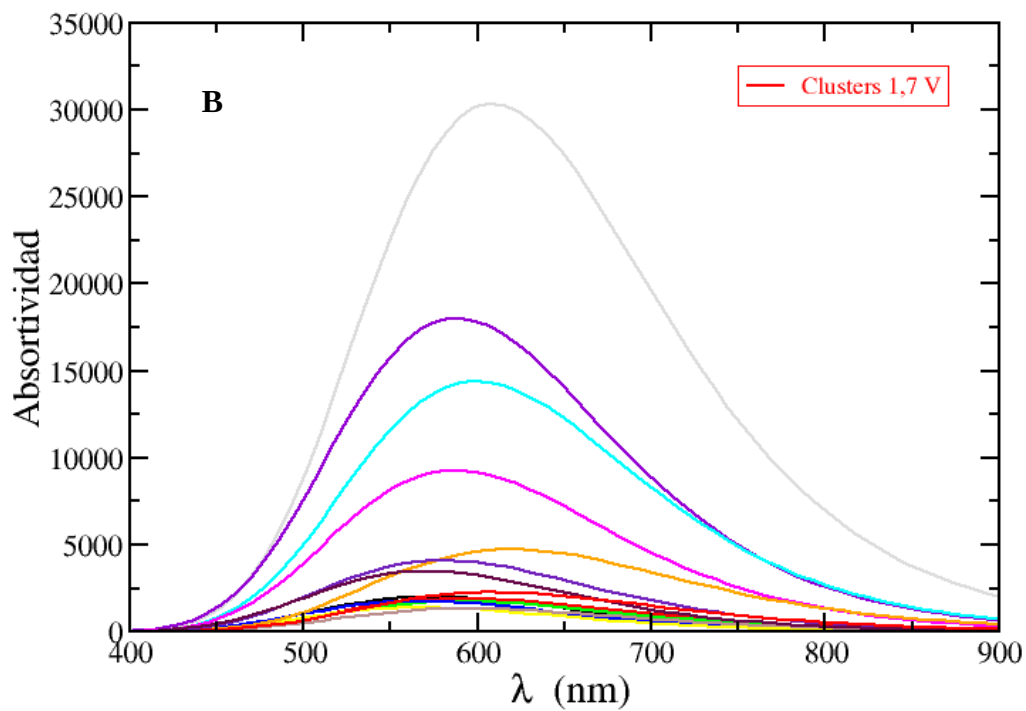
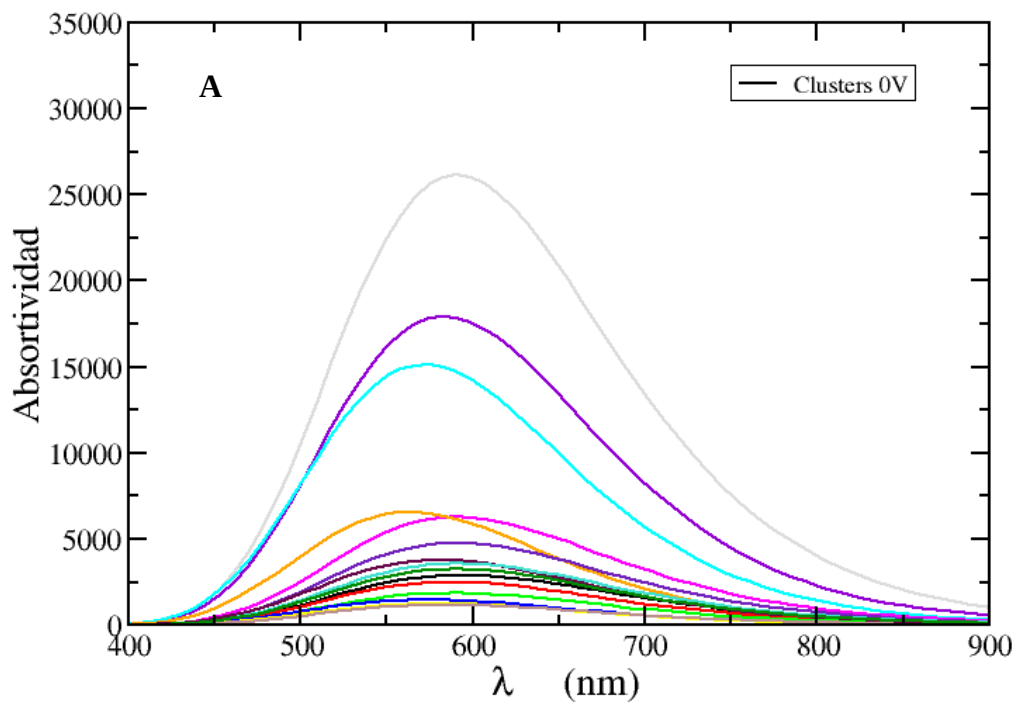


Figura 4.8: Espectros de absorción para cada una de las geometrías centrales de los clusters generados para cada sistema. A) Sistema sin polarización. B) Sistema polarizado.

La curva gris para cada espectro de absorción de los sistemas **0V** y **1,7V** pertenece al *cluster* más poblados con configuraciones. Los *clusters* presentan menor absorbtividad a menor

a menor población en el *cluster*.

La Figura 4.9 presenta el espectro de absorción total de ICG para cada sistema tras haberse sumado de manera pesada la contribución de cada *cluster*.

Los espectros muestran una diferencia en la longitud de onda de absorción de aproximadamente 20 nm con un corrimiento batocrómico en el caso del sistema polarizado. El sistema sin polarización presentó su longitud de onda de absorción a los 580 nm mientras que el sistema polarizado tuvo su pico de absorción a los 600 nm aproximadamente. El ancho de banda, que da cuenta de la dispersión térmica de los espectros es de 300 nm. Esto se debe tanto al muestreo configuracional (solo 15 espectros) y al ancho σ de las contribuciones gaussianas, cuyo valor fue seleccionado para reproducir efectos térmicos experimentales.

La longitud de onda en que se obtienen los espectros está en el rango de longitud de onda del visible, y no está de acuerdo a la longitud de onda experimental, que se encuentra en el infrarrojo. Se atribuye esto a que la longitud de onda absoluta obtenida a partir de estos cálculos resulta muy dependiente del método de cálculo electrónico elegido (funcional y base). Se hará una calibración para optimizar el método a utilizar. Sin embargo, la observación de un corrimiento batocrómico en el espectro calculado para el sistema polarizado, del orden del reportado experimentalmente [34], es muy alentador.

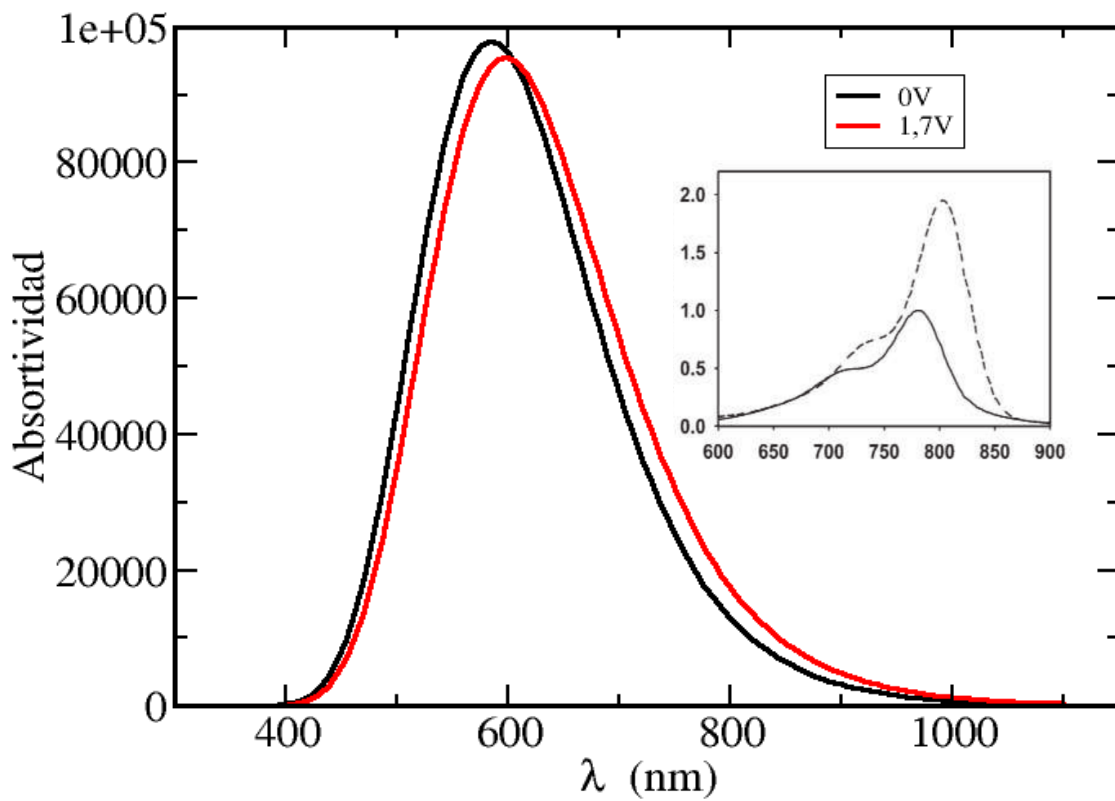


Figura 4.8: Espectros de absorción de ICG. La curva roja representa la absorción de ICG para el sistema polarizado de 1,7 V y la curva negra es la absorción de ICG para el sistema no polarizado. El recuadro muestra el espectro de absorción experimental de ICG. La línea punteada es ICG y la línea negra es un derivado del ICG (LP-ICG) [35].

Conclusiones

La molécula de ICG presenta una respuesta óptica diferencial en sistemas de diferente polarización. Esta respuesta óptica al campo le confiere interés por su potencial uso para determinaciones de potencial de membrana *in vitro* y para registro de la actividad eléctrica en tejidos excitables *in vivo*.

La respuesta óptica presenta en general la contribución de varios mecanismos moleculares, aquellos que incluyen efectos configuracionales, como los que presentan efectos electrónicos.

Dentro de las contribuciones configuracionales se obtuvo una leve diferencia en el ángulo de inclinación del ICG en los sistemas analizados, indicando que el mecanismo de reorientación provee un bajo aporte a la respuesta óptica diferencial al voltaje. Además la presencia de un campo eléctrico cambia la localización del mínimo de energía para el sistema analizado e inserta más profundamente al colorante en un sistema polarizado respecto de un sistema no polarizado, haciendo además que esta inserción sea más favorable.

La contribución electrónica se manifestó mediante la obtención de un corrimiento de la longitud de onda de absorción, del orden de los 20 nm, hacia longitudes de onda mayores presentado por el sistema **1,7V** respecto del sistema **0V**. Este corrimiento evidencia el aporte del mecanismo electrocrómico a la respuesta óptica diferencial. Este mecanismo implica que un cambio en el campo eléctrico modula directamente la distribución electrónica y cambia la estabilidad relativa de los estados electrónicos fundamental y excitado, cambiando con ello la longitud de onda de absorción para sistemas con diferente polarización. El corrimiento batocrómico obtenido es del orden del reportado experimentalmente [34].

Las simulaciones computacionales y análisis configuracional obtenidos permitieron calcular a un costo razonable la respuesta óptica diferencial de ICG en membranas con diferente estado de polarización. Estos resultados están de acuerdo con los experimentales en términos de la capacidad de este cromóforo de sensar campo eléctrico, por lo que valida el enfoque teórico usado.

Proyecciones

Entre las posibles metas a futuro, se espera que este trabajo sirva como punto de partida para un análisis más profundo del colorante sensible al voltaje estudiado. Un objetivo a corto plazo propuesto para una continuación de este proyecto es:

Debido a la asimetría eléctrica a través de la membrana en el sistema polarizado, se propone determinar el perfil de energía libre desde el plano medio de la membrana hacia el interior celular (el lado opuesto al desarrollado en el presente trabajo). Esto permitiría evaluar completamente el PMF a través de la membrana y calcular con ello características como tasas de *flip-flop* de la molécula, coeficiente de partición y estudiar si la lipofilidad interior de la membrana celular representa una barrera energética que impida el ingreso del colorante a la célula.

Además sería interesante realizar el estudio a diferentes valores de potencial transmembrana y evaluar si la variación en las propiedades espectrales es continua.

Se proyecta que los métodos y técnicas utilizadas en este trabajo permitan estudiar diferentes familias de CSV: el di-3-ANEPPDHQ (de la familia de los derivados del estireno) y las nuevas sondas fluorescentes VoltageFluor. Como así también, permitan realizar un estudio comparativo entre las sondas mencionadas junto con la sonda indocianina verde a fines de elucidar los determinantes moleculares de la actividad interfacial y de la respuesta óptica de estas moléculas fluorescentes insertas en membranas lipídicas polarizadas. Este estudio se llevaría a cabo durante la duración de la beca doctoral obtenida por la alumna.

Bibliografía

- [1] Neill A. Campbell y Jane B. Reece. *Biología*. Editorial médica Panamericana. 7^a edición. 2007.
- [2] Robert A. Pearlstein, Callum J. Dickson y Viktor Hornak. Contributions of the membrane dipole potential to the function of voltage-gated cation channels and modulation by small molecule potentiators. *Biochimica et Biophysica Acta* 1859 (2017) 177–194.
- [3] W. Buño, A Araque. *Propiedades eléctricas de las membranas de las células excitables*. Madrid, España. Viguera editores 2006.
- [4] Rishikesh U Kulkarni, Hang Yin, Narges Pourmandi, Feroz James, Maroof M Adil, David V. Schaffer, Yi Wang, and Evan W. Miller. A rationally-designed, general strategy for membrane orientation of photoinduced electron transfer-based voltage-sensitive dyes. *ACS Chem. Biology*. 2016
- [5] Marco Canepari, Dejan Zecevic. *Membrane Potential Imaging in the Nervous System Methods and Applications*. Springer ISBN 978-1-4419-6557-8. DOI 10.1007/978-1-4419-6558-5. 2010
- [6] Bert Sakmann and Erwin Neher. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annual Review of Physiology*, 46(1):455–472, 1984.
- [7] AS Waggoner. Dye indicators of membrane potential. *Annual review of biophysics and bioengineering*, 8(1):47–68, 1979.
- [8] Darcy S Peterka, Hiroto Takahashi, and Rafael Yuste. Imaging voltage in neurons. *Neuron*, 69(1):9–21, 2011.
- [9] Hamutal Slovin, Amos Arieli, Rina Hildesheim, and Amiram Grinvald. Long-Term Voltage-Sensitive Dye Imaging Reveals Cortical Dynamics in Behaving Monkeys. *J Neurophysiol* 88: 3421–3438, 2002;
- [10] Maria Matson, Nils Carlsson, Tamás Beke-Somfai, and Bengt Nordén. Spectral properties and orientation of voltage-sensitive dyes in lipid membranes. *Langmuir*, 28(29):10808–10817, 2012.

[11] Marlon J Hinner, Siewert-J Marrink, and Alex H de Vries. Location, tilt, and binding: a molecular dynamics study of voltage-sensitive dyes in biomembranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(48):15807–15819, 2009.

[12] Loew, L. M., Bonneville, G. W., and Surow, J. (1978) Charge Shift Optical Probes of Membrane-Potential - Theory, *Biochemistry-U*s 17, 4065-4071.

[13] Loew, L. M. (2015) Design and Use of Organic Voltage Sensitive Dyes, In *Adv Exp Med Biol* (Canepari, M., Zecevic, D., and Bernus, O., Eds.), pp 27-53, Springer-Verlag Berlin, Berlin.

[14] Ming Zhang, Shu-ting Zheng, Xiao-jing Liu, Ying Long, Bing-qin Yang. A series of novel NIR fluorescent dyes: Synthesis, theoretical calculations and fluorescence imaging applications in living cells. *Dyes and Pigments* 125 (2016) 220e228. El Sevier 2015.

[15] Jeremy S Treger, Michael F Priest, Raymond Iezzi, and Francisco Bezanilla. Real-time imaging of electrical signals with an infrared fda-approved dye. *Biophysical journal*, 107(6):L09–L12, 2014.

[16] Akorn, Inc. 2012. IC-GREEN [package insert]. Akorn, Lake Forest, IL.

[17] Jarmo T. Alander, Ilkka Kaartinen, Aki Laakso, Tommi Pätilä, Thomas Spillmann, Valery V. Tuchin, Maarit Venermo, and Petri Välisuo. A Review of Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery. *International Journal of Biomedical Imaging*. Volume 2012, Article ID 940585.

[18] Michael P. Allen and Dominic J. Tildesley. *Computer Simulation of Liquids*. Oxford University Press, nov 2017.

[19] Ira N. Levine. *Fisico química*. 3^a edición. Mc Graw Hill. 1991.

[20] Lindahl, Abraham, Hess, and van der Spoel. *GROMACS Manual* 2018.

[21] Shankar Kumar, John M. Rosenberg, Djamel Bouzida Robert H. Swendsen, and Peter A. Kollman. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. i. the method. *J. Comp. Chem.*, 13(8):1011–1021, 1992.

[22] Martin J Field. The pdynamo program for molecular simulations using hybrid

quantum chemical and molecular mechanical potentials. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(7):1151–1161, 2008.

[23] Adele D. Laurent, Denis Jacquemin. TD-DFT benchmarks: A review. *International Journal of quantum chemistry*.

[24] Nathan Schmid, Andreas P Eichenberger, Alexandra Choutko, Sereina Riniker, Moritz Winger, Alan E Mark, and Wilfred F van Gunsteren. Definition and testing of the gromos force-field versions 54a7 and 54b7. *European biophysics journal*, 40(7):843, 2011.

[25] K. Malde, Le Zuo, Matthew Breeze, Martin Stroet, David Poger, Pramod C. Nair, Chris Oostenbrink, and Alan E. Mark. An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0

[26] Mark James Abraham, Teemu Murtola, Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C Smith, Berk Hess, and Erik Lindahl. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1:19–25, 2015.

[27] <http://www.gromacs.org/>.26]

[28] Arnau Cordoní, Gianluigi Caltabiano. Leonardo Pardo. Membrane Protein Simulations Using AMBER Force Field and Berger Lipid Parameters. *J. Chem. Theory Comput.* 2012, 8, 3, 948-958.

[29] G.M. Torrie and J.P. Valleau. Nonphysical sampling distributions in monte carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. *J. Comp. Phys.*, 23(2):187–199, 1977.

[30] Vanesa Galassi; Guilherme Arantes. Partition, orientation and mobility of ubiquinones in a lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1847 (2015) 1560–1573.

[31] Matti Javanainen. Universal Method for Embedding Proteins into Complex Lipid Bilayers for Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* 2014, 10, 2577–2582.

[32] Yanai, Takeshi, David P. Tew, and Nicholas C. Handy. “A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP).” *Chemical Physics Letters* 393. 1-3 (2004):51-57.

[33] <http://gaussian.com/uvvisplot/>

[34] Jarmo T. Alander, Ilkka Kaartinen, Aki Laakso, Tommi Pätilä, Thomas Spillmann, Valery V. Tuchin, Maarit Venermo and Petri Välisuo. A Review of Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery. *International Journal of Biomedical Imaging*. Doi:10.1155/2012/940585.

[35] Steven T. Proulx, Paola Luciani, Stefanie Derzsi, Matthias Rinderknecht, Viviane Mumprecht, Jean-Christophe Leroux, and Michael Detma. Quantitative Imaging of Lymphatic Function with Liposomal Indocyanine Green. *American Association for Cancer Research*. September 7, 2010; DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0271