Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

Unidad Monterrey

Propiedades estructurales y mecánicas de membranas modelo bajo la interacción de drogas: Un estudio con dinámica molecular

Tesis que presenta:

Patricio Adrian Zapata Morin

Para obtener el grado de Doctor en:

Ingeniería y Física Biomédica

Director de tesis:

Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez

Monterrey, México Agosto del 2016

Índice

Resumen ---- i

Abstract ---- ii

Agradecimientos ---- iii

Capítulo 1 ---- 1

Introducción ---- 1

Capítulo 2 ---- 11

Objetivos e Hipótesis ---- 11

2.1 Objetivos ---- 11

2.1.1 Objetivo general ---- 11

2.1.2 Objetivos particulares ---- 11

2.2 Hipótesis ---- 11

Capítulo 3 ---- 12

Dinámica molecular (DM) ---- 12

3.1 Algoritmos ---- 13

3.2 El concepto de CFP ---- 14

3.3 Concepto de grupos ---- 16

3.4 Funciones de interacción ---- 17

3.4.1 Interacciones No-asociadas. ---- 18

3.4.2 Interacciones Asociadas. ---- 19

3.4.3 Interacciones de Arresto. ---- 20

3.5 Campo de fuerza ---- 20

Capítulo 4 ---- 22

Materiales y métodos ---- 22

4.1 Parámetro de Orden (S_{CD}) ---- 26

4.2 Entropía de Schlitter ---- 26

4.3 Área Por Lípido ---- 27

Capítulo 5 ---- 30

DPPC: Resultados y Discusión ---- 30

5.1 Localización molecular ---- 30

5.2 Energías de interacción ---- 32
5.3 Entropía Configuracional ---- 36
5.4 Parámetro de orden SCD ---- 37
Capítulo 6 ---- 38
Balsa de lípidos modelo: Resultados y Discusión ---- 38
6.1 Localización molecular ---- 38
6.2 Entropía Configuracional ---- 41
6.3 Parámetro de orden S_{CD} ---- 42
6.4 Área por lípido (APL) ---- 44
Capítulo 7 ---- 45
Conclusiónes ---- 45
Bibliografía ---- 46

Índice de Tabla

Tabla 1. Resultados de la MD (error estadístico entre paréntesis). ɣ es el porciento entre las energías de Lennard-Jones y Coulomb. ---------- 33

Tabla 2. Resultados de los valores de Área por lípido (APL), Difusión y Ancho de membrana del lípido DOPC ---------- 44

Índice de Figura

Figura 1. Relación del coeficiente de partición aceite-gas con la dosis media efectiva de los anestésicos ---------- 2

Figura 2. Potencial de London, energía de interacción de un dímero de argón ---------- 4

Figura 3. Relación de la polarizabilidad con la dosis media efectiva anestésica en cadenas hidrocarbonadas ---------- 5

Figura 4. ED50 de diversos alcanoles, sobre cola de renacuajo (M. J. Pringle, 1981) ---------- 7

Figura 5. Coordenadas atómicas de la fenilalanina como ejemplo ---------- 13

Figura 6. Lípido DPPC, antes (izquierda) y después (derecha) de la minimización de la energía (EM). ---------- 14

Figura 7 PBC en el plano x, y ---------- 15

Figura 8 a) Un rombo dodecaedro y un octaedro truncado, b) cajas cubicas, rómbicas dodecaédricas, y del octaedro truncado. ---------- 16

Figura 9. Interacción Lennard-Jones ---------- 18

Figura 10. Angulo diedro en GROMACS: a) principios del ángulo diedro, b) Potencial del ángulo diedro ---------- 20

Figura 11. Representación en colores de la distribución de los componentes de membrana: Chl (Azul), DPPC (Amarillo), SM (Morado), GM1 (Verde), DOPC (Rojo) ---------- 22

Figura 12. Representación gráfica de una célula Voronoi ---------- 28

Figura 13. Distancias del centro de masa de la bicapa al centro de masa del fármaco, en función del tiempo. Lidocaína (cuadros); procaína (círculos); tetracaína (triángulos). Las líneas negras identifican la región polar superior de la membrana, y el centro de la bicapa está en Z = 7 nm. ---------- 30

Figura 14. (A) Perfil de densidad de masa, del agua, lípidos, lidocaína, procaína y tetracaína. (B) Posición final esquemática de cada fármaco para ilustrar su orientación final. Los fondos muestran diferentes regiones de la bicapa de lípidos superior. El centro de la bicapa está en Z = 7 nm. ---------- 31

Figura 15. Imagen representativa de los perfiles de energía. Estos se elaboran al calcular la interacción de cada fármaco, a un tiempo determinado, con cada lípido de la superficie de la membrana superior (un arreglo de 10 x 10 lípidos). Cada perfil muestra la morfología de ambos potenciales, Coulomb (graficas superiores) y Lennard-Jones (graficas inferiores). Las escalas en el plano X-Y están en unidades de lípidos (∼0.8 nm). ---------- 34

Figura 16. (A) Sección media de la membrana DPPC control; (B) Membrana bajo la influencia de lidocaína; (C) Membrana bajo la influencia de procaína; (D) Membrana bajo la influencia de tetracaína. Comparando (A) con (B-D) los efectos de los fármacos son notorios. ---------- 35

Figura 17. Entropía configuracional de Schlitter de dos membranas puras (a 37 y 44°C) y de las membranas bajo la influencia de lidocaína, procaína y tetracaína. El error estadístico de cada medición es de 0.5 J/kmol. ---------- 36

Figura 18. El parámetro de orden de la membrana control de DPPC (a 37 y 44°C) y DPPC-tetracaína. Cada cadena hidrocarbonada está representada por sn-1 y sn-2. ---------- 37

Figura 19. Perfil de densidad de masas: agua (línea negra), DPPC (línea roja), Chl (línea rosa), DOPC (línea azul), GM1 (línea verde), y SM (línea naranja). El inset muestra el perfil de densidad de masa de: C10 (triangulo azul), C12 (círculo rojo), C14 (cuadro negro) ---------- 39

Figura 20. (a) Rebanada de la membrana control sin perturbar. La balsa de lípidos bajo la influencia de (b) C10, (c) C12, y (d) C14. Los alcoholes se representan en amarillo. Un color fue asignado a cada molécula de la membrana para fácilmente diferenciarlos: DPPC (rojo), Chl (verde), GM1 (morado), SM (blanco) y DOPC (color átomo estándar). Comparando (a) con (b-d) los alcoholes inducen efectos notables ---------- 40

Figura 21. Entropía configuracional de Schlitter de las membranas bajo la influencia de C10, C12 y C14. El error estadístico para cada medición es 0.5 J/kmol ---------- 42

Figura 22. Parámetro de orden de los lípidos (a1, a2) DPPC, (b1, b2) DOPC, (c1, c2) GM1 y (d1, d2) SM, cada uno con sus respectivas condiciones del sistema (Control: cuadros negros, C10: puntos rojos, C12: rombos azules y C14: triángulos verdes). a1, b1, c1 y d1 representan el sn-1 de la cola hidrocarbonada y a2, b2, c2 y d2 la sn-2 ---------- 43

Resumen

Cientos de sustancias poseen acción anestésica. Sin embargo, a pesar de décadas de investigación, no existe una teoría integral capaz de conciliar todos los aspectos detrás de la anestesia general. En cuanto a su forma de acción se refiere existen dos tendencias principales para describir dicho proceso, la primera y más aceptada es que tienen un efecto directo sobre las proteínas de membrana que regulan el impulso nervioso. La segunda teoría se enfoca más en los lípidos de la membrana en la cual se toman en cuenta propiedades más tangibles de la misma como su compresibilidad. Ésta tiene un efecto más generalizado y menos especifico que el sugerido por los receptores proteicos de la membrana, sin embargo, no se ha podido comprobar por completo dicho proceso.

En este trabajo se estudian las propiedades mecánicas y estructurales mediante dinámica molecular (MD), de dos sistemas diferentes de lípidos, con la finalidad de dar soporte a la importancia de éstos en relación a la anestesia. El primer sistema está compuesto por lípidos principalmente saturados (DPPC), en presencia de anestésico locales lidocaína, procaína y tetracaína. En el segundo sistema se estudia el efecto anestésico que un grupo de moléculas llamadas alcanoles o alcoholes primarios presentan, ya que éstos, a cierta longitud de la cadena de carbonos, muestran un punto en el que se pierde por completo la potencia anestésica. Éste fenómeno se conoce como el cut-off.

Aún no se sabe cuál es el mecanismo molecular responsable de dicho comportamiento, sin embargo, en este trabajo buscamos dar no sólo una explicación a la razón del cut-off, sino hacer un comparativo de los resultados de ambos sistemas con la finalidad de sentar las bases para entender el proceso anestésico.

Se analizaron parámetros como: entropía configuracional, área por lípido, parámetro de orden, entre otros. Esto con la finalidad de evaluar el cambio que las moléculas lidocaína, procaína y tetracaína tienen sobre la membrana de DPPC, y en el caso de los alcoholes primarios para dar una explicación al fenómeno del cut-off.

Abstract

Hundreds of substances poses anesthetic action. However, despite decades of research, there's no theory capable to conciliate all aspects behind the general anesthesia. There are two main models that portray such process. The first and more accepted one states a direct effect over the proteins receptors of the membrane that regulates the nervous impulse. The second gives more emphasis on the membrane lipids, in which more tangible properties are taken in consideration, such as its compressibility. This model poses a more general and less specific way of action that the one suggested by the membrane protein receptors.

In this work we are up to study the mechanical and structural properties whit molecular dynamics (MD), of two different lipid systems, whit the objective to provide support on their importance related to anesthesia. The firs system is mainly compose of saturated lipids (DPPC), in the presence of local anesthetics lidocaine, procaine and tetracaine. On the second system we decide to ramp up the complexity of the MD by studying the anesthetic effect that a group of molecules named alkanols or primary alcohols presents, due that these ones at a certain carbon chain length, show a specific point in which the anesthetic potency is lost, such phenomenon is known as cut-off.

There's still no explanation to the molecular mechanism responsible of such behavior, but in our work we seek not just to offer an explanation to the cut-off, but to make a comparison of bout system's results, with the goal in mind to provide the basis of how the anesthetic process takes place.

We used the following parameters: configurational entropy, area per lipid, order parameter, among others. This with the objective to evaluate the changes that lidocaine, procaine and tetracaine molecules have over the DPPC membrane, and in the case of the primary alcohols to offer an explanation to the cut-off phenomenon.

Agradecimientos

Agradezco especialmente a mi esposa, a mi familia, por estar siempre acompañándome en las buenas y en las malas, al Dr. Jesús Carlos Ruiz, a mis compañeros de trabajo por el apoyo brindado, y por último un agradecimiento al Conacyt por el apoyo económico brindado.

Capítulo 1

Introducción

El efecto que tienen diversos fármacos sobre una célula en particular es un tema de gran importancia. Entender de qué manera una molécula puede desencadenar una serie de eventos en su blanco facilitaría la tarea de buscar nuevas estrategias específicas y eficientes para tratar un cierto problema. Existen infinidad de trabajos que intentan dar una posible explicación a dicho fenómeno, la gran mayoría de éstos tienen una aproximación por lo general meramente biológica.

Veamos el caso de los fármacos denominados anestésicos y sus efectos en un organismo. La principal vía de acción es la de inhibir o bloquear el impulso nervioso (1-3). Éstos se pueden dividir en dos grandes grupos, los anestésicos locales (4) y los generales (5). Los primeros cumplen la función antes mencionada en una región muy delimitada del organismo, mientras que los segundos lo hacen de manera global.

La aproximación biológica explica el efecto de los anestésicos mediante receptores proteicos específicos, principalmente receptores de Na+2 (6-9). Esta visión está soportada por innumerables artículos, un ejemplo son éstos (10-12). Sin embargo, por más que se desea llegar a una conclusión definitiva, más y más se aleja del objetivo inicial, ya que nuevas incógnitas son presentadas al problema.

Además de la teoría de los receptores específicos, existen otras que buscan explicar el efecto anestésico desde otro punto de vista: tal como las propiedades mecánicas de la membrana e inclusive el cambio en la polarizabilidad de la misma (13,14). Ambas aproximaciones tienen un sentido más biofísico, donde se trata de abordar el proceso de acción de un anestésico como un evento termodinámico.

Para profundizar un poco sobre cómo se pueden afectar las propiedades mecánicas de la membrana, explicando así el efecto anestésico, primero tenemos que recordar los trabajos de los científicos Meyer y Overton (15,16). Ellos reportaron una importante propiedad que las moléculas anestésicas poseen: la capacidad de disolverse en aceite o soluciones hidrofóbicas. De aquí surge la conocida regla del

coeficiente de partición (17), la cual indica qué tan soluble una molécula es en agua o en aceite. Ésta separa las moléculas en dos denominaciones muy importantes: polares y no-polares.

En el caso de las moléculas no-polares (anestésicos), surge una relación muy notoria entre la solubilidad que éstas poseen en grasas y el efecto anestésico que presentan. Se sabe que a mayor solubilidad mayor será su eficiencia (Figura 1). A partir de esta evidencia, surgen las bases para describir la teoría que previamente mencionamos.

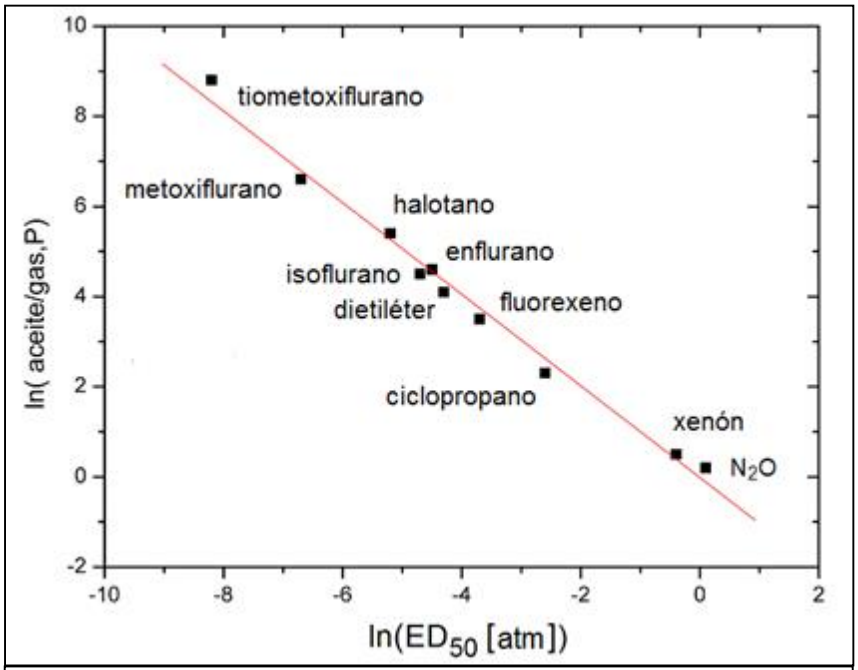


Fig. 1: Relación del coeficiente de partición aceite-gas con la dosis media efectiva de los anestésicos.

Uno de los componentes que abundan en la membrana son los lípidos, que no son más que ácidos grasos saturados o insaturados, según sea el caso. Éstos resultan ser un medio óptimo para que los anestésicos se solubilicen. Al analizar en detalle la interacción que las moléculas anestésicas tienen con los lípidos, se entiende cómo la estabilidad de la membrana puede verse comprometida. Las

interacciones lípido-lípido pueden debilitarse, causando así la fluidización de la misma. Esto evita que se propague un pulso mecánico el cual se sabe está embebido en el potencial de acción (18). Por ende se bloquea la señal nerviosa.

A continuación describiremos a los lípidos. Estructuralmente hablando, éstos están unidos entre ellos principalmente por interacciones de corto alcance (19), las cuales son meramente interatómicas. Éstas pueden ser descritas por 3 potenciales:

a) El potencial de London (Figura 2) (Fritz London 1900-1954):

$$W = \frac{-C_{disp}}{D^6} = -\frac{3}{2} \cdot \frac{\alpha_1 \cdot \alpha_2}{(4\pi\varepsilon_0)^2 D^6} \cdot \frac{hv1v2}{(v1 + v2)} \quad (1.1)$$

El cual surge a partir de la inducción de dipolos momentáneos; donde W es la energía potencial, D es la distancia entre las moléculas en cuestión, C_{disp} describe la interacción entre dos moléculas no polares y su magnitud dependerá de que tan polarizables (α) sean. $v1$ y $v2$ son las energías ionizantes para aproximar la energía libre de Helmholtz. Éste es sólo uno de los tres componentes de Van der Waals, que son fuerzas muy grandes a nivel intermolecular y que se dan a muy corto alcance (20).

b) El potencial de Debye:

$$W = \frac{-C_{ind}}{D^6} = \frac{\mu^2 \alpha}{(4\pi\varepsilon_0)^2 D^6} \quad (1.2)$$

que resulta de la interacción entre un dipolo permanente y la inducción del mismo en otra molécula apolar. Es un juego entre la polarizabilidad (α) y el momento dipolar (μ) de éstas.

c) El potencial de Keesom (Hendrik Keesom, 1876–1956):

$$W = \frac{-C_{orient}}{D^6} = \frac{\mu_1 \cdot \mu_2}{3(4\pi\varepsilon_0)^2 \kappa_B T D^6} \quad (1.3)$$

que se da entre dos moléculas con dipolos permanentes. Los actores principales de ésta son sus momentos dipolares (μ).

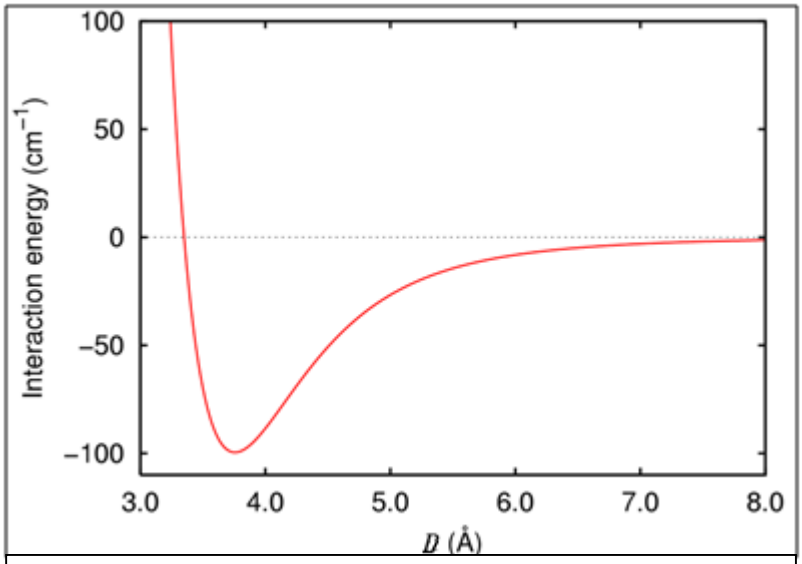


Fig. 2: Potencial de London, energía de interacción de un dímero de argón (R. A. Aziz, 1993).

La participación de estos tres potenciales estabilizan las uniones interatómicas. El potencial de London tiene mayor relevancia que los otros dos, tanto así que es el principal responsable de mantener unidas las membranas de lípidos.

Qué tan estable es o no la membrana es responsabilidad directa de qué tan polarizables (α) sean las moléculas que la componen, ya que estas podrán tener mayor o menor grado de interacción. La estructura de las moléculas determina de gran manera este parámetro, cuando mayor sea la longitud de la cadena hidrocarbonada o grupos apolares lineales, más grande será su α, y menor en el

caso opuesto. Como estamos hablando de moléculas “hidrofóbicas”, entonces se puede establecer que a mayor α, mejor efecto anestésico tendrá la molécula, siendo éste proporcional a la solubilidad que tenga en la membrana y la fluidización que le provoque, ya que la interacción anestésico-lípido será aún mayor que la de lípido-lípido. Kharakoz (2001) muestra la concentración necesaria para alcanzar el punto de fusión en membranas de DPPC contra la dosis anestésica crítica, ED_{50} (Figura 3), que concuerda claramente con lo que previamente se menciona.

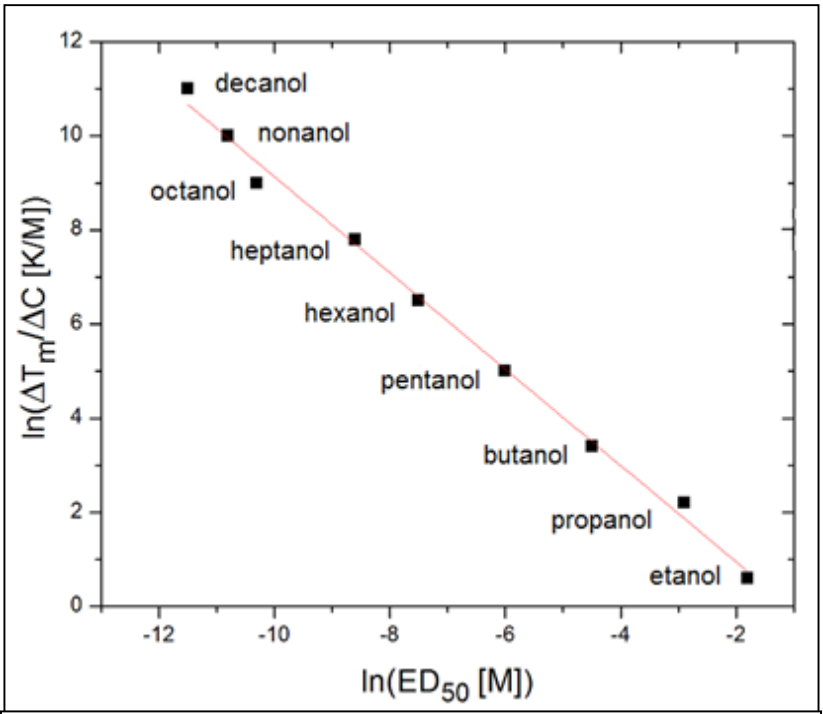


Fig. 3: Relación de la polarizabilidad con la dosis media efectiva anestésica en cadenas hidrocarbonadas.

Con la finalidad de entender más a detalle de qué manera una membrana puede verse afectada por moléculas que tienen un potencial anestésico, utilizamos MD para elaborar un sistema formado principalmente por DPPC, al cual le adicionamos 3 anestésicos locales (lidocaína, procaína y tetracaína). Al analizar los

cambios que sufre la membrana modelo, nos fue posible exponer las bases que trata de rescatar la teoría de los lípidos.

Es evidente que estudiar un modelo tan simple (DPPC) en presencia de anestésicos locales es sólo un inicio para dar luz al fenómeno que envuelve el mecanismo molecular de la anestesia. Es por ello que además de este primer sistema decidimos emular una condición más apegada a la realidad: el fenómeno de cut-off que presentan los alcanoles.

Desde hace ya un siglo se sabe que tienen propiedades anestésicas (20,21) en renacuajos (Figura 4), donde se evaluó la pérdida del reflejo de rigidez como criterio de anestesia (22). En dicho experimento, al incrementar el largo de la cadena de hidrocarbonos, su potencia también aumenta ($= -{}^{1}/_{ED_{50}}$, Donde ED_{50} es la dosis para alcanzar el 50% del efecto).

Sin embargo, conforme la longitud de la cadena hidrocarbonada de los alcoholes alcanza cierto número, la potencia anestésica comienza a disminuir hasta el punto en el que desaparece por completo. Éste es un fenómeno conocido como el cut-off.

Anesthetic potency of alcohols in tadpoles at room temperature

Alcohol	C_n	$ED_{50} \pm SE$
		M
Ethanol	2	0.12 ± 0.01
Propanol	3	$5.4 \pm 0.6 \times 10^{-2}$
Butanol	4	$1.2 \pm 0.1 \times 10^{-2}$
Hexanol	6	$7 \pm 1 \times 10^{-4}$
Octanol	8	$6 \pm 0.9 \times 10^{-5}$
Decanol	10	$1.3 \pm 0.2 \times 10^{-5}$
Dodecanol	12	$5.4 \pm 0.9 \times 10^{-6}$
Tridecanol	13	$3.7^a \pm 2 \times 10^{-5}$
Tetradecanol	14	Inactive
Hexadecanol	16	Inactive
Eicosanol	20	Inactive
cis-Δ^9-Tetradecenol	14	$3 \pm 6 \times 10^{-5}$
trans-Δ^9-Tetradecenol	14	$3 \pm 1.5 \times 10^{-5}$
cis-Δ^9-Hexadecenol	16	$4.2^a \times 10^{-5}$ (ED_{25})
trans-Δ^9-Hexadecenol	16	$4.2^a \times 10^{-5}$ (ED_{25})
cis-Δ^9-Octadecenol	18	Inactive
trans-Δ^9-Octadecenol	18	Inactive
cis-Δ^{11}-Eicosenol	20	Inactive

[a] Partial anesthetic.

Fig. 4: ED_{50} de diversos alcanoles, sobre cola de renacuajo (M. J. Pringle, 1981).

En el caso de los alcanoles, o alcoholes primarios como también se conocen, el potencial anestésico se estabiliza justo después del 1-undecanol (C_{11}) y desaparece por completo en el 1-tridecanol (C_{13}) (22). Debido a las propiedades físico-químicas de éstos, en relación con la solubilidad que tienen con los lípidos y su potencial anestésico, uno esperaría que fuera lineal a lo largo de toda la serie. Sin embargo, aun y cuando estas moléculas son linealmente solubles en membranas de lípidos, la actividad biológica cede. Esto rompe directamente la regla de Meyer-Overton y redirecciona la atención del mecanismo de acción hacia una hipótesis basada en sitios específicos de una proteína. (23)

A pesar de esa aparente derrota de la teoría de lípidos, un efecto similar al cut-off ha sido encontrado en términos de desorden de la membrana (24); donde el parámetro de orden (ΔS) disminuye al estar en presencia de alcoholes primarios anestésicos (C_8, C_{10}, C_{12}), mientras que no sufre alteraciones significativas (C_{14}), o

inclusive un incremento se observa en alcoholes primarios con cadenas hidrocarbonadas de mayor longitud (C_{16}, C_{18}). Similarmente, un punto de cut-off se ha observado en la temperatura de transición de fase (T_m) de membranas modelo de lípidos homogéneos;(25, 26) por el desplazamiento de la T_m a menores o mayores temperaturas.

En proteínas, el cut-off se ha propuesto a través de sitios de unión específicos localizados en cavidades donde aminoácidos hidrofóbicos están expuestos a la fase acuosa, tal que cuando el alcohol exceda el tamaño de dicho espacio, grupos metilos adicionales no incrementan el potencial anestésico (27). Dicho fenómeno ha sido explorado en una amplia variedad de canales iónicos relacionados a la neurotransmisión. Particularmente en receptores nicotínicos de acetilcolina (AChR) de neuronas corticales, donde alcoholes primarios de cadena corta (C_{1-3}) tienen una acción excitatoria, mientras que los de cadena larga (C_{5-12}) inhiben la actividad del canal (28).

Es también sabido que el potencial de inhibición del receptor N-metil-D aspartato (NMDAr) incrementa exponencialmente para C_{1-5}, alcanzando un punto máximo en C_{6-8} y posterior a este desaparece abruptamente (29). Otros estudios en el receptor ácido γ-aminobutírico tipo A ($GABA_A$) indican que la potenciación inhibitoria debida a alcoholes exhibe un cut-off entre C_{12-13}, mientras que diferentes puntos de cut-off han sido encontrados para alcoholes de cadena corta en receptores Kainato, AMP y 5-HT3 (27). Tales diferencias en los puntos de cut-off registrados para proteínas receptoras relacionadas con la neurotransmisión, están lejos de explicar el reportado en renacuajos (entre C_{12} y C_{14}).

Es una posibilidad que dicho fenómeno, *in vivo*, ha sido subestimado por las condiciones experimentales o inclusive puede ser un resultado particular del modelo bilógico empleado (24). Por lo tanto, es claro que tal observación, en lípidos y en proteínas, no se pueden usar para armar un mecanismo general capaz de explicar el fenómeno del cut-off.

Consecuentemente, algunos autores han sugerido que los alcoholes actúan sobre los lípidos periféricos que rodean las proteínas de membrana (30,31). Ellos sugieren que dichas moléculas pueden interrumpir la interacción lípido-proteína, al alterar los puentes de hidrogeno de las proteínas y las cabezas polares de los lípidos (32) o interrumpiendo el orden estructural en los dominós de lípidos que rodean las proteínas (30). Hoy en día estos dominios se conocen como “balsas de lípidos”, los cuales son parches de membrana pequeños (10-200 nm), heterogéneos, altamente dinámicos, enriquecidos en esterol y esfingolípidos, capaces de compartimentalizar la distribución espacial de receptores y los efectores proximales de membrana (33). Las balsas de lípidos se han convertido en parte integral de la terminología para explicar una variedad de procesos biológicos, tal como se puede ver en los siguientes reportes (34, 35).

Se ha sugerido que las balsas de lípidos puede que estén mediando la respuesta anestésica al alterar las propiedades físicas de los lípidos, lo cual a su vez puede afectar la función normal de particulares receptores proteicos implicados en la neurotransmisión (36, 37). Inclusive, algunos canales iónicos neuronales relacionados con anestesia mediada por alcoholes, tales como NMDA (38) y $GABA_A$ (39), están asociados a este tipo de dominios lipídicos (40). Hoy en día no existen estudios físico-químicos que afronten la anestesia general bajo la hipótesis de balsa de lípidos, en particular: el fenómeno del cut-off de los alcoholes primarios.

Lo anterior es una de las principales motivaciones de nuestro trabajo donde trataremos de presentar, por primera vez, un estudio sistemático del fenómeno del cut-off de los alcoholes primarios en balsas de lípidos modelos cercanas a las proporciones apropiadas de los lípidos relacionados con la sinapsis.

Realizamos un estudio comparativo del sistema modelo DPPC y de la balsa de lípidos por medio de simulación de dinámica molecular (MDS), para entender a nivel atómico qué mecanismos pueden estar relacionados con la respuesta de dichos sistemas al estar en presencia de sus respectivas moléculas anestésicas, y

evaluar si dicho proceso puede brindar evidencia definitiva para explicar el proceso anestésico.

En el caso del modelo de DPPC se tomó el registro de las energías de interacción de Coulomb y Lennard-Jones, entropía configuracional y parámetro de orden para evaluar la magnitud del cambio de la membrana en presencia de lidocaína, procaína y tetracaína. En cuanto al modelo de la balsa de lípidos se tomaron los registros de área por lípido, parámetro de orden de cada lípido, ancho de la membrana y entropía configuracional para rastrear el más mínimo cambio que cada uno de los lípidos que conforman el sistema sufre a lo largo de la simulación. De ambas simulaciones esperamos encontrar algún mecanismo que ambos modelos compartan con la intención de aportar información para explicar el proceso anestésico.

Capítulo 2

Objetivos e Hipótesis

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo general

Evaluar el cambio estructural y la estabilidad configuracional de los modelos de lípidos, en presencia de diversas moléculas anestésicas.

2.1.2 Objetivos particulares

1.- Medir el cambio en la orientación de las colas lipídicas y la configuración de las membranas lipídicas, en presencia de lidocaína, procaína, tetracaína, y alcoholes. Por medio del registro del parámetro de orden (S_{cd}), cambios en el ancho de la membrana y la entropía configuracional de Schlitter.

2.- Hacer un comparativo de los registros mencionados y establecer las similitudes en los sistemas estudiados.

2.2 Hipótesis

Los efectos que los diversos anestésicos desempeñan en la membrana están altamente relacionados con la estabilidad de la misma, regulando de esta manera la potencia anestésica que pueden desempeñar.

Capítulo 3

Dinámica molecular (DM)

Para realizar las corridas de dinámica molecular (DM) se utilizó el software Gromacs 4.5.4, el cual resuelve la ecuación de movimiento de Newton para un sistema de N átomos interactuando entre sí:

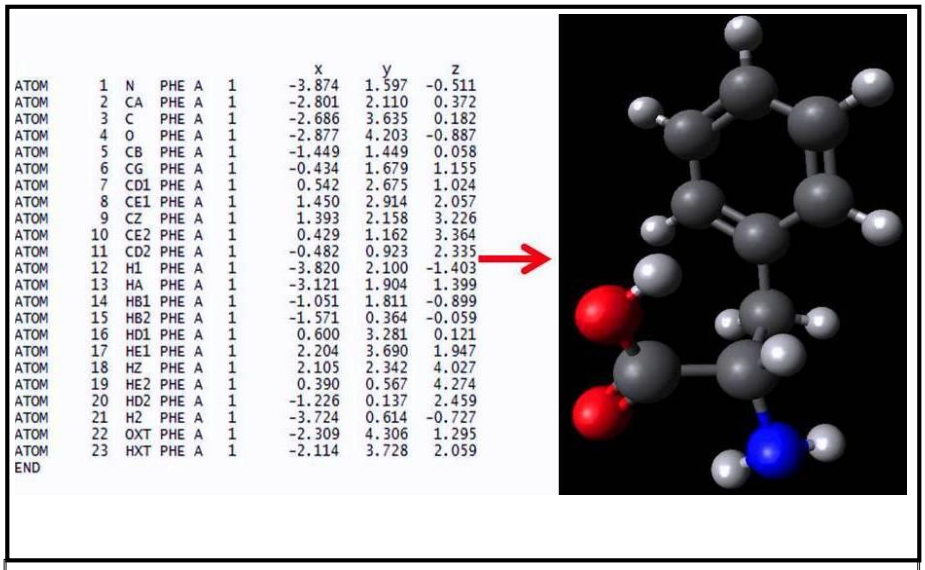
$$m_i \frac{\partial^2 \boldsymbol{r}_i}{\partial t^2} = \boldsymbol{F}_i, \; i = 1 \ldots N. \qquad (3.1)$$

Las fuerzas son las derivadas negativas de una función potencial V (r1, r2…., rn):

$$\boldsymbol{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \boldsymbol{r}_i} \qquad (3.2)$$

La ecuación se resuelve simultáneamente en pequeños pasos, a cada uno de estos intervalos de tiempo se le acopla la presión y la temperatura que se mantienen en valores indicados por el usuario.

Para configurar el sistema se necesita de un conjunto de coordenadas que indica la posición inicial de la moléculas en un plano tridimensional virtual (x, y, z) que localizan el lugar exacto donde se encuentra cada uno de los átomos (Figura 5), los cuales tienen también una masa y una carga determinada.



						x	y	z
ATOM	1	N	PHE	A	1	-3.874	1.597	-0.511
ATOM	2	CA	PHE	A	1	-2.801	2.110	0.372
ATOM	3	C	PHE	A	1	-2.686	3.635	0.182
ATOM	4	O	PHE	A	1	-2.877	4.203	-0.887
ATOM	5	CB	PHE	A	1	-1.449	1.449	0.058
ATOM	6	CG	PHE	A	1	-0.434	1.679	1.155
ATOM	7	CD1	PHE	A	1	0.542	2.675	1.024
ATOM	8	CE1	PHE	A	1	1.450	2.914	2.057
ATOM	9	CZ	PHE	A	1	1.393	2.158	3.226
ATOM	10	CE2	PHE	A	1	0.429	1.162	3.364
ATOM	11	CD2	PHE	A	1	-0.482	0.923	2.335
ATOM	12	H1	PHE	A	1	-3.820	2.100	-1.403
ATOM	13	HA	PHE	A	1	-3.121	1.904	1.399
ATOM	14	HB1	PHE	A	1	-1.051	1.811	-0.899
ATOM	15	HB2	PHE	A	1	-1.571	0.364	-0.059
ATOM	16	HD1	PHE	A	1	0.600	3.281	0.121
ATOM	17	HE1	PHE	A	1	2.204	3.690	1.947
ATOM	18	HZ	PHE	A	1	2.105	2.342	4.027
ATOM	19	HE2	PHE	A	1	0.390	0.567	4.274
ATOM	20	HD2	PHE	A	1	-1.226	0.137	2.459
ATOM	21	H2	PHE	A	1	-3.724	0.614	-0.727
ATOM	22	OXT	PHE	A	1	-2.309	4.306	1.295
ATOM	23	HXT	PHE	A	1	-2.114	3.728	2.059
END								

Fig. 5: Coordenadas atómicas de la fenilalanina como ejemplo.

Una vez teniendo estas coordenadas en función del tiempo se obtiene una trayectoria, la cual brinda información de parámetros básicos tales como orientaciones atómicas, ángulos interatómicos, campos de fuerza, etc.

3.1 Algoritmos

Una de las principales características del código Gromacs es la gran variedad de tareas que éste puede realizar. Por ejemplo, en una proteína que está formada por un número determinado de aminoácidos, cada uno de estos tiene un punto de equilibrio en donde todas las cargas se encuentran balanceadas (Figura 6). Esto se hace tomando en cuenta aspectos como $K_B T$ y la energía cinética que tenga el sistema. También se evalúan las interacciones electrostáticas de corto alcance, ya que de esta manera cada uno de los átomos interactuará con sus vecinos cercanos, de forma atractiva o repulsiva según sean sus cargas.

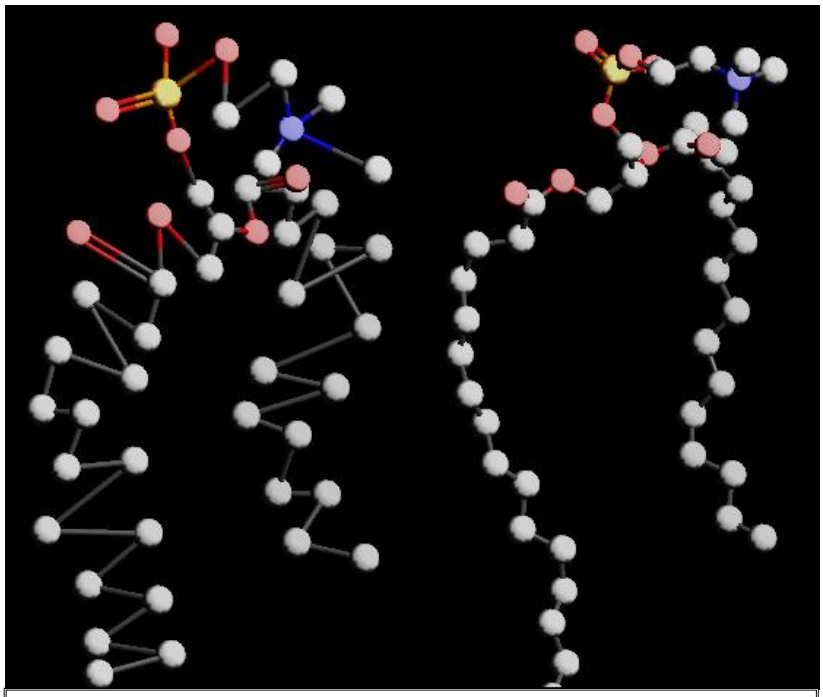


Fig. 6: Lípido DPPC, antes (izquierda) y después (derecha) de la minimización de la energía (EM).

Para que las simulaciones que se realizan en el Gromacs sean lo más realistas posibles se utilizan condiciones de frontera periódica (CFP), que hacen referencia al espacio en el que se realiza la simulación, permitiendo al sistema no perder la capacidad de ser parte de un todo. Por ejemplo, en nuestro trabajo, que se propone modelar una membrana de lípidos, se podría ver como una pequeña porción del total de la membrana celular y de esta manera garantizar la exactitud de replicar lo que ocurre en la célula.

3.2 El concepto de condiciones de frontera periódica CFP

Las condiciones de frontera periódica, o PBC por sus siglas en inglés, tienen ciertos límites para mantener su integridad funcional, que están definidos por las dimensiones del espacio de trabajo. Por ejemplo, cada una de las moléculas que están en dicha caja, hablando de interacción de cargas de largo alcance, no pueden

interactuar con otras moléculas que se localicen a una mayor distancia que sea la mitad de la longitud del vector de la cara de la caja de menor distancia. A este término se le denomina “distancia de corte”.

$$R_c < \frac{1}{2}\min(\|\mathbf{a}\|, \|\mathbf{b}\|, \|\mathbf{c}\|), \qquad (3.2.1)$$

En cuanto a interacciones de corto alcance se utiliza la convención de cercanía, la cual toma sentido al estar próximo a una de las paredes del espacio de simulación (Figura 7). Ésta interactúa con aquella que se encuentra más cerca y no con el resto, evitando de esta manera resultados erróneos e inesperados.

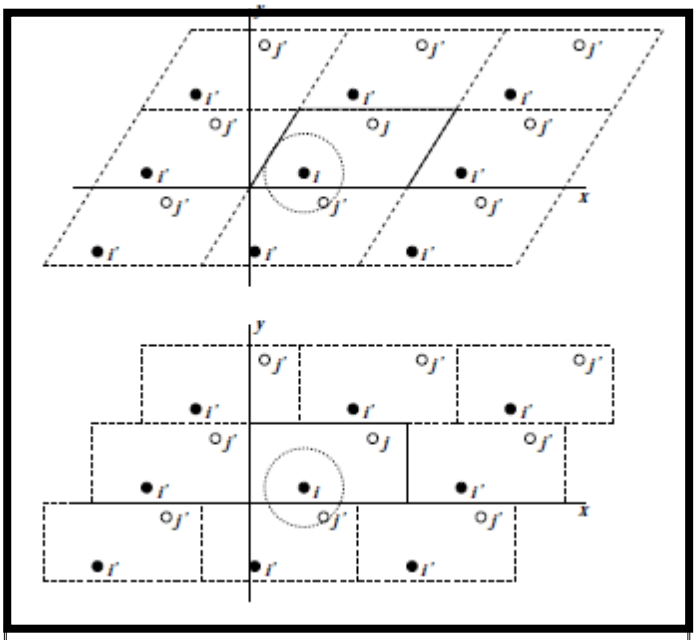
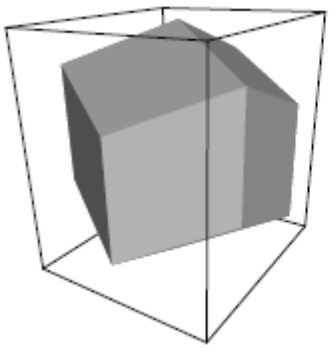


Fig. 7: PBC en el plano x, y.

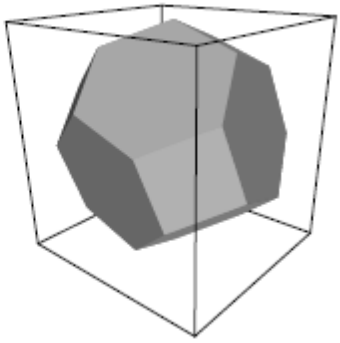
El espacio de simulación puede abarcar unas cuantas formas geométricas dependiendo de la simulación con la que se trabaje: un cubo, un rombo dodecaedro (xy-cuadrado), un rombo dodecaedro (xy-hexágono) y un octaedro truncado (Figura 8). Este último es lo más cercano en conjunto con el CFP a un círculo que se tiene

en este programa. Cada una de las formas geométricas ofrece ventajas o desventajas, dependiendo de qué es lo que se busca. En este trabajo la mejor opción para modelar el sistema de la membrana biológica sería un rectángulo gracias a que utilizaríamos CFP con restricción en el eje z dejando libre el plano x,y.

a)



b)



box type	image distance	box volume	box vectors a	b	c	box vector angles ∠bc	∠ac	∠ab
cubic	d	d^3	d 0 0	0 d 0	0 0 d	90°	90°	90°
rhombic dodecahedron (xy-square)	d	$\frac{1}{2}\sqrt{2}\,d^3$ $0.707\,d^3$	d 0 0	0 d 0	$\frac{1}{2}d$ $\frac{1}{2}d$ $\frac{1}{2}\sqrt{2}\,d$	60°	60°	90°
rhombic dodecahedron (xy-hexagon)	d	$\frac{1}{2}\sqrt{2}\,d^3$ $0.707\,d^3$	d 0 0	$\frac{1}{2}d$ $\frac{1}{2}\sqrt{3}\,d$ 0	$\frac{1}{2}d$ $\frac{1}{6}\sqrt{3}\,d$ $\frac{1}{3}\sqrt{6}\,d$	60°	60°	60°
truncated octahedron	d	$\frac{4}{9}\sqrt{3}\,d^3$ $0.770\,d^3$	d 0 0	$\frac{1}{3}d$ $\frac{2}{3}\sqrt{2}\,d$ 0	$-\frac{1}{3}d$ $\frac{1}{3}\sqrt{2}\,d$ $\frac{1}{3}\sqrt{6}\,d$	71.53°	109.47°	71.53°

Fig. 8: Formas geométricas del espacio de simulación: a) Un rombo dodecaedro y un octaedro truncado, b) cajas cubicas, rómbicas dodecaédricas, y del octaedro truncado.

3.3 Concepto de grupos

Otra ventaja de Gromacs yace en la particularidad de poder asignar distintas moléculas en grupos. Por ejemplo, los lípidos, las proteínas, el colesterol y así

sucesivamente para que a cada uno de estos constituyentes se le puedan asignar parámetros específicos.

La forma en que Gromacs resuelve la ecuación de movimiento de Newton es utilizando un algoritmo llamado leap-frog que integra esta ecuación. Por medio de la posición “r” a tiempo “t” y una velocidad “v” a tiempo t-1/2Δt; actualiza las posiciones y velocidades usando las fuerzas F(t) determinada por la posición a tiempo t:

$$\boldsymbol{v}(t+\frac{1}{2}\Delta t) = \boldsymbol{v}(t-\frac{1}{2}\Delta t)+\frac{\Delta t}{m}\boldsymbol{F}(t) \quad (3.3.1)$$

$$\boldsymbol{r}(t+\Delta t) = \boldsymbol{r}(t)+\Delta t\boldsymbol{v}(t+\frac{1}{2}\Delta t) \quad (3.3.2)$$

La temperatura y la presión del sistema se mantienen constantes según lo deseado por medio de algoritmos de Berendsen y Nosé-Hoover. Para la temperatura, se utilizan ensambles microcanónicos NVT (numero constante de partículas, volumen constante, temperatura constante), NVE (numero constante de partículas, volumen constante, ensamble de energía constante); al tomar en cuenta estos parámetros se comienza a realizar la simulación.

3.4 Funciones de interacción

Las funciones de potencial que describe a las moléculas pueden dividirse en tres partes:

1.- No-asociadas (Non-bonded): Interacciones entre átomos que no están unidos por un enlace covalente.

2.- Asociados (Bonded): Todo aquel átomo que tiene la capacidad de formar un enlace covalente con otro átomo.

3.- Arresto (Restrains): Todo aquel parámetro que involucre una distribución espacial de las moléculas, por ejemplo, ángulos, orientaciones, diedros.

3.4.1 Interacciones No-asociadas

Este término en Gromacs está definido por diversas unidades, una de las cuales es la repulsiva, otra la de dispersión y por ultimo una de Coulomb. La parte repulsiva y de dispersión son combinadas en la ecuación de Lennard-Jones (Figura 9) que abarca interacciones electrostáticas de corto y largo alcance:

$$V_{LJ}(r_{ij}) = \frac{C_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^{6}} \qquad (3.4.1.1)$$

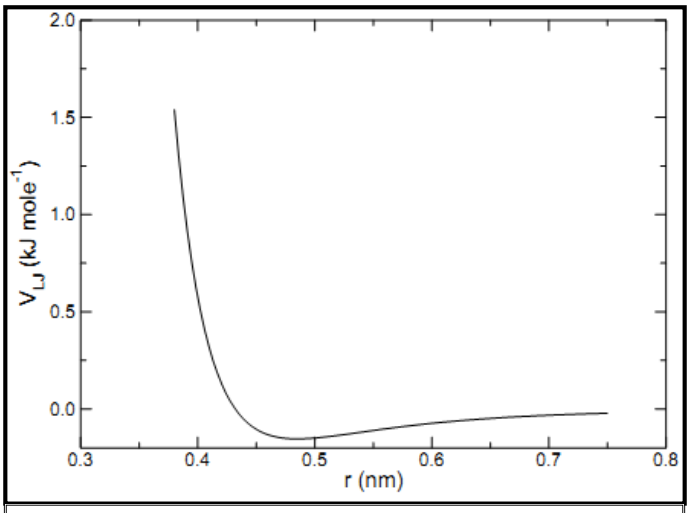


Fig. 9: Interacción Lennard-Jones.

3.4.2 Interacciones Asociadas

Estas se separan en uniones no exclusivamente de dos cuerpos (bond estretching), sino también de tres cuerpos (bond angle), y cuatro cuerpos (dihedral -angle). Para cada una de las interacciones se utilizan diferentes ecuaciones.

En el caso de dos cuerpos (bond stretching) i y j, unidos por un enlace covalente se utilizan potenciales armónicos:

$$V_b\left(r_{ij}\right) = \frac{1}{2}k_{ij}^{b}(r_{ij} - b_{ij})^2 \quad (3.4.2.1)$$

Con una fuerza dada por:

$$\boldsymbol{F}_i(\boldsymbol{r}_{ij}) = k_{ij}^{b}(r_{ij} - b_{ij})\frac{\boldsymbol{r}_{ij}}{r_{ij}} \quad (3.4.2.2)$$

Para tres cuerpos (Bond angle) i-j-k, se representa también con potenciales armónicos en el ángulo θijk:

$$V_a(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2}k_{ijk}^{\theta}(\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^{0})^2 \quad (3.4.2.3)$$

La ecuación de la fuerza está dada por la regla de la cadena:

$$\begin{aligned} \boldsymbol{F}_i &= -\frac{dV_a(\theta_{ijk})}{d\boldsymbol{r}_i} \\ \boldsymbol{F}_k &= -\frac{dV_a(\theta_{ijk})}{d\boldsymbol{r}_k} \quad \text{where} \quad \theta_{ijk} = \arccos\frac{(\boldsymbol{r}_{ij}\cdot\boldsymbol{r}_{kj})}{r_{ij}r_{kj}} \\ \boldsymbol{F}_j &= -\boldsymbol{F}_i - \boldsymbol{F}_k \end{aligned} \quad (3.4.2.4)$$

Por último, en el caso de cuatro cuerpos (Figura 10):

$$V_{id}(\xi_{ijkl}) = \frac{1}{2}k_{\xi}(\xi_{ijkl} - \xi_0)^2 \quad (3.4.2.5)$$

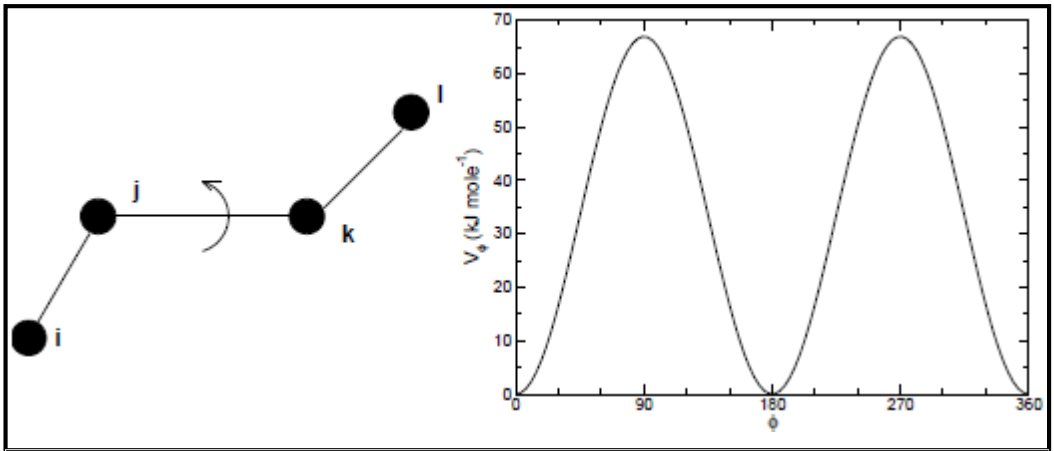


Fig. 10: Angulo diedro en GROMACS: a) principios del ángulo diedro, b) Potencial del ángulo diedro.

3.4.3 Interacciones de Arresto

Estos parámetros sirven principalmente para restringir los movimientos del sistema como tal. Por ejemplo, que las moléculas tengan un rango de libertad finito, hablando por ejemplo de los ángulos que se puede o no formar en las diversas moléculas, las distancias que éstas deben tener. En resumen, son parámetros meramente estructurales para que el sistema no pierda estabilidad.

3.5 Campo de fuerza

El campo de fuerza está compuesto principalmente por dos partes: En la primera se agrupan las diferentes ecuaciones que se utilizan para generar las energías potenciales y sus derivadas (Fuerza), constituidas principalmente por las funciones de interacción antes mencionados. La segunda parte es la asignación de los parámetros de estas ecuaciones, tales como cargas de cada uno de los átomos de las diversas moleculas, potenciales de Coulomb y Lennard-Jones, etc., que vienen dentro de los paquetes que incluye Gromacs:

- GROMOS-87
- GROMOS-96
- AMBER94
- AMBER96
- AMBER99
- AMBER99SB
- AMBER99SB-ILDN
- AMBER03
- AMBERGS
- CHARMM27
- MARTINI

Para nuestra modelación utilizaremos los parámetros de GROMOS-96, ya que éste cuenta con distintos parámetros de diversas moléculas que utilizaremos en nuestra simulación como los lípidos insaturados y el colesterol entre otras. De esta manera nuestro sistema será lo más realista posible.

Capítulo 4

Material y métodos

La estructura general del primer sistema de simulación (ver capítulo 5) está formado por 193 moléculas de Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), 97 de las cuales forman la cara superior y el resto la inferior. Los vectores de la caja fueron de 10x9x10nm (x,y,z). La extensión superficial de la membrana corresponde al plano XY mientras que Z representa la altura.

El caso particular del segundo sistema de simulación (ver capítulo 6) está formado por una combinación de 5 diferentes moléculas, 4 tipos de lípidos y colesterol (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), Esfingomielina (SM), Monosialotetrahexosilgangliosido (GM1) y Colesterol (Chl)), que son los elementos más representativos de la capa externa, obtenida de membrana sináptica de cerebro de rata (41, 42). La distribución final de lípidos empleada fue: 9.70% SM, 4.85% Chl, 31.34% DPPC, 13.06% GM1, and 41.04% DOPC. Intencionalmente el lípido DOPC se posiciono en la periferia de la membrana rodeando al resto de los componentes con la intención de emular una balsa de lípidos (Figura 11).

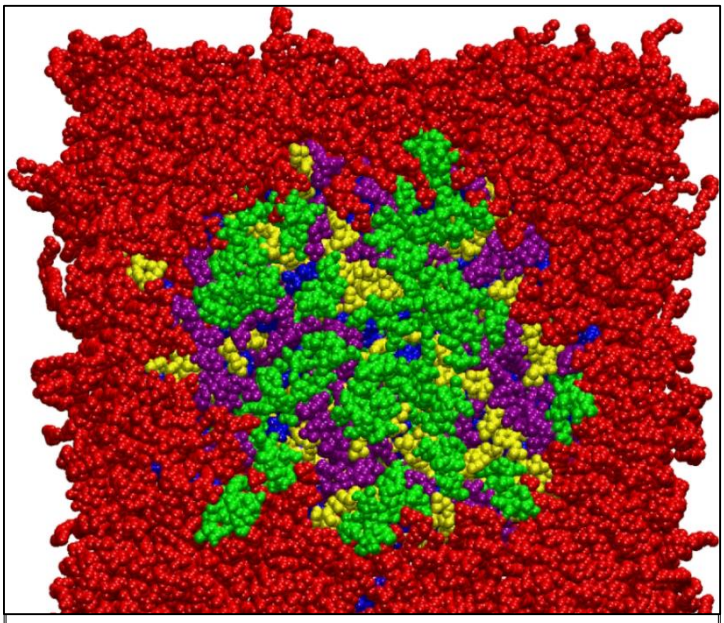


Fig. 11: Representación en colores de la distribución de los componentes de membrana: Chl (Azul), DPPC (Amarillo), SM (Morado), GM1 (Verde), DOPC (Rojo).

En total se agruparon 693 de estas moléculas con la distribución mencionada en una caja de 15x15x14nm (x, y, z) para formar la bicapa. La extensión superficial de la membrana corresponde al plano XY mientras que Z representa la altura.

La elaboración de ambos modelos se llevó a cabo con el software CellMicrocosmos (47), el cual es un programa que permite armar una membrana con una distribución aleatoria de sus componentes. Se puede controlar el número, tipo y forma de organización de los lípidos que la conforman, de igual manera se puede manipular el área de la membrana de interés. Está específicamente diseñado para preparar sistemas para Dinámica Molecular (MD).

Una vez que se forma la bicapa de ambos sistemas, se corre una serie de pasos de minimización de energía con MD buscando valores de $1x10^3$kJ/mol/nm. La estructuras tridimensionales, campos de fuerza y cargas parciales de las moléculas, fueron obtenidas de las siguientes fuentes: DPPC fue extraída de Krueger J. y Fischer W.B. 2008 (43), DOPC de Berger O., Edholm O. y Jähnig F. 1997 (44), GM1 de Lemkul J. A. y Bevan D. R. 2011 (45), SM de Chiu S.W., et al 2009 (46), 1-Decanol (C_{10}), 1-Dodecanol (C_{12}) and 1-Tetradecanol (C_{14}) se obtuvieron de una versión ligeramente modificada de Jorgensen W. L. et al 2005 1-octanol (47), Chl se basó en lo establecido en la carpeta de GROMACS con cambios menores (48).

A la membrana obtenida de DPPC se le adicionaron 10 moléculas, de los 3 distintos fármacos: lidocaína, procaína y tetracaína, teniendo así 3 modelos base de este sistema.

En el caso del segundo sistema se le adicionaron 10 moléculas, de los alcoholes primarios: C_{10}, C_{12}, C_{14}, teniendo así 3 modelos base sobre los que trabajamos.

Todas las cargas y estructuras se validaron con el servidor en línea PRODRG (disponible en línea http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg/) y swissParam (http://swissparam.ch/) siguiendo las indicaciones de diversas referencias (49-50), como método de comprobación. Los resultados coincidieron con los artículos reportados.

La distribución de las moléculas de ambos sistemas, en la superficie de la membrana, se realizó de manera aleatoria. Las distancias de éstas se buscaron que tuvieran al menos 2nm de diferencia entre cada una y que la posición inicial fuera mínimo de 1nm y máximo 2nm con respecto a la capa externa de la membrana.

En el caso particular del primer sistema se utilizaron 15151 moléculas de agua SPC (Single Point Charge), para solvatar el sistema mientras que para el segundo se adicionaron alrededor de 217891 moléculas de agua SPC (Single Point Charge), para cubrir el espacio total de simulación. Se sustituyeron moléculas de agua en ambos sistemas por NaCl hasta obtener una concentración iónica de 0.145M, con la finalidad de simular las condiciones de una solución fisiológica.

Como un paso previo a la simulación MD, los diversos sistemas se hicieron pasar por una serie de corridas cortas de minimización de energía hasta alcanzar valores de $1x10^3$kJ/mol. Se utilizaron los parámetros de la carpeta GROMOS53A6 Force field para la información de los enlaces, ángulos diedrales e interacciones de Lennard-Jones (para mayores referencias sobre éstos ver Oostenbrink 2005 (51)).

Los parámetros seleccionados para las simulaciones fueron las siguientes:

-Se empleó PME (Particle Mesh Ewald) para calcular las interacciones electrostáticas. En el caso de Lennard-Jones se asignó un cut-off de 1.2nm al igual que para Coulomb. Se utilizó el algoritmo leap-frog con un intervalo de tiempo de 2 fs como método de solución de las ecuaciones de movimiento. Las condiciones de frontera (PBC) xyz fueron empleadas y la temperatura del sistema se mantuvo constante a 37°C a una presión de 1bar. El centro de masa general del sistema fue removido rotacional y translacionalmente para cada intervalo de tiempo. Las

longitudes de los enlaces fueron contenidas utilizando el algoritmo LINCS con una tolerancia geométrica de 10^{-4}.

En general, el método que se siguió para realizar la simulación MD se puede englobar en 3 pasos:

1.- Equilibración NVT (constante Numero de partículas, volumen y temperatura). Se utilizó el algoritmo Nose-Hoover para mantener la temperatura del sistema, en relación al volumen y el número de partículas que lo componen de manera constante a 37°C durante la simulación. Se corrieron 100ps con intervalos de 2fs, se asignaron velocidades iniciales a las partículas por medio de la distribución Maxwel-Boltzmann.

2.- Equilibración NPT (constante Numero de partículas, Presión y Temperatura). Lo que se buscó fue mantener constante la presión del sistema utilizando el algoritmo de Parrinello-Rahman. Los pasos fueron igual que en el proceso de NVT, sin incluir la generación de las velocidades iniciales.

3.- Por último, una vez que el sistema se encontraba equilibrado se prosiguió a realizar las corridas de la simulación de dinámica molecular. El tiempo total fue de 100ns, con intervalos de 2fs

Como trabajos previos han demostrado que simulaciones de membranas y moléculas pequeñas pueden ser drásticamente subestimadas debido a la presencia de barreras escondidas de muestreo, involucrando la lenta reorganización de la interface agua-lípido debido a la respuesta de la inserción de dicha molécula (52,53), los procesos antes mencionados se corrieron en ausencia de moléculas anestésicas para pre-equilibrar el sistema, y al final de la corrida éstas fueron adicionadas y se agregaron 100ns extras de simulación. Es importante mencionar que existen artículos donde se utilizan longitudes de tiempo similares (49,50).

Como hemos mencionado antes, empleamos el paquete de simulación GROMACS v.4.6.3. El periodo de los 100ns posteriores a la pre-equilibración fueron empleados para el análisis de los resultados. Fue posible reducir los grados de

libertad del sistema al aplicar la metodología de átomos unidos, donde sólo se adicionaron los hidrógenos polares de las moléculas.

4.1 Parámetro de Orden (S_{CD})

El parámetro de orden (S_{CD}) nos dará información de la orientación promedio de las colas hidrofóbicas de la membrana:

$$S^{i+1} = \frac{1}{2}\langle 3cos^2\theta^{i+1} - 1\rangle, \quad (4.1.1)$$

donde θ^{i+1} es el ángulo entre el plano z de la caja de simulación y el plano molecular en consideración. Los paréntesis angulares denominan la promediación sobre tiempo y moléculas. Los parámetros de orden pueden variar entre 1 que indica una completa alineación con la interfaz normal y -1/2 indicando una total alineación perpendicular a la normal, con un valor de 0 en el caso de una orientación isotrópica. Este parámetro nos da a entender de qué manera se encuentran las colas de los lípidos, y nos revelará el efecto que tienen los fármacos y las condiciones ambientales sobre las membranas.

4.2 Entropía de Schlitter

La entropía configuracional de Schlitter se realizará siguiendo la metodología sugerida en (54):

$$S_{true} < S = \frac{K_B}{2} In\ det\left[1 + \frac{K_b T_{e^2}}{\hbar^2} D\right], \quad (4.2.1)$$

donde K_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, e es el número de Euler, y ħ es la constante de Planck dividida entre $2\boldsymbol{\pi}$. Aquí D es la matriz de covarianza de masa-peso de las coordenadas cartesianas atómicas, definida como:

$$D = \langle \left[M^{1/2} (r - \langle r \rangle) \right] \otimes \left[M^{1/2} (r - \langle r \rangle) \right] \rangle, \quad (4.2.2)$$

donde r es el vector de coordenadas cartesianas 3N-dimencional de las N partículas consideradas después del ajuste de mínimos-cuadrados en una estructura referencia, M es la matriz diagonal de 3N-dimenciones, que contiene las masas de estas partículas. Los paréntesis angulares denotan ensamblaje de pro mediación y la notación representa la matriz con elementos μ, v igual a $a_\mu * b_v$. Para todos los sistemas considerados, la configuración inicial (después de la equilibración) fue utilizada como estructura de referencia para realizar el ajuste de mínimos-cuadrados de las configuraciones de trayectoria. La entropía de toda la membrana fue tomada en consideración.

4.3 Área Por Lípido

El área por lípido fue determinada de manera individualizada para las 5 moléculas de la bicapa, esto para proporcionar una mejor comprensión sobre el efecto de los alcoholes sobre los componentes de la membrana. Este paramento fue medido utilizando el programa APL@Voro (disponible en http://www.aplvoro.org), que rastrea las coordenadas de ciertos átomos clave. En este estudio en particular utilizamos el átomo P del grupo fosfato de DPPC, DOPC, y SM; el átomo O del grupo hidroxilo del Chl, y el átomo N del grupo carboxílico que sigue la cola lipídica del GM1, la razón de ser elegidos es por que ofrecen una gran estabilidad en comparación con otras regiones de la misma molécula. Posteriormente, dichos átomos se proyectan en un plano, y se calcula utilizando estas coordenadas proyectadas (Figura 12).

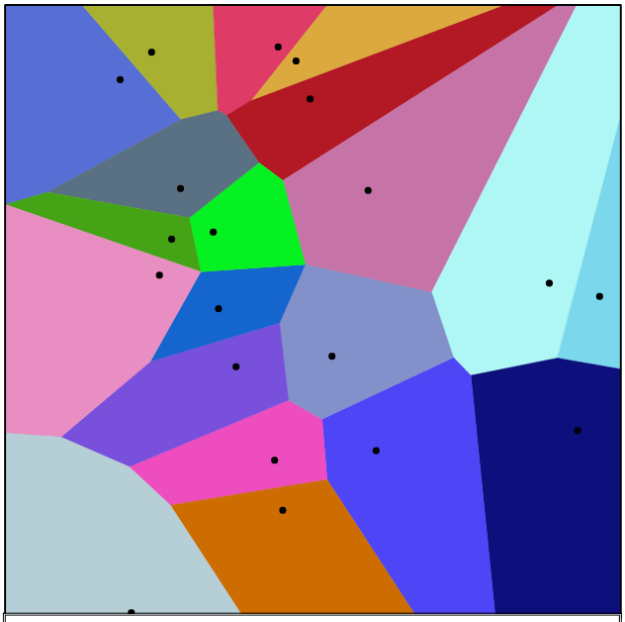


Fig. 12: Representación gráfica de una célula Voronoi.

El área proyectada A(l) de un lípido l presente en la capa L, representado por un átomo clave pl, es después definido como el área correspondiente de la célula Voronoi (el área del polígono) AVC(pl,L):

$$A_{VC(pl,L)} = \frac{1}{2}\sum_{i=0}^{N=1}(x_i y_{i+1} - y_i x_{i+1}), \quad (4.3.1)$$

donde N es el número de vértices de la célula de Voronoi y (x_i, y_i), con i mod(N), son las coordenadas de los vértices de la célula de Voronoi. El área total proyectada de un lípido A(l) descrita por N átomos claves es después definida como:

$$A(l) = \sum_{i=0}^{N} A_{VC(i,L)}., \quad (4.3.2)$$

El ancho de la membrana se midió empleando el centro de masa (COM) de la región polar de ambas capas de la bicapa y se promediaron sus distancias en el plano Z a lo largo del tiempo de simulación.

Capítulo 5

DPPC: Resultados y Discusión

5.1 Localización molecular

Las trayectorias de los fármacos al interactuar con las membranas se muestran en la Figura 13. Como se puede apreciar, las 3 moléculas permean la membrana con diferentes grados de penetración. Lidocaína y procaína se insertan en la región intermediaria (entre las regiones hidratadas y no hidratadas), mientras que la última (tetracaína) es capaz de alcanzar el núcleo alcano (Figura 14B). Es importante remarcar que aun y cuando no hay trabajos reportados de procaína utilizando MDS, la penetración de lidocaína y tetracaína coinciden perfectamente con resultados observados en trabajos previos (55,56).

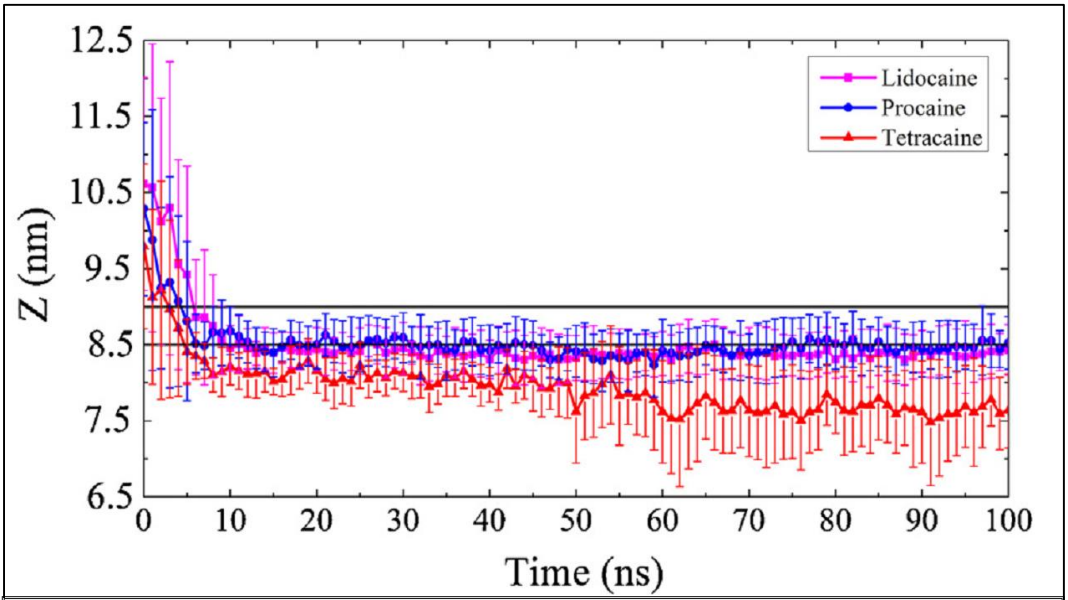


Fig. 13: Distancias del centro de masa de la bicapa al centro de masa del fármaco, en función del tiempo. Lidocaína (cuadros); procaína (círculos); tetracaína (triángulos). Las líneas negras identifican la región polar superior de la membrana, y el centro de la bicapa está en Z = 7 nm.

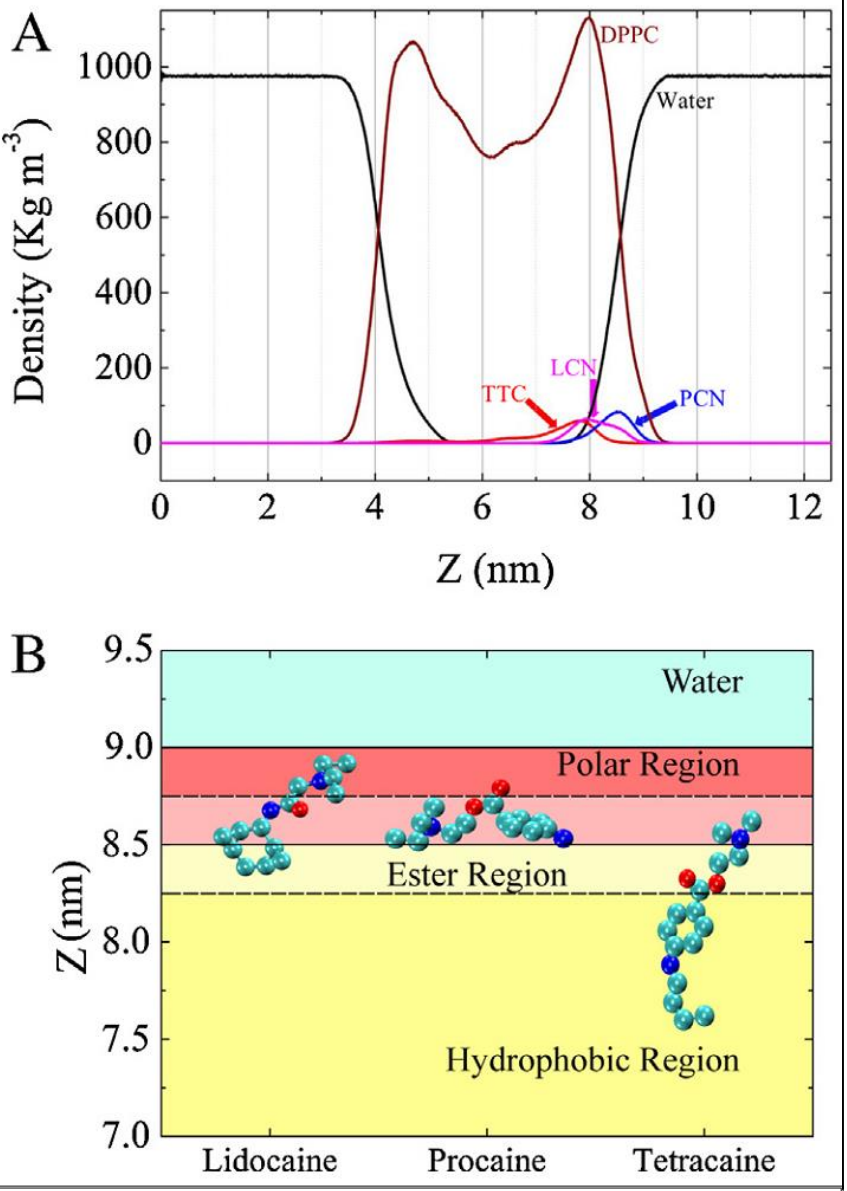


Fig. 14: (A) Perfil de densidad de masa, del agua, lípidos, lidocaína, procaína y tetracaína. (B) Posición final esquemática de cada fármaco para ilustrar su orientación final. Los fondos muestran diferentes regiones de la bicapa de lípidos superior. El centro de la bicapa está en Z = 7 nm.

5.2 Energías de interacción

En la Figura 15 describimos una imagen representativa del perfil energético dispersivo y de Coulomb, que produce la interacción de cada droga con la membrana en un determinado tiempo. Es importante decir que éstos no son landscapes de energía, sino sólo imágenes para mostrar cómo los fármacos interactúan con los lípidos, con la finalidad de mostrar la relevancia de las contribuciones de Coulomb y van der Waals. En otras palabras, no estamos interesados en medir la energía libre del sistema fármaco-membrana a cada penetración, sino queremos obtener una noción grafica de las energías de interacción que un fármaco produce con el lípido cercano a él.

La Figura 15 demuestra claramente que todos los anestésicos muestran una mayor interacción de van der Waals que la de Coulomb, y los lípidos fuera de la zona de acción (de una molécula particular de fármaco) no sienten su presencia (la membrana permanece sin cambio alguno). Esto nos hace entender por qué existe una dosis efectiva para alcanzar el efecto completo (fluidización) en la membrana.

El promedio de las energías de interacción (de los últimos 80 ns de la simulación y los 10 fármacos) se muestran en la tabla 1. En la Figura 16 describimos la sección media de la membrana donde el efecto estructural que cada fármaco tiene sobre ella es evidente.

Un parámetro importante emerge de los valores de energía de la tabla 1: si la proporción del valor entre las energías de Lennard-Jones y Coulomb (aquí lo llamaremos γ) es mayor que 1, el fármaco tiene una gran probabilidad de difundir en la membrana. Moléculas polares, por ejemplo cafeína, tiene una mayor energía de Coulomb, por ende γ es menor que 1 (13). Esto significa que no puede entrar a la membrana.

Sin embargo, los perfiles mostrados en la Figura 15 (o los valores de γ) no son suficiente información para entender por qué, por ejemplo, la tetracaína produce más desorden que la lidocaína como se observa en la Figura 16. Se empleó el número de enlaces de rotación libre de los fármacos como un segundo parámetro para entender el desorden observado (vea Tabla 1). Por ejemplo, aun y cuando la tetracaína tiene un valor de interacción de van der Waals poco menor (comparado con la lidocaína, ver Figura 16), tiene también menor rigidez y por ello, debido a las energías térmicas, produce un mayor desorden una vez en el interior de la membrana.

Tabla 1: Resultados de la MD (error estadístico entre paréntesis). γ es el porciento entre las energías de Lennard-Jones y Coulomb.

	DPPC	LCN	PCN	TTC
Coulomb (kj/mol)		-8.88(3.55)	-15.56(7.10)	-10.87(4.68)
Lennard-Jones (kj/mol)		-34.12(8.12)	-27.62(4.86)	-30.78(6.73)
γ		3.84	1.77	2.84
Distancia al centro de la bicapa (nm)		1.83(0.03)	1.87(0.04)	1.47(0.05)
Entropía configuracional Schlitter (kj/kmol)	20.64	22.64	22.67	23.09
Enlaces de rotación libre		5	8	9

Aun y cuando la sección de la membrana descrita en la Figura 16 (extraída de la MDS) es útil para visualizar el desorden de la membrana producido por los fármacos, aun se requieren formas más cuantitativas para medir cómo las propiedades estructurales de la bicapa son modificadas por ellas. Por eso necesitamos evaluar las entropías configuracionales y sus parámetros de orden.

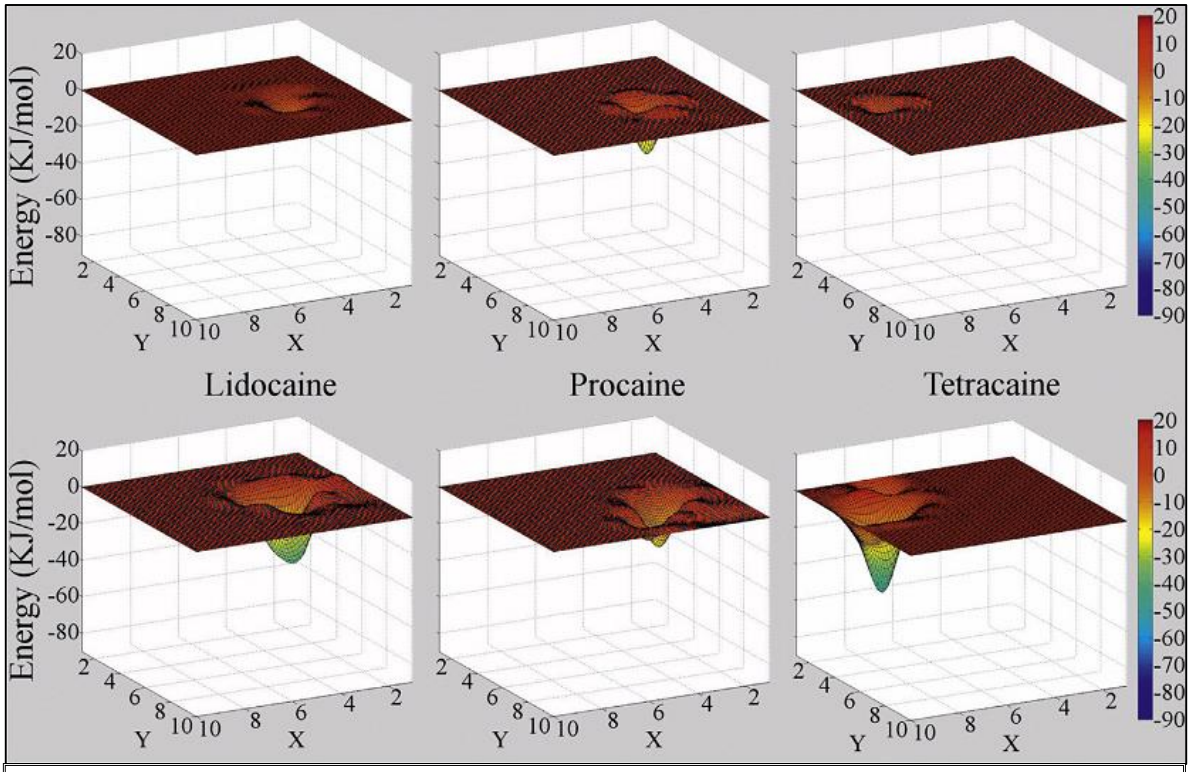


Fig. 15: Imagen representativa de los perfiles de energía. Estos se elaboran al calcular la interacción de cada fármaco, a un tiempo determinado, con cada lípido de la superficie de la membrana superior (un arreglo de 10 x 10 lípidos). Cada perfil muestra la morfología de ambos potenciales, Coulomb (gráficas superiores) y Lennard-Jones (gráficas inferiores). Las escalas en el plano X-Y están en unidades de lípidos ($\sim$0.8 nm).

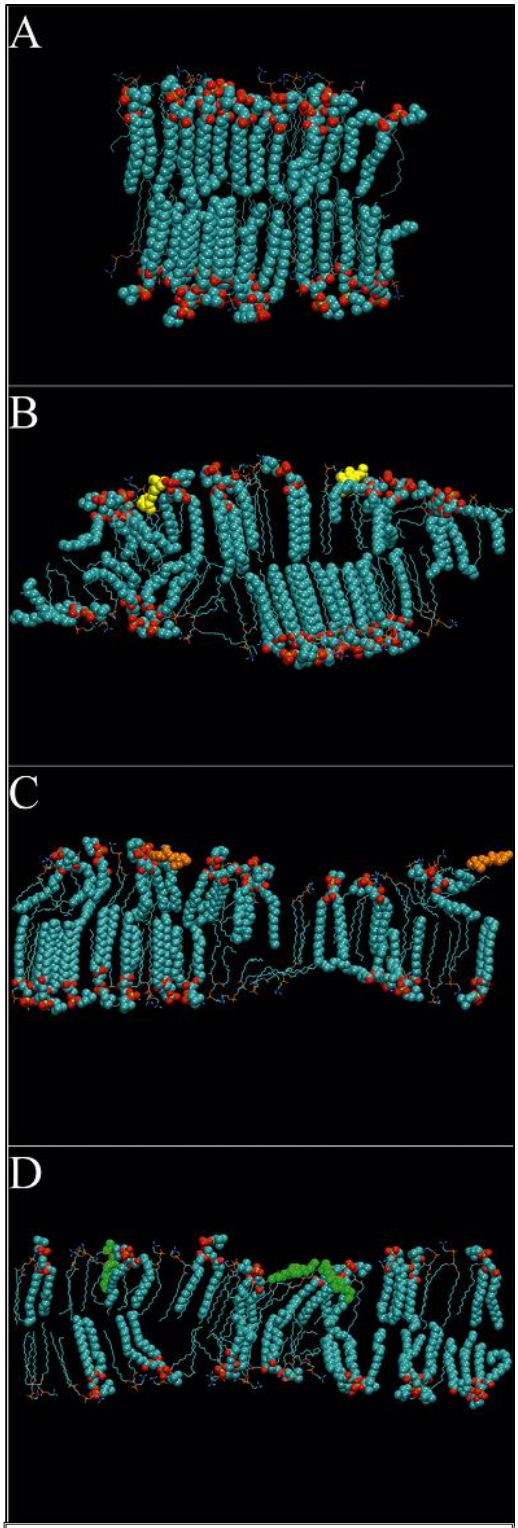


Fig. 16: (A) Sección media de la membrana DPPC control; (B) Membrana bajo la influencia de lidocaína; (C) Membrana bajo la influencia de procaína; (D) Membrana bajo la influencia de tetracaína. Comparando (A) con (B-D) los efectos de los fármacos son notorios.

5.3 Entropía Configuracional

Una muestra de 22 moléculas de DPPC se utilizó para calcular la entropía de la membrana; 11 moléculas por capa (superior e inferior). Toda la estructura molecular fue tomada en consideración. Las ultimas 5000 configuraciones (fuera de las 50000 posibles) fueron utilizados como estados para evaluar el valor final de la entropía de Schlitter. Como se ve en la Figura 17, los incrementos en los valores de la entropía de Schlitter revelan un patrón interesante. El menor de los valores lo presenta la membrana control, y los mayores, por lo menos un 10% más, para el caso cuando los anestésicos se encuentran internalizados.

Los resultados obtenidos indican que estos fármacos no-polares provocan desestabilización (fluidización) de la membrana. Como método de comprobación de nuestros hallazgos, evaluamos la entropía de Schlitter para una membrana control (sin fármacos) a una mayor temperatura (44ºC), donde la bicapa de DPPC se encuentra en un estado fluidizado. La Figura 17 incluye la entropía de este caso, y uno puede ver como tal valor es similar al obtenido bajo la influencia de lidocaína.

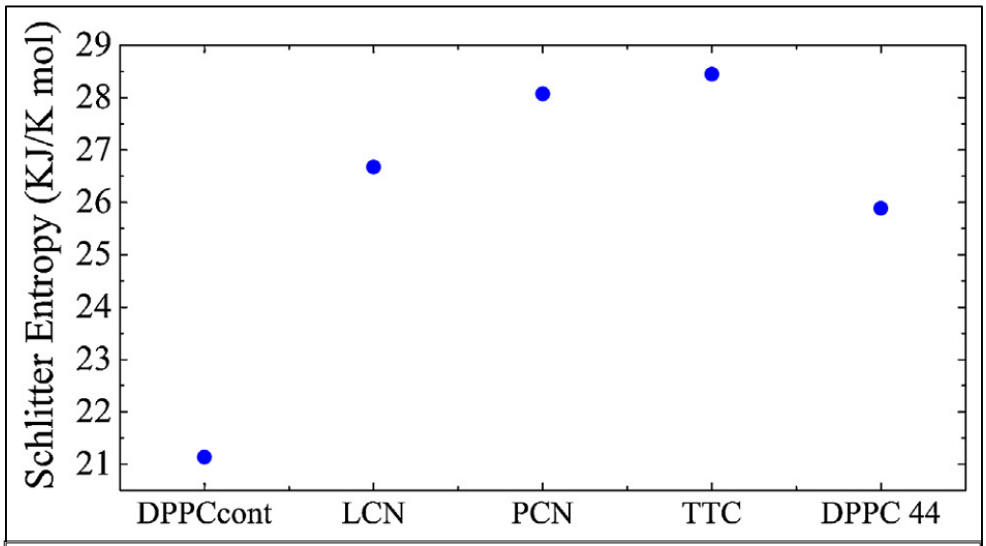


Fig. 17: Entropía configuracional de Schlitter de dos membranas puras (a 37 y 44ºC) y de las membranas bajo la influencia de lidocaína, procaína y tetracaína. El error estadístico de cada medición es de 0.5 J/kmol.

5.4 Parámetro de orden S_{CD}

En la Figura 18 mostramos el S_{CD} para la membrana control DPPC (a 37 y 44°C) y DPPC adicionada con tetracaína. Es claro que el orden de la membrana disminuye en presencia del anestésico, ofreciendo mayor evidencia de cómo los anestésicos fluidizan la bicapa. Estos parámetros están graficados para la membrana pura a mayor temperatura (44°C), notando que la temperatura da paso al aumento en la fluidización también.

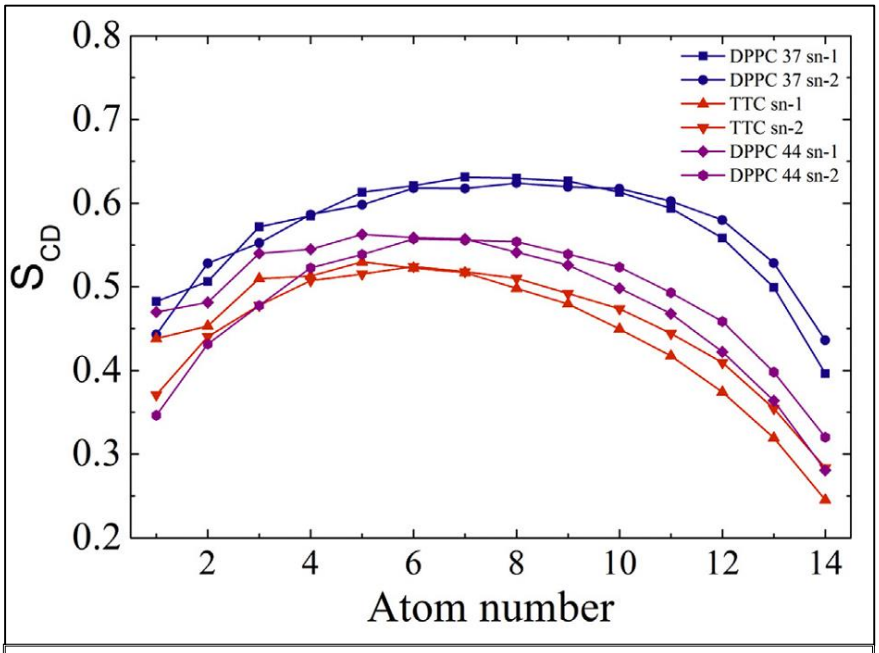


Fig. 18: El parámetro de orden de la membrana control de DPPC (a 37 y 44°C) y DPPC-tetracaína. Cada cadena hidrocarbonada está representada por sn-1 y sn-2.

Capítulo 6

Balsa de lípidos modelo: Resultados y Discusión

Todas las simulaciones fueron diseñadas acorde al modelo de balsa de lípidos (SM/Chl/DPPC/GM1/DOPC), ya que es representativo del principal escenario para evaluar la contribución individualizada de los lípidos al interactuar con los alcoholes. Se utilizaron alcoholes primarios de cadena entre C_{10} y C_{14} con la intención de rastrear el fenómeno del cut-off en tal membrana modelo.

6.1 Localización molecular

El perfil de densidades (Figura 19) muestra claramente como los tres alcoholes primarios permean la membrana, como era de esperar por sus coeficientes de partición (23), similar a lo que se observó en el modelo de DPPC. Sus distribuciones a lo largo de la membrana proporcionan información crucial en referencia al efecto de dichas moléculas; por ejemplo, C_{10} se localizó en el centro y las regiones polares en relación a la posición de los lípidos. Tal perfil es el resultado de los saltos constantes entre las dos capas, ya que la longitud del alcohol, en proporción a la del lípido y su polarizabilidad (57) hizo realmente difícil el mantener una interacción estable con la región hidrofílica de la membrana (58). Evidentemente, el perder su alineación vertical resulto en una alta desorganización de la estabilidad de la misma (Figura 20b). Es importante mencionar la preferencia que estos alcoholes tienen al lípido insaturado DOPC, dando soporte a lo que ya está reportado en literatura (59).

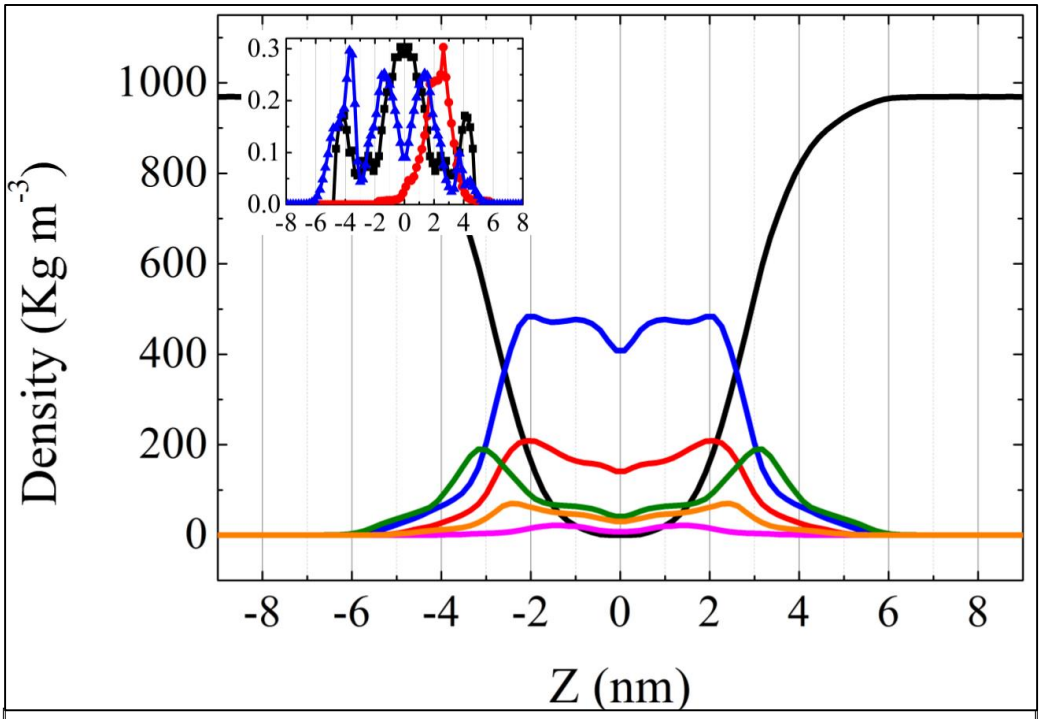


Fig. 19: Perfil de densidad de masas: agua (línea negra), DPPC (línea roja), Chl (línea rosa), DOPC (línea azul), GM1 (línea verde), y SM (línea naranja). El inset muestra el perfil de densidad de masa de: C_{10} (triangulo azul), C_{12} (círculo rojo), C_{14} (cuadro negro).

En el caso particular del C_{12} una vez se ancla a la bicapa, éste se alinea paralelamente a los lípidos y no se observan cambios significativos en la misma (Figura 20c). Sin embargo, como se demuestra posteriormente, este alcohol ordena ligeramente el sistema, dando paso al punto de cut-off.

Por ultimo C_{14} también se ancla en paralelo a la membrana, pero al mismo tiempo, salta de una capa a la otra al menos una vez durante el tiempo de simulación. Este comportamiento tipo flip-flop es consecuencia de su longitud relativa con la del lípido DOPC, ya que provee las condiciones óptimas para que C_{14} interactúe con la capa inferior de la bicapa, explicando de esa manera el proceso ocasional tipo flip-flop. El efecto de este alcohol es totalmente opuesto al de C_{10}, ya que sus 4 carbonos extras estabilizan la interacción lípido-alcohol (el número de átomos apolares en una molécula incrementa su polarizabilidad (60)). Esto rebela una atracción radial de las colas de los lípidos cercanos a este alcohol (Figura 20d),

que a su vez provee una mayor cohesión de la membrana. Tal efecto también se puede observar en C_{12} pero en menor magnitud.

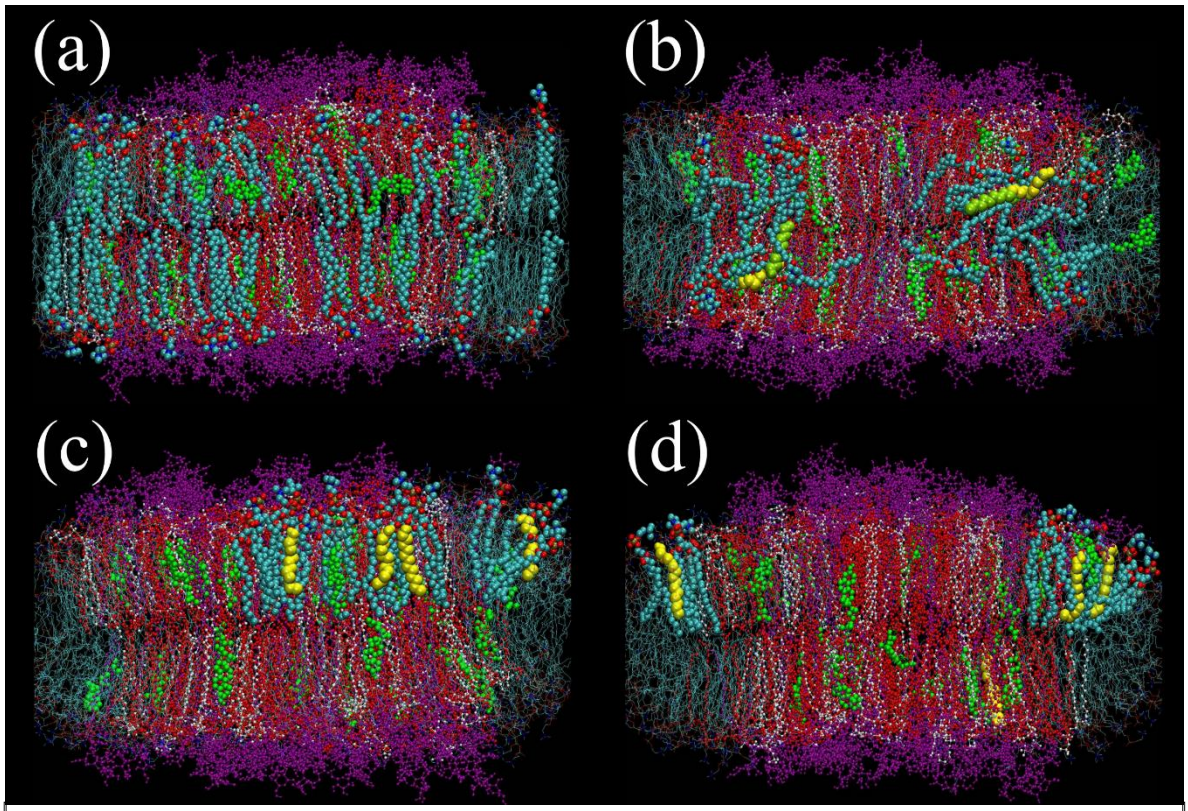


Fig. 20: (a) Rebanada de la membrana control sin perturbar. La balsa de lípidos bajo la influencia de (b) C_{10}, (c) C_{12}, y (d) C_{14}. Los alcoholes se representan en amarillo. Un color fue asignado a cada molécula de la membrana para fácilmente diferenciarlos: DPPC (rojo), Chl (verde), GM1 (morado), SM (blanco) y DOPC (color átomo estándar). Comparando (a) con (b-d) los alcoholes inducen efectos notables.

A esta altura resulta evidente que de ambos sistemas surge un proceso compartido en respuesta a las moléculas anestésicas, el cual es la desorganización (fluidización) u organización (rigidización) de la membrana. En ambos casos parece estar relacionado directamente con las propiedades inherentes de la interacción del lípido-anestésico, por el juego entre sus polarizabilidades.

6.2 Entropía Configuracional

Una muestra de 28 lípidos seleccionados al azar fueron tomados para calcular la entropía de la membrana: 7 DPPC, 1 Chl, 15 DOPC, 3 GM1, 2 SM. Esta selección fue basada en la proporción de cada una relativa al sistema. La estructura molecular completa fue tomada en cuenta para este análisis. Las ultimas 5000 configuraciones (de las 10,000 posibles) fueron usados como estados para evaluar el valor final de la entropía de Schlitter, mediante una subrutina dentro de GROMACS.

Como se ve en la Figura 21, los valores de Schlitter apoyan lo que previamente describimos. El menor de los valores registrados lo reporta el sistema de C_{14}, los resultados de la membrana control y C_{12} fueron ligeramente diferentes, sin embargo lo suficiente para diferenciarlos, y C_{10} presentó la mayor entropía. Estos resultados pueden ser explicados por el fenómeno del cut-off, ya que responde la pregunta de cómo C_{10} produce anestesia al desorganizar significativamente sus alrededores. Mientras que, C_{12} y C_{14} presentan el escenario opuesto: ellos proveen una mayor estabilidad, explicando así la ausencia del efecto anestésico.

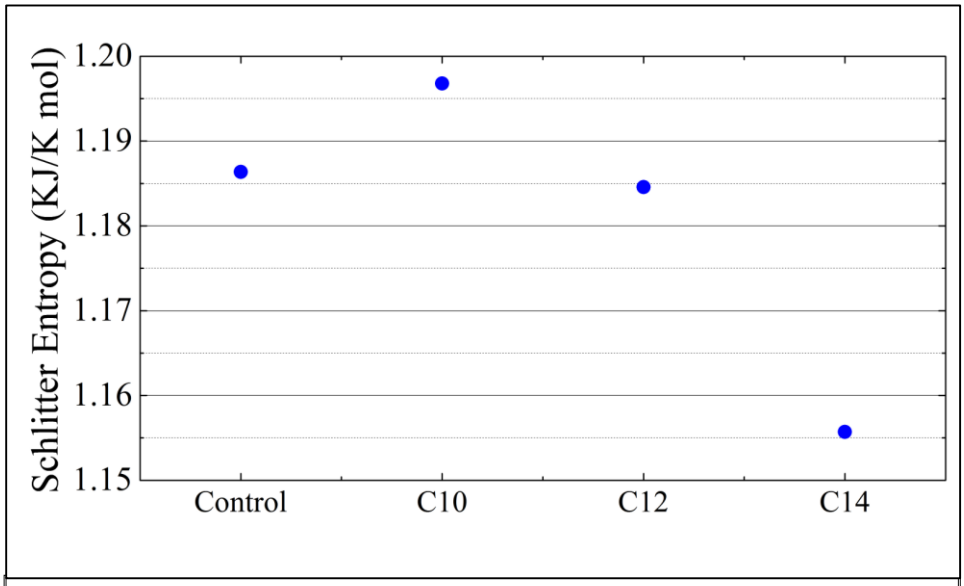


Fig. 21: Entropía configuracional de Schlitter de las membranas bajo la influencia de C_{10}, C_{12} y C_{14}. El error estadístico para cada medición es 0.5 J/kmol.

6.3 Parámetro de orden S_{CD}

En la figura 22 mostramos S_{CD} para los lípidos del sistema (control, C_{10}, C_{12} y C_{14}). Con la excepción del efecto producido por C_{10}, todos presentan resultados similares a los observados en la entropía. Se debe de dar atención especial a C_{10}, ya que los cambios que éste produce sobre la membrana son más que obvios. Enfocándonos en el resultado que muestra DOPC, el cual es el lípido que tiene la mayor proporción en la bicapa simulada, y al mismo tiempo, limita los bordes externos de la balsa de lípidos, podemos observar que coincide perfectamente con los valores de entropía. Valores bajos de S_{CD} mostrados por este lípido insaturado en particular, simbolizan una alta dispersión y poca estabilidad de sus colas hidrocarbonadas (61). Tal comportamiento influencia indirectamente el comportamiento del resto de los lípidos ya que constriñe su movimiento, resultando en los resultados observados. Como es fácil de ver en la figura 22, C_{12} y C_{14} proveen una estabilidad generalizada en la membrana, consecuencia del aumento de la cohesión; mientras que C_{10} logra tal perfil en la balsa de lípidos al cambiar la presión lateral indirectamente a través del DOPC.

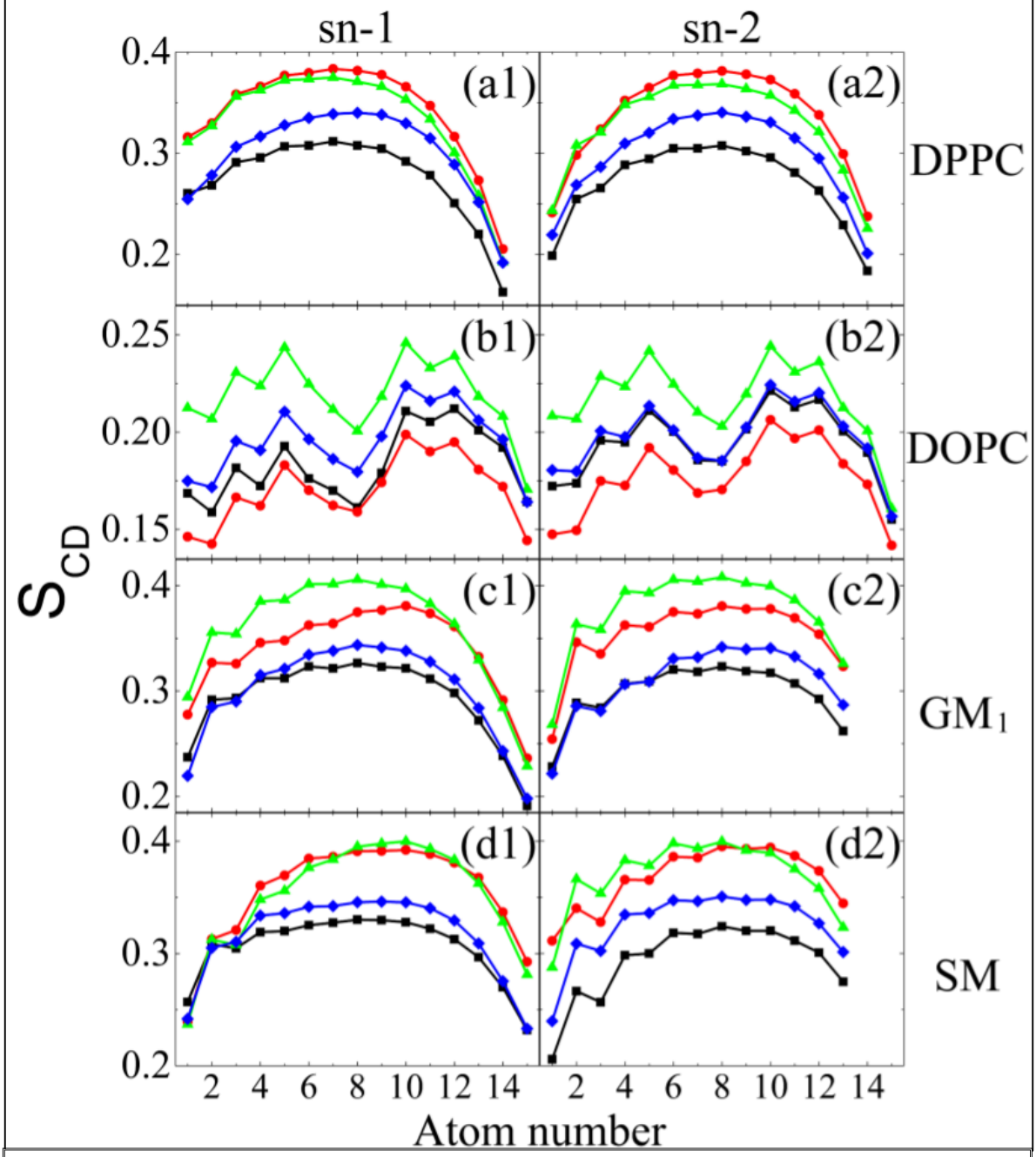


Fig. 22: Parámetro de orden de los lípidos (a1, a2) DPPC, (b1, b2) DOPC, (c1, c2) GM1 y (d1, d2) SM, cada uno con sus respectivas condiciones del sistema (Control: cuadros negros, C_{10}: puntos rojos, C_{12}: rombos azules y C_{14}: triángulos verdes). a1, b1, c1 y d1 representan el sn-1 de la cola hidrocarbonada y a2, b2, c2 y d2 la sn-2.

6.4 Área por lípido (APL)

La Tabla 2 engloba el comportamiento de DOPC (el único lípido cuyas diferencias en APL muestran ser mayores que sus desviaciones estándar), lo cual provee mayor información del efecto generalizado que cada alcohol produce. El APL muestra evidencia cuantitativa de la errática distribución de las colas de DOPC al estar en presencia de C_{10}, y al mismo tiempo revela el efecto de C_{14} donde su efecto atractivo a las colas de los lípidos aledaños provoca que éstas estén ligeramente inclinadas.

Existen algunos estudios que sugieren a los cambios en la presión lateral como los principales responsables de la anestesia (62). Sin embargo, nuestro trabajo es capaz de explicar tal parámetro al analizar sus diferencias en sus polarizabilidades, que indirectamente gobierna la interacción de la molécula con la región hidrofóbica de la bicapa. Dependiendo de tales diferencias, las moléculas pueden migrar a lo largo de la membrana (C_{10}) o alinearse paralelamente a ella (C_{12}, C_{14}). Existe otro criterio para determinar el efecto anestésico de una molécula: los enlaces de rotación libre (63). En general, todo esto se traduce en una organización/desorganización de las colas lipídicas, ofreciendo una explicación a la variabilidad de la presión lateral a lo largo de la bicapa.

Es importante mencionar el cambio sutil que C_{12} produce en comparación al sistema control, lo cual ayuda a consolidar la presencia del fenómeno del cut-off.

Tabla 2: Resultados de los valores de Área por lípido (APL), Difusión y Ancho de membrana del lípido DOPC

	DOPC		
	APL(nm^2)	D ($1e^{-7}$ cm^2/s)	Thickness (nm)
Control	0.645 (0.022)	0.335 (0.09)	4.039 (0.130)
1-Decanol	1.554 (0.022)	4.575 (6.175)	3.641 (0.298)
1-Dodecanol	0.565 (0.005)	0.335 (0.19)	3.884 (0.123)
1-Tetradecanol	0.906 (0.032)	3.13 (0.24)	3.672 (0.194)

Capítulo 7

Conclusiones

Los resultados del primer sistema nos dan a entender que el efecto que tienen diversas moléculas anestésicas sobre los lípidos de la membrana no son tribiales. Tanto así que es difícil discernir si la modulación de los canales iónicos por anestésicos, es provocado indirectamente por los cambios estructurales en la membrana o directamente por sitios de unión en la proteína. De aquí surge la importancia de complementar los resultados de la primera parte del trabajo con la segunda.

En general el segundo sistema demostró que: (a) el efecto de los alcoholes en los lípidos de membrana es altamente sensitivo al backbone del lípido y a la longitud de la cadena hidrocarbonada; (b) El DOPC (lípido de no balsa) parece determinar el efecto total del alcohol sobre el dominio de balsa de lípidos. Una consideración especial se debe tomar en cuenta, diferentes lípidos y concentraciones de éstos pueden mostrar resultados diferentes, de ahí es donde puede venir la alta variabilidad en los puntos de cut-off en proteínas. Creemos que nuestros descubrimientos son importantes para dar un paso decisivo en la comprensión del cut-off de los alcoholes primarios.

Ambos trabajos nos sirven para armar poco a poco el rompecabezas del mecanismo que las moléculas anestésicas desencadenan en las membranas de los distintos organismos. Ambos casos mostraron que el principal responsable detrás de la respuesta a su influencia, es una general desorganización de al menos un componente de la membrana. Esto nos va acercando cada vez más a la conclusión definitiva que el efecto anestésico está altamente relacionado con la desestabilización o estabilización (fluidización o rigidización) de la membrana y que esta a su vez le retira o proporciona soporte a la proteína de membrana. Revelando así la crucial importancia de los lípidos como mediadores del efecto anestésico.

Capítulo 7

Bibiografia

1. Butterworth J. F., Strichartz G. R., 1990. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review, Anesthesiology, Vol. 72, pp 711–734.

2. Nilius B., Benndorf K., Markwardt F., 1987. Effects of lidocaine on single cardiac sodium-channels, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, Vol. 19, pp 865-874.

3. Weiser T., 2006. Comparison of the effect of four Na+ channel analgesics on TTX-resistant Na+ currents in rat sensory neurons recombinant Mav 1.2 channels, Neuroscience Letters, Vol. 395, pp 179 –184.

4. Catterall W. A., Mackie K., 1996. Local anesthetics. Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th edn. McGraw-Hill, New York, pp 331-347.

5. Marshall B. E., Longnecker D. E., 1996. General anesthetics. In: Hardman J. G., et al. (eds.), Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th edition, McGraw-Hill, New York, pp. 307 – 330.

6. Narahashi T., Frazier D. T., and Yamada M., 1969. Cationic forms of local anesthetics block action potentials from inside nerve membrane, Nature, Vol. 223, pp 748–749.

7. Franks N. P., and Lieb W. R., 1994. Molecular and cellular mechanisms of general anesthesia, Nature, Vol. 367, pp 607–614.

8. Sheets M. F., Hanck D. A., 2003. Molecular action of lidocaine on the voltage sensors of sodium channels, The Journal of General Physiology, Vol. 121, pp 163–175.

9. Lipkind G. M., Fozzard H. A., 2005. Molecular modeling of local anesthetic drug binding by voltage-gated sodium channels, Molecular Pharmacology, Vol. 68, pp 1611–1622.

10. Ragdale D. S., McPhee J. C., Scheuer T., Catterall W. A., 1994. Molecular determinants of state-dependent block of Na1 channels by local anesthetics, Science, Vol. 265, pp 1724–1728.

11. Hong-Ling Li, Galue A., Meadows L., Ragsdale D. S., 1999. A Molecular Basis for the Different Local Anesthetic Affinities of Resting Versus Open and Inactivated States of the Sodium Channel, Molecular Pharmacology, Vol. 55, pp 134–141.

12. Linford N. J., Cantrell A. R., Qu Y., Scheuer T., Catterall W. A., 1998. Interaction of batrachotoxin with the local anesthetic receptor site in transmembrane segment IVS6 of the voltage-gated sodium channel, Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 95, pp 13947–13952.

13. Sierra-Valdez F. J., Forero-Quintero L. S., Zapata-Morin P. A., Costas M., Chavez-Reyes A., Ruiz-Suárez J. C., 2013. The Influence of Non Polar and Polar Molecules in Mouse Motile Cells Membranes and Pure Lipid Bilayers, PLOS ONE.

14. Cafiso D. S., 1998. Dipole potentials and spontaneous curvature: membrane properties that could mediate anesthesia, Toxicology Letters, Vol. 100–101, pp 431–439.

15. Meyer K. H., 1937. Contribution to the theory of narcosis, Transactions of the Faraday Society, Vol. 33, pp 1060–1068.

16. Overton C. E., 1901. Studien uber die Narkose, Zugleich ein Beitrag zur Allegemeiner Pharmakologie, Gustav Fischer, Jena, Switzerland. Translation: 1990. Studies of Narcosis, Chapman and Hall, London.

17. Albert L., Corwin H., David E., 1971. Partition coefficients and their uses, Chemical Review, Vol. 71, No. 6, pp 525-616.

18. Heimburg T., Tackson A. D., 2005. On soliton propagation in biomembranes and nerves, Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 102, No. 28, pp 9790-9795.

19. Leckband D., Israelachvili J., 2001. Intermolecular forces in biology, Quarterly Reviews of Biophysics, Vol. 34, No. 2, pp 105–267.

20. Meyer H. H., 1899. Zur Theorie der Alkoholnarkose. Erste Mittheilung. Welche Eigenschaft der Anästhetica bedingt ihre narkotische Wirkung?, Archiv for Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Vol. 425, pp 109-118.

21. Overton C. E., 1991. Studien über die Narkose, English translation: Studies of Narcosis, Chapman and Hall, R. Lipnick, Ed. ed.; Verlag Gustav Fischer: Jena, Germany, 1901.

22. Pringle M., Brown K., Miller K., 1981. Can the lipid theories of anesthesia account for the cutoff in anesthetic potency in homologous series of alcohols?, Molecular Pharmacology, Vol. 19, pp 49–55.

23. Franks N. P., Lieb, W. R., 1986. Partitioning of long-chain alcohols into lipid bilayers: Implications for mechanisms of general anesthesia, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., Vol. 83, pp 5116–5120.

24. Miller K., Firestone L., Alifimoff J., Streicher P., 1989. Non anesthetic alcohols dissolve in synaptic membranes without perturbing their lipids. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., Vol. 86, pp 1084–1087.

25. Trudell J., Payan D., Chin J., Cohen E., 1975. The antagonistic effect of an inhalation anesthetic and high pressure on the phase diagram PF mixed dipalmitoyldimyristoylphosphatidylcholine bilayers. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., Vol. 72, pp 210–213

26. Lee A., 1976. Interactions between anesthetics and lipid mixtures. Normal alcohols. Biochemistry, Vol. 15, pp 2448–2454.

27. Peoples R., Li C., Weight F., 1996. Lipid vs protein theories of alcohol action in the nervous system. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Vol. 36, pp 185–201.

28. Zuo Y., Aistrup G., Marszalec W., Gillespie A., Chavez-Noriega L., Yeh J., Narahashi T., 2001. Dual action of n-alcohols on neuronal nicotinic acetyl-choline receptors. Molecular Pharmacology, Vol. 60, pp 700–711.

29. Peoples R., Weight F., 1995. Cutoff in potency implicates alcohol inhibition of n-methyl-d aspartate receptors in alcohol intoxication. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., Vol. 92, pp 2825–2829.

30. Fraser D., Louro S., Horvath L., Miller K., Watts A., 1990. A study of the effect of general anesthetics on lipid-protein interactions in acetylcholine receptor enriched membranes from Torpedo nobiliana using nitroxide spin-labels. Biochemistry, Vol. 29, pp 2664–2669.

31. Stubbs C., Rubin E., 1993. Molecular mechanisms of ethanol and anesthetic actions: lipid-and protein-based theories, 1st ed.; Springer: New York.

32. Brockerhoff H., Zingoni J., Brockerhoff S., 1990. Mechanism of anesthesia: Anesthetics may restructure the hydrogen belts of membranes. Neurochemistry International, Vol. 17, pp 15–19.

33. Pike L. J., 2006. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and cell function. Journal of Lipid Research, Vol. 47, pp 1597–1598.

34. Yang S. T., Kiessling V., Simmons J. A., White J. M. K., Tamm L., 2015. HIV gp41-mediatedmembrane fusion occurs at edges of cholesterol-rich lipid domains. Nature Chemical Biology, Vol. 11, pp 424–431.

35. Sevcsik E., Schütz G. J., With or without rafts? Alternative views on cell membranes. Bio essays, Vol. 38, pp 129–139.

36. Weinrich M., Worcester D., 2013. Xenon and Other Volatile Anesthetics Change Domain Structure in Model Lipid Raft Membranes. Journal of Physical Chemistry B, Vol. 117, pp 16141–16147.

37. Gray E., Karslake J., Machta B., Veatch S., 2013. Liquid General Anesthetics Lower Critical Temperatures in Plasma Membrane Vesicles. Biophysical Journal, Vol. 105, pp 2751–2759.

38. Besshoh S., Bawa D., Teves L., Wallace M., Gurd J., 2005. Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. Journal of Neurochemistry, Vol. 93, pp 186–194.

39. Li X., Serwanski D., Miralles C., Bahr B., Blas A. D., 2007. Two pools of Triton X-100-insolubleGABAAreceptors are present in the brain and one associated to lipid rafts and another one to the post-synaptic GABAergic complex. Journal of Neurochemistry, Vol. 102, pp 1329–1345.

40. Allen J., Halverson-Tamboli R., Rasenick M., 2007. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. Nature Reviews Neuroscience, Vol. 8, pp 128–140.

41. Cotman C., Blank M., Moehl A., Snyder F., 1899. Lipid composition of synaptic plasma membranes isolated from rat brain by zonal centrifugation. Biochemistry, Vol. 8, pp 4606–4612.

42. Harris R., Baxter D., Mitchell M., Hitzemann R., 1984. Physical properties and lipid composition of brain membranes from ethanol tolerant-dependent mice. Molecular Pharmacology, Vol. 25, pp 401–409.

43. Krüeger J., Fischer W. B., 2008. Exploring the Conformational Space of VPU from HIV-1: A Versatile Adaptable Protein. Journal of Computational Chemistry, Vol. 29, pp 2416–2424.26

44. Berger O., Edholm O., Jähnig, F., 1997. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration and constant pressure, and constant temperature. Biophysical Journal, Vol. 75, pp 2002–2013.

45. Lemkul J. A., Bevan D. R., 2011. Bevan and Lipid composition influences the release of Alzheimer's amyloid β -peptide from membranes. Protein Science, Vol. 20, pp 1530–1545.

46. Chiu S. W., Pandit S. A., Scott H. L., Jakobsson E., 2009. An improved united atom force field for simulation of mixed lipid bilayers. Journal of Physical Chemistry B, Vol. 113, pp 2748–2763.

47. Jorgensen W. L., Tirado-Rives J., 2005. Potential energy functions for atomic-level simulations of water and organic and biomolecular systems. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., Vol. 102, pp 6665–6670.

48. Höltje M., Förster T., Brandt B., Engels T., von Rybinskib W., Höltje H. D., 2001. Molecular dynamics simulations of stratum corneum lipid models: fatty acids and cholesterol. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, Vol. 1511, pp 156–167.

49. Högberg C. J., Lyubartsev A. P., 2008. Effect of Local Anesthetic Lidocaine on Electrostatic Properties of a Lipid Bilayer. Biophysical Journal, Vol. 94, pp 525–531.

50. Mojumdar E. H., Lyubartsev A. P., 2010. Molecular Dynamics Simulations of Local Anesthetic Articaine in a Lipid Bilayer. Biophysical Chemistry, Vol. 153, pp 27–35.

51. Oostenbrink C., Soares T. A., van der Vegt N. F., van Gunsteren W. F., 2005. Validation of the53A6 GROMOS Force Field. European Biophysics Journal, Vol. 34, pp 273–284.

52. Neale C., Bennett W. F. D., Tieleman D. P., Pomes, R., 2011. Statistical Convergence of Equilibrium Properties in Simulations of Molecular Solutes Embedded in Lipid Bilayers. Journal of Chemical Theory and Computation, Vol. 7, pp 4175–4188.

53. Paloncyova M., Berka K., Otyepka M., 2012. Convergence of Free Energy Profile of Coumarin in Lipid Bilayer. Journal of Chemical Theory and Computation, Vol. 8, pp 1200–1211

54. Schlitter J., 1993. Estimation of Absolute and Relative Entropies of Macromolecules Using the Covariance Matrix. Chemical Physics Letters, Vol. 215, pp 617–621.

55. Högberg C. J., Maliniak A., Lyubartsev A. P., 2007. Dynamical and structural properties of charged and uncharged lidocaine in a lipid bilayer. Biophysical Chemistry, Vol. 125, pp 416–424.

56. Bernardi R. C., Gomes D. E. B., Gobato R., Taft C. A., Ota A. T., Pascutti P. G., 2009. Molecular dynamics study of biomembrane/local anesthetics interactions. Molecular Physics, Vol. 107, pp 1437–1443.

57. Jämbeck J. P. M., Lyubartsev A. P., 2013. Implicit inclusion of atomic polarization in modeling of partitioning between water and lipid bilayers. Physical Chemistry Chemical Physics, Vol. 15, pp 4677–4686.

58. Dickey A. N., Faller R., 2007. How Alcohol Chain-Length and Concentration Modulate Hydrogen Bond Formation in a Lipid Bilayer. Biophysical Journal, Vol. 92, pp 2366–2376.

59. Terama E., Ollila O. H. S., Salonen E., Rowat A. C., Trandum C., Westh P., Patra M., Karttunen M., 2008. Zur theorie der alkoholnarkose. erste mittheilung. welche eigenschaft der anästhetica bedingt ihre narkotische wirkung?. Journal of Physical Chemistry B, Vol. 112, pp 4131–4139.

60. Anslyn E., Dougherty D., 2005. Modern Physical Organic Chemistry, 1st ed.; University Science: California.

61. Warschawski D. E., Devaux P. F., 2005. Order parameters of unsaturated phospholipids in membranes and the effect of cholesterol: a 1 H13C solid-state NMR study at natural abundance.European Biophysics Journal, Vol. 34, pp 987–996.

62. Griepernau B., Böckmann R. A., 2008. The Influence of 1-Alkanols and External Pressure on the Lateral Pressure Profiles of Lipid Bilayers. Biophysical Journal, Vol. 95, pp 5766–5778.

63. Zapata-Morin P. A., Sierra-Valdez F. J., Ruiz-Suárez J. C., 2014. The interaction of local anesthetics with lipid membranes. Journal of Molecular Graphics and Modelling, Vol. 53, pp 200–205.