



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Monterrey

*Interacción de anestésicos con membranas
artificiales y biológicas*

Tesis que presenta:

Francisco Javier Sierra Valdez

para obtener el grado de Doctor en Ciencias en:

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis:

Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez

Monterrey, México

Agosto del 2015.

... living matter, while not eluding the “laws of physics” as established up to date, is likely to involve “other laws of physics” hitherto unknown, which however, once they have been revealed, will form just as integral a part of science as the former.

What is life?

Erwin Schrödinger

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. Dos teorías generales han luchado por explicarla: una profesa que la droga actúa sobre 'lípidos', la otra en 'proteínas' de membrana. Ambos modelos han alcanzado una credibilidad importante a pesar de mantener aspectos insostenibles. En este trabajo de tesis abordamos algunos de estos problemas fundamentales de la anestesia, con el fin de sumar evidencias en la comprensión integrada de dicho fenómeno. En la primera parte se realizó un estudio comparativo de la difusión de anestésicos locales y generales, en la que proponemos la participación de un nuevo parámetro detrás de su mecanismo difusivo: la tasa de protonación. Posteriormente, se exploraron dos tópicos relacionados con la reversibilidad de la anestesia tanto en membranas de lípidos como a nivel celular; la influencia estructural de los gases nobles en membranas de lípidos y su antagonismo con presión hidrostática, así como el efecto de la tetracaína y su antagonismo con Ca^{+2} y el agente excitatorio cafeína. Los resultados obtenidos de estos estudios destacan, incluso a nivel celular, la importancia de los lípidos en el mecanismo de acción de los anestésicos. En la última década, ciertas proteínas relacionadas con la neurotransmisión se han encontrado en dominios lipídicos de membrana, conocidos también como balsas de lípidos, demostrando una fuerte dependencia con la estabilidad estructural de las mismas. Atendiendo esto, nos enfocamos en un estudio de balsas de lípidos 'modelo' y de 'membrana cerebral'. En el primero caso, se realizó un estudio del fenómeno de *cut-off* de los *n*-alcoholes, con el fin de indagar en la causalidad de dicho fenómeno a través de una dependencia con las especies lipídicas de balsas. Y finalmente, se llevó a cabo un estudio en membranas plasmáticas y balsas de lípidos cerebrales "*in vivo*" bajo los efectos producidos por el anestésico general 'pentobarbital'. Estos resultados muestran, por primera vez, una reducción muy significativa en la asociación con balsas de lípidos de los receptores NMDA y GABA_A , los cuales son considerados los sitios principales de acción para este fármaco. Los resultados obtenidos, tanto en membranas modelo como biológicas, brindan conocimiento y soporte importante en la búsqueda del mecanismo de anestesia general, a partir de una visión integral en donde los anestésicos realizan su acción alterando las interacciones 'lípidoproteína'.

Abstract

Hundreds of substances possess anesthetic action. However, despite decades of research and tests, a golden theory able to reconcile all aspects behind anesthesia is still unfinished. Two theories struggle to explain it: one professes that the drug acts on 'lipids', the other on membrane 'proteins'. Both achieve high notes of success although leave untenable important issues. In this thesis we address some of these fundamental problems of anesthesia, in order to provide evidence in the integrated understanding of such phenomenon. In the first part, a comparative study of the local and general anesthetic diffusion was performed, where it is proposed the participation of a new player behind their diffusive mechanism: the protonation rate. Subsequently, two topics related to the reversibility from anesthesia in both lipid membranes and cellular level were explored; the structural influence of noble gases in lipid membranes and the antagonistic effect of hydrostatic pressure, and the influence of tetracaine and the antagonistic effect of Ca^{+2} and the excitatory agent caffeine. The obtained results highlight, even at the cellular level, the importance of lipids in the mechanism of anesthetic action. In the last decade, some proteins involved in neurotransmission have been found within lipid domains, also known as lipid rafts, showing a strong dependence on the structural stability of the same. Attending this, we focused on a study of 'model' and 'brain membrane' lipid rafts. In the first case, a study of the *cut-off* phenomenon of the *n*-alcohols was performed, in order to investigate the causality of such phenomenon through a dependence with lipid species rafts. Finally, it was analyzed the effects produced by the general anesthetic 'pentobarbital' on brain plasma membranes and lipid rafts "*in vivo*". These results showed, for the first time, a significant reduction in lipid raft association of the NMDA and GABA_A receptors, which are considered the major sites of action for this anesthetic. The obtained results, both in model and biological membranes, provide important knowledge and support in search of the general anesthesia mechanism, through a comprehensive vision where anesthetic perform their action by altering the lipid-protein interactions.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme proporcionado una beca para realizar mis estudios de doctorado. A mi asesor, el Dr. Carlos Ruiz, a quien le debo mi formación científica, y que no solo compartió su experiencia profesional y brindó la supervisión que un estudiante puede esperar de su profesor, sino también su gran confianza, paciencia y por la amistad que ha surgido a lo largo de los periodos bajo su dirección en las tesis de licenciatura, maestría y ahora doctorado. A mis compañeros de laboratorio por su amistad y por la retroalimentación científica en discusiones de los proyectos. En particular, quiero agradecer a la Dra. Ilse Delint por su amistad, por compartir su conocimiento en neurobiología y por confiar en el proyecto realizado en colaboración.

... a mi familia y a mi hijo Leo.

Índice

Resumen	I
Abstract	II
Agradecimientos	III
1. Introducción	1
1.1. El enigma de la anestesia	2
1.2. Sobre los capítulos	5
1.3. Hipótesis y objetivos	7
2. Difusión de anestésicos locales y generales	9
2.1. Resumen	10
2.2. Anestésicos: un poco de físico-química.	10
2.3. Fenómenos difusivos en sistemas multilaminares	11
2.3.1. Transiciones de fase: ‘doble’ y ‘única’	11
2.3.2. Cinética de difusión y su dependencia de fase	15
2.3.3. Dependencia de pH: desorden y difusión.	18
2.3.4. Tasa de protonación efectiva intermolecular (TPEI).	19
2.4. Aspectos moleculares de los fenómenos difusivos	22
2.5. Metodología experimental	27
3. Gases nobles en membranas de lípidos modelo	29
3.1. Resumen	30
3.2. La anestesia de los gases nobles	30
3.3. Efecto de los gases nobles en la transición de fase de membranas	31
3.3.1. Caracterización del sistema experimental	31
3.3.2. Polarizabilidad y desorden de lípidos	32
3.4. Reversibilidad estructural con presión	34
3.5. Metodología experimental	37

4. Anestesia-excitabilidad: ¿desorden-orden?	39
4.1. Resumen	40
4.2. El espermatozoide como modelo de estudio	40
4.3. Correlación entre el modelo celular y membrana de lípidos	41
4.3.1. Motilidad del Espermatozoide	41
4.3.2. Calorimetría de membranas modelo	43
4.4. Especulación molecular del antagonismo	44
4.5. Metodología experimental	49
5. Fenómeno de <i>cut-off</i> de los <i>n</i>-alcoholes	51
5.1. Resumen	52
5.2. Anestesia de los <i>n</i> -alcoholes	52
5.3. Efecto de los <i>n</i> -alcoholes en balsas de lípidos ‘modelo’	54
5.3.1. Caracterización de los sistemas lipídicos	54
5.3.2. El <i>cut-off</i> en membranas ‘homogéneas’ y ‘heterogéneas’	55
5.4. Especulación molecular del <i>cut-off</i> fisiológico	57
5.5. Metodología experimental	59
6. Anestesia en membranas cerebrales: plasmática y balsas de lípidos	61
6.1. Resumen	62
6.2. La hipótesis de ‘balsas de lípidos’	62
6.3. Caracterización termotrópica de membranas cerebrales	63
6.4. Influencia del PB en la físico-química de membranas cerebrales	65
6.4.1. Fenómeno de DPF en membranas plasmáticas cerebrales	65
6.4.2. Estabilidad ‘lípid-proteína’ de balsas de lípidos	65
6.4.3. Asociación de los receptores NMDA y GABA _A con balsas de lípidos	67
6.5. El desorden de membrana y su implicación en las balsas de lípidos	69
6.6. Metodología experimental	75
7. Conclusiones generales	79
8. Perspectivas	81
9. APÉNDICE	83
9.1. Otras colaboraciones	84
9.2. Publicaciones y Congresos	84

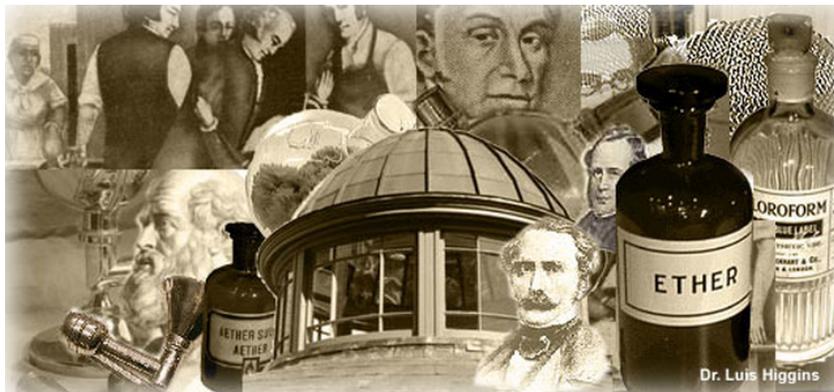
Lista de Figuras

1.1. Diversidad de especies químicas de anestésicos.	2
1.2. Correlación de la regla de Meyer-Overton.	3
2.1. Perfiles calorimétricos de MLVs y LUVs bajo la influencia de anestésicos locales. .	13
2.2. Comparación entre LUVs y MLVs bajo diferentes procesos de adición de TCC. . .	14
2.3. Perfiles calorimétricos de MLVs y LUVs bajo la influencia de anestésicos generales.	15
2.4. Caracterización, modelo difusivo y dependencia de fase de la cinética de difusión.	17
2.5. Dependencia de pH del ΔT_m	19
2.6. Cinética de difusión de TCC modulada por AC.	21
2.7. Experimentos control de MLVs bajo la influencia de AC.	22
2.8. Cinética de difusión de TCC modulada por la concentración de ácido málico. . .	23
2.9. Cinética de difusión de TCC modulada por su propia concentración.	24
2.10. Aspectos moleculares detrás de la TPEI.	25
3.1. Caracterización del efecto del Xe en liposomas.	32
3.2. Efecto de los gases nobles en la transición de fase de membranas.	33
3.3. Representación esquemática de los cambios estructurales de membrana producidos por los gases nobles.	35
3.4. Reversibilidad del efecto del Xe en función de la presión hidrostática.	36
3.5. Representación esquemática del SAP: proceso de presurización de liposomas. . .	37
4.1. Representación esquemática del SMC: estudio de la motilidad celular.	42
4.2. Motilidad del espermatozoide: antagonismo TCC-cafeína/ Ca^{+2}	43
4.3. Calorimetría de liposomas DPPC/DPPA: antagonismo TCC-cafeína/ Ca^{+2}	44
4.4. Antagonismo de la cafeína dependiente de TCC.	45
4.5. Imágenes instantáneas de SDM del sistema DPPC-cafeína/TCC.	46
4.6. Mapas representativos de energía: Coulomb y Lennard-Jones.	46
4.7. Trayectorias promedio de cafeína y TCC obtenidas mediante SDM.	48
5.1. Caracterización termotrópica de membranas homogéneas y heterogéneas.	54
5.2. Estudio del <i>cut-off</i> en membranas de DPPC.	56
5.3. Estudio del <i>cut-off</i> en membranas homogéneas y heterogéneas.	57

6.1. Caracterización termotrópica de membranas cerebrales.	64
6.2. Influencia de PB en la estabilidad 'lípid-proteína' de membranas cerebrales. . .	66
6.3. Efecto de la anestesia en la cantidad de proteína total en balsas de lípidos. . . .	67
6.4. Efecto de la anestesia en la asociación de los receptores NMDA y GABA _A con balsas de lípidos. (Protocolo con detergente)	68
6.5. Efecto de la anestesia en la asociación del receptor NMDA con balsas de lípidos. (Protocolo sin detergente)	70
6.6. Efecto de la anestesia en la asociación del receptor NMDA con la sinapsis.	71

1

Introducción



1.1. El enigma de la anestesia

Durante más de un siglo, la anestesia general ha sido uno de los problemas inconclusos de la neurofarmacología [1]. Desde su descubrimiento, a inicios del siglo XIX, cientos de sustancias de distinta naturaleza química se han probado como poseedoras de actividad anestésica. Estas moléculas difieren tremendamente en sus propiedades químicas, físicas y farmacológicas, de tal manera que hoy en día encontramos dos grandes familias de anestésicos catalogados por sus efectos clínicos; locales y generales (inhalatorios e intravenosos) [2]. La figura 1.1 ilustra una pequeña lista de anestésicos que son utilizados hoy en día en la práctica clínica.

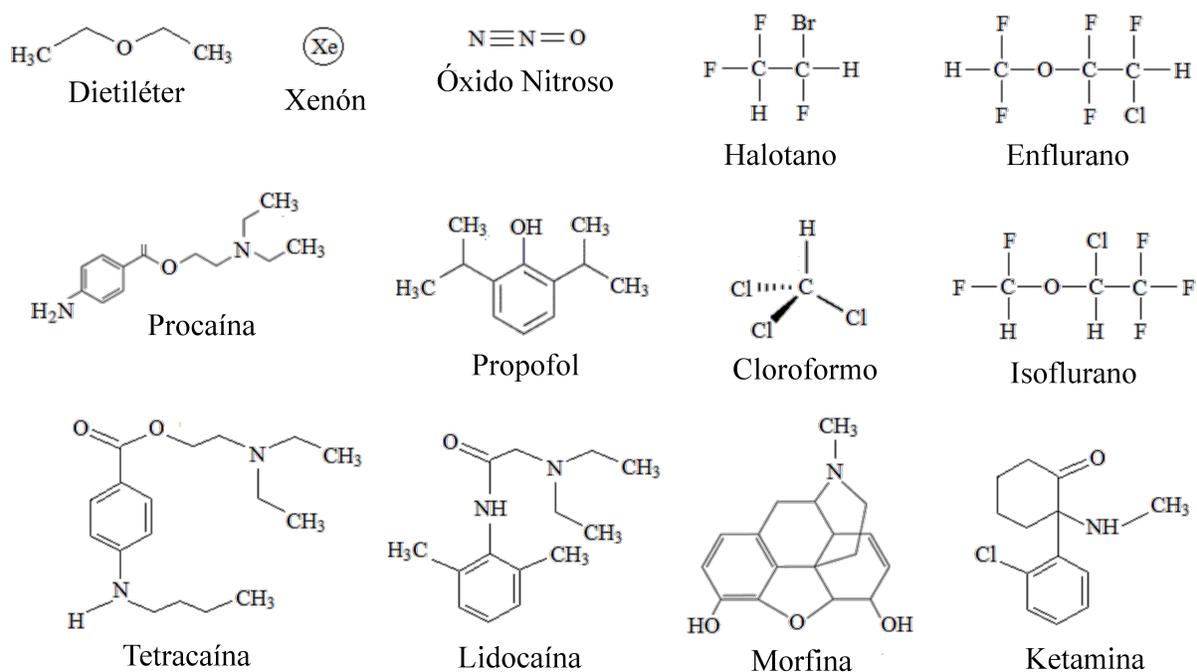


Figura 1.1: Diversidad de especies químicas de anestésicos. Algunos anestésicos ampliamente utilizados en la práctica clínica [2], a excepción del dietiléter; que se muestra por razones históricas.

En la búsqueda de un mecanismo general de la anestesia, y debido a la variedad abrumadora de anestésicos, surge una pregunta inevitable: ¿las interacciones de los anestésicos con sus blancos de acción son inespecíficas, específicas o ambas? A lo largo del tiempo se han propuesto distintos mecanismos cuyos sitios de acción han sido direccionados tanto a lípidos como a proteínas. Algunos autores apoyan diferentes teorías: los anestésicos actúan dentro del interior hidrofóbico de la bicapa lipídica [3]; en la interface entre los lípidos y la fase acuosa [4]; una acción directa del anestésico en la interfase proteína/agua [5]; entre α -hélices hidrofóbicas de alguna proteína crucial [6] o en la interfase lípido/proteína [7].

Independiente de la teoría de lípidos o proteínas, se ha demostrado indiscutiblemente que, cualquiera que fuese el sitio de acción, éste es hidrofóbico. Tal suposición es basada principalmente en los trabajos de Meyer [8] y Overton [9] a inicios del siglo pasado, que de forma independiente, encontraron que la potencia de los anestésicos generales correlaciona fuertemente con su solubilidad en aceite de oliva, reflejando la solubilidad en la membrana lipídica de las células. Y que además, el efecto anestésico es independiente de la naturaleza química de éste. Estas contribuciones logran resumirse de la siguiente manera: el coeficiente de partición, P , definido como la razón de concentraciones de la droga entre aceite (o membranas de lípidos) y agua, es inversamente proporcional a la dosis crítica del anestésico (ED_{50} , dosis para alcanzar el 50% del efecto); denominada como la regla de Meyer-Overton (ver Fig. 1.2). De hecho, hasta la fecha, ninguna otra regla basada en parámetros físico-químicos y estructurales ha sido tan útil para predecir la potencia anestésica en la farmacología.

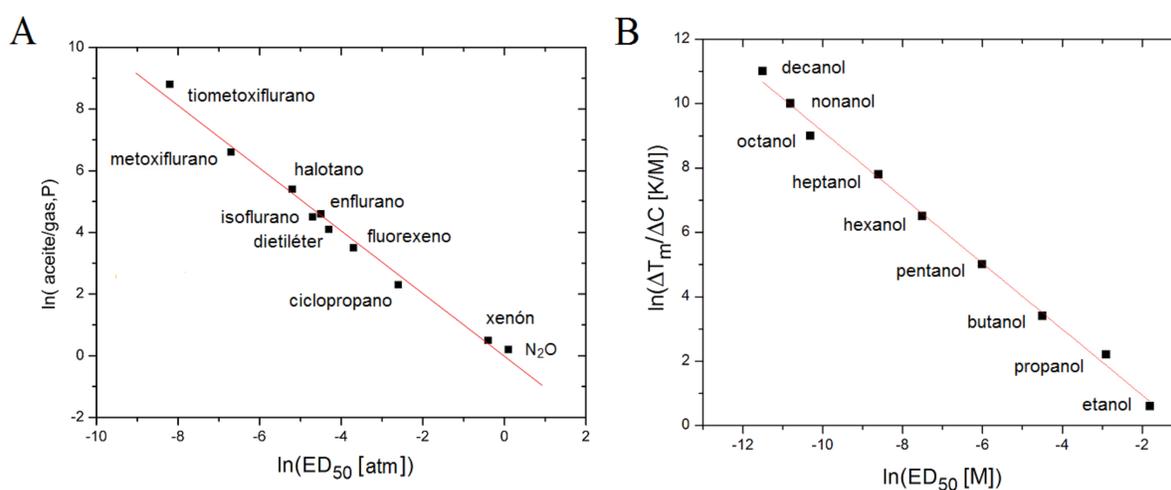


Figura 1.2: Correlación de la regla de Meyer-Overton. **A)** El coeficiente de partición está inversamente relacionado con la dosis efectiva de anestésico [ED_{50}]. Datos adaptados de Overton (1901) para anestésicos volátiles en humano. **B)** Concentración dependiente del punto de fusión de membranas DPPC contra la dosis de anestesia crítica, ED_{50} . Datos obtenidos de [10] para una serie de n -alcoholes en renacuajos.

Esta regla sugiere que la anestesia puede ser inducida a través de efectos inespecíficos sobre las propiedades físicas de los lípidos de membrana en lugar de sitios de unión específicos en las proteínas. En apoyo de esta hipótesis, varios estudios tanto en membranas modelo [11] como biológicas [12] han demostrado que todos los anestésicos alteran el orden estructural de las membranas de lípidos, y esto a su vez modifica sus propiedades mecánicas [13], eléctricas [14] y termodinámicas; tales como la reducción de la temperatura de transición de fase (T_m) de los lípidos, conocido también como fenómeno de ‘depresión del punto de fusión’ (DPF) [15, 10]. Sin embargo, algunos otros reportes argumentan en contra de esta teoría de lípidos, por ejemplo: el fenómeno de *cut-off* de los n -alcoholes, donde se rompe la regla de Meyer-Overton a partir del

dodecanol [16], el efecto estereoespecífico del isoflurano en canales de K^+ [17] y la sensibilidad de isoflurano, hexanol, octanol, etanol y enflurano a mutaciones específicas sobre receptores de *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) [16] y del ácido γ -aminobutírico (GABA) [18]. Del mismo modo, algunos resultados de electrofisiología han propuesto sitios de unión específicos sobre los receptores $GABA_A$ y nACh para isoflurano, propofol, halotano y cloroformo [19, 20].

Ya que el modelo de Hodgkin & Huxley para la propagación del impulso nervioso se consideró completamente válido y absoluto desde sus inicios, a través de los años la gran mayoría de los procesos neuronales han sido descritos a partir de proteínas de membrana, por ejemplo; blancos de acción de fármacos, entre ellos los anestésicos. Este mecanismo se justifica con interacciones electrostáticas tipo ‘llave-cerradura’ a través del agonismo o antagonismo en receptores involucrados con la inhibición o excitación neuronal, respectivamente [21]. A pesar de la innumerable cantidad de trabajos dedicados a la búsqueda de blancos moleculares específicos en proteínas, la vasta cantidad y variedad de anestésicos no ajusta con el número de receptores implicados en la neurotransmisión, en donde los sitios de acción propuestos como “específicos”, dejarían de serlo.

Recientemente, el modelo proteico vigente para la propagación del impulso nervioso (Hodgkin & Huxley), ha sido desafiado por un modelo físico propuesto por Heimburg & Jackson [22], capaz de explicar los fenómenos mecánicos, térmicos y eléctricos encontrados durante el impulso nervioso; conocido como el ‘modelo del solitón’. Éste modelo sugiere que el potencial de acción no es solo un fenómeno puramente eléctrico ofrecido por la hipótesis iónica, sino que es capaz de explicar los fenómenos mecánicos, térmicos y eléctricos que proporciona una descripción más completa del potencial de acción [23]. Recientemente, a partir de los resultados de Meyer-Overton, Heimburg & Jackson han propuesto una teoría termodinámica que describe la anestesia general basada en propiedades lipídicas [24]. Esta teoría termodinámica, además de ser relativamente sencilla, posee una coherencia basada totalmente en leyes fundamentales y a su vez compatible con el ‘modelo del solitón’ [25]. La teoría afirma que el efecto de un anestésico está relacionado con la habilidad para reducir la temperatura de transición de fase de membranas de lípidos y el orden estructural de dichas membranas, tomando en cuenta que tal efecto es independiente de la naturaleza química del anestésico.

Por otra parte, el modelo innovador de Heimburg & Jackson proporciona una explicación inmediata e intuitiva para los fenómenos de reversión de la anestesia, tales como el aumento de la presión hidrostática (~ 24 bares), la reducción de la temperatura corporal (~ 0.6 K), el aumento de la concentración de Ca^{+2} extracelular y la disminución de pH [24]. En el campo clínico se sabe que un tejido inflamado no puede ser anestesiado; el tejido inflamado se encuentra 0.5 unidades de pH por debajo de un tejido sano. Este cambio de pH es suficiente para revertir la anestesia. El mismo caso ocurre con la acumulación de calcio en un tejido inflamado siendo un medio que imposibilita la anestesia. Por tanto, el efecto anestésico puede invertirse de manera cuantitativamente predecible por cualquier mecanismo que eleva la temperatura de transición, restaurando a su vez la diferencia de energía libre a su valor original [25].

Aunque todos estos factores de reversión están bien documentados, no han logrado unificarse a través del concepto de sitios de acción específica en el modelo de proteínas. De forma similar, el modelo de lípidos requiere explicar los fenómenos de *cut-off*, estereoespecificidad y sensibilidad ante la mutagénesis de proteínas. Por lo tanto, es urgente consolidar un mecanismo de acción basado en la interacción ‘lípid-proteína’ capaz de unificar la gran variedad de fenómenos moleculares y fisiológicos relacionados con la anestesia. Así mismo, vale la pena explorar la relevancia de interacciones “semiespecíficas” en donde los anestésicos actúen de forma diferencial sobre los dominios lipídicos de membrana que modulan la función proteica.

1.2. Sobre los capítulos

Difusión de anestésicos. El mecanismo de acción de la amplia variedad de anestésicos ha sido repartida en una pequeña cantidad de receptores proteicos. De tal manera que si buscamos los sitios específicos propuestos para cada uno de los anestésicos, notamos que no existe ninguna correlación entre sus especies químicas y los receptores propuestos para su acción. Sin embargo, uno puede encontrar una correlación general entre las especies químicas de los anestésicos y el tipo de anestesia al que pueden ser buenos candidatos, logrando catalogarlos en las dos grandes familias: locales y generales. Es un hecho que no podemos usar un anestésico local como general y viceversa. Por lo tanto, surge el siguiente cuestionamiento: ¿qué hace a un anestésico local o general? En el capítulo 2, realizamos un estudio físico-químico de la difusión de una variedad de anestésicos locales y generales a través de liposomas multilaminares. Con estos resultados proponemos la participación de un nuevo elemento en la cinética de difusión interlaminar de los anestésicos: la tasa de protonación, la cual a su vez sugiere que la ‘difusión’ ilustra la esencia inherente detrás del anestésico local o general, lo que podría conducir a la comprensión de un mecanismo de la anestesia más completo.

Reversibilidad de la anestesia. Como hemos comentado anteriormente, la teoría de proteínas ha proporcionado cierto grado de especificidad en su mecanismo de acción. No obstante, se encuentra muy lejos de explicar los factores de reversión de la anestesia; incremento tanto en la presión hipostática como en la concentración de Ca^{+2} , y disminución tanto de la temperatura corporal como del pH. En el capítulo 3 exploramos el efecto producido por los gases nobles en membranas de lípidos y el fenómeno de reversibilidad con presión. Y por otro lado, en el capítulo 4, estudiamos de forma análoga la influencia de la tetracaína en membranas puras de lípidos y en la motilidad de espermatozoides, así como los efectos antagónicos producidos por Ca^{+2} y cafeína. Estos sistemas, nunca antes estudiados con tal finalidad, destacan evidentemente la importancia de los lípidos en el mecanismo de acción de los anestésicos.

Interacción de anestésicos con balsas de lípidos. Se mencionó anteriormente que la teoría de lípidos falla al explicar algunos fenómenos como el *cut-off* de los *n*-alcoholes, la estereoespecificidad y la sensibilidad a la mutagénesis de receptores proteicos. Esta incapacidad para comprender tales problemas pudiera subsanarse haciendo uso de las “balas de lípidos”, con la

que una gran cantidad de mecanismos biológicos nunca antes comprendidos han logrado desarrollar una explicación a través de la interacción lípido-proteína. Incluso la falta de formalismo en algunos otros mecanismos, propuestos inicialmente sin la participación de los lípidos, han sido replanteados bajo este concepto. Por lo tanto, en el capítulo 5, retomamos el fenómeno de *cut-off* de los *n*-alcoholes para ser estudiado en balsas de lípidos modelo, cuya composición y proporción de lípidos ha sido simulada a partir de la membrana sináptica. Se realizó además un comparativo entre el efecto de los *n*-alcoholes en membranas de una o varias especies de lípidos, con el fin de elucidar alguna semiespecificidad entre tales anestésicos y las membranas. Por otra parte, con el fin de estudiar, por primera vez, tanto el fenómeno de DPF en membrana plasmática como el de balsas de lípidos cerebrales y la asociación de ciertos receptores proteicos con tales balsas de lípidos, en el capítulo 6, se muestran resultados biofísicos y bioquímicos del estudio realizado en membranas cerebrales *in vivo*, y el efecto inducido por el anestésico general pentobarbital. Aquí demostramos que éste anestésico es capaz de reducir, de forma semiespecífica, la asociación de los receptores NMDA y GABA_A con las balsas de lípidos.

1.3. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La acción de los anestésicos ocurre a través de interacciones semiespecíficas con los lípidos de membrana que modulan la función proteica en la neurotransmisión.

Objetivo general

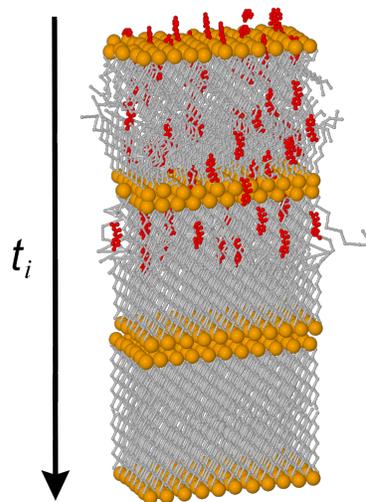
Investigar la interacción semiespecífica de los anestésicos con membranas de lípidos modelo y membranas cerebrales.

Objetivos Particulares

- Estudiar la difusión de los anestésicos locales y generales a través de membranas de lípidos multilaminares.
 - Explorar el efecto de los gases nobles en membranas puras de lípidos y su reversibilidad mediante presión hidrostática.
 - Realizar un estudio comparativo de los efectos de la anestesia en sistemas celulares y de lípidos modelo, y su reversibilidad ante calcio y cafeína.
 - Indagar en la causalidad del efecto *cut-off* de los *n*-alcoholes en balsas de lípidos modelo.
 - Explorar los efectos de la anestesia *in vivo* en membranas plasmáticas y balsas de lípidos cerebrales.
-

2

Difusión de anestésicos locales y generales



R. Pérez-Isidoro, F. J. Sierra-Valdez & J. C. Ruiz-Suárez, *Scientific Reports* 4, 7534, (2014).

2.1. Resumen

Cientos de sustancias poseen acción anestésica. Sin embargo, ¿qué hace a un anestésico ser local o general? ¿Sus sitios de acción específica en proteínas, la solubilidad en lípidos, difusividad, potencia, tiempo de acción? En este capítulo proponemos la participación de un nuevo jugador igual o incluso más importante para descifrar el enigma: la tasa de protonación. En efecto, dicha tasa modula la velocidad de difusión de anestésicos a través de membranas lipídicas; las tasas de protonación bajas mejoran la difusión de los anestésicos locales, mientras que las altas la reducen. Mostramos además que existe una dependencia de pH y del estado termodinámico (fase) de la membrana en la difusión anestésico local a través de múltiples bicapas de lípidos. En base a estos hallazgos, hemos incorporado un nuevo indicio que nos permitirá progresar en la comprensión del fenómeno de la anestesia.

2.2. Anestésicos: un poco de físico-química.

Los alcanos [26], alcoholes [18], benzodiazepinas [27], barbitúricos [28], ésters y amidas [29], fenoles [28], éteres [30] e incluso gases inertes [31] son anestésicos. Sin embargo, estas moléculas han sido usadas para anestesia tanto local como general basadas en sus efectos farmacocinéticos y toxicológicos, aunque solo algunos pocos han prevalecido en la práctica clínica [2].

Una de las preocupaciones más relevantes en la farmacocinética es saber cómo las drogas se difunden en los tejidos, que para los anestésicos tanto locales como generales depende de la solubilidad en lípidos, i.e., del coeficiente de partición. Además, para los anestésicos locales dicha difusividad depende del pH [32, 33]. Se ha demostrado que los anestésicos generales [34, 35] y locales [36], incluso con su dependencia del pH [37], deprimen la transición del punto de fusión de las membranas lipídicas, el cual también ha sido correlacionado con el coeficiente de partición. Los anestésicos locales son bases débiles con tres componentes concomitantes: (a) un anillo aromático lipófilo, (b) un éster o amida de cadena intermedia y (c) una terminal amino. Los dos primeros determinan los aspectos lipófilos de la molécula, en el que una mayor solubilidad en lípidos mejora la difusión a través de las vainas de mielina del nervio hacia la membrana neuronal. Esta propiedad difusiva se correlaciona con la potencia del fármaco. En solución acuosa, la terminal amino actúa como un interruptor 'on-off', donde dependiendo del pH, permite la existencia del anestésico local en una forma terciaria (no-protonada), i.e., soluble en lípidos, o en una forma cuaternaria (protonada) que está cargada positivamente y por lo tanto soluble en agua. Se asume que la forma protonada está relacionada con la interacción proteína-anestésico [29]. De hecho, puesto que las especies no-protonadas presentan una difusión más rápida en los tejidos, la alcalinización de soluciones anestésicas locales ha demostrado la reducción del dolor de la infiltración de dicha solución, a expensas de reducir el tiempo de aparición y duración de la anestesia [38]. Cada una de las especies, protonadas

o no-protonadas, juegan un papel crucial en la sucesión de acontecimientos que conducen al bloqueo del impulso nervioso. Sin embargo, no hay evidencias físicas y químicas que apoyen el marco aceptado de la difusión de anestésico local a través de las membranas lipídicas, y más aún, cómo dicha difusión puede ser modulada por la tasa de cambio entre las especies protonadas y no-protonadas.

En este capítulo abordamos algunos aspectos difusivos importantes de los anestésicos locales a través de un estudio temporal de los cambios en la transición de fase de membranas lipídicas puras. Este análisis fue comparado con anestésicos generales; tanto intravenosos como inhalatorios. Nuestros resultados muestran que, en condiciones clínicas, la difusión de los anestésicos locales es más lenta que con anestésicos generales. Además, nuestros datos muestran la primera evidencia de la dependencia del estado termodinámico (fase) de la membrana con la difusión del fármaco. Un análisis exhaustivo indica una dependencia del pH de la difusión del anestésico local, revelando un comportamiento interesante precisamente en el rango de pH de aplicación clínica. Centrándose en este pH, un análisis adicional sugiere que el uso (o no) de distintos ácidos carboxílicos en solución, y sus diferencias en la naturaleza química, inducen cambios significativos en la cinética de difusión de anestésicos locales a través de múltiples bicapas. Nuestros resultados demuestran, por primera vez, la importancia de la ‘tasa de protonación’ en la cinética de difusión interlaminar de los anestésicos locales, que en comparación con los anestésicos generales, nos permite ilustrar la esencia inherente de la función de ambos tipos de anestesia.

2.3. Fenómenos difusivos en sistemas multilaminares

Los fosfolípidos con el grupo ‘colina’, saturados e insaturados, son las especies más abundantes en las membranas plasmáticas [39]. En el presente estudio, recurrimos al 1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicerol-3-fosfatidilcolina (DPPC) para la preparación de liposomas como ‘membrana modelo’ (véase ‘Metodología experimental’ al final del capítulo).

2.3.1. Transiciones de fase: ‘doble’ y ‘única’

La difusión de los anestésicos es una propiedad excepcional que determina, en gran parte, su respectivo uso clínico [2]. La técnica de ‘calorimetría diferencial de barrido’ (DSC, por sus siglas en inglés) ha sido utilizada previamente para modelar la cinética de permeación de drogas a través de membranas de lípidos [40]. Sin embargo, nuestros resultados sugieren un nuevo método para seguir el proceso de difusión, basado en la medición de la entalpía calorimétrica. Para evaluar los aspectos físico-químicos de la difusividad anestésica, investigamos el proceso de difusión de tres anestésicos locales, procaína (PCN), lidocaína (LCN) y tetracaína (TCC), a través de vesículas tanto multilaminares (MLVs) como unilamelares (LUVs) (ver Fig. 2.1). Los experimentos se realizaron en ‘condiciones clínicas’, que comprenden: agua ultrapura (pH 4-6), NaCl 100 mM y 0.97 mM fenilefrina (Phe) [38]. Como era de esperar, ambos sistemas LUVs y

MLVs son igualmente afectados por el anestésico local respectivo, como se observa claramente a través de la depresión de la temperatura de transición de la membrana.

Sin embargo, mientras en los experimentos con anestésicos locales en MLVs muestran una transición de fase ‘doble’ (ver Fig. 2.1a, b, c), en LUVs se observa una transición de fase ‘única’ (ver Fig. 2.1d, e, f). La transición de fase ‘doble’ puede explicarse considerando dos estados diferentes. El primero corresponde a las membranas exteriores del liposoma afectadas por los anestésicos (pico izquierdo), mientras que el segundo corresponde a membranas internas que aún no han sido afectadas (pico derecho). Independientemente del número de bicapas de lípidos contenidos en los liposomas multilaminares, siempre se observan dos estados distintos. Es importante remarcar que el cambio de transición de fusión (ΔT_m) inducida por TCC es dependiente de la concentración, lo que debería implicar transiciones intermedias debido a la penetración gradual de TCC a través de bicapas internas. Sin embargo, curiosamente solo se observan dos picos. Creemos que las membranas externas del sistema MLV llegan de inmediato a una concentración máxima de TCC (estado saturado), que no puede ser superada por la concentración de TCC en el medio acuoso. Por lo tanto, tal concentración saturada de TCC en las membranas depende estrictamente de la concentración de TCC del medio acuoso. Esto resulta en un pequeño pico que se desplaza con respecto al pico original (control), i.e., pico izquierdo. Seguido de eso, el fármaco contenido dentro de tales membranas externas se difunde hacia adentro, agotando momentáneamente su concentración pero siendo rápidamente compensada por TCC del medio acuoso (en otras palabras, las membranas externas se mantienen en equilibrio). Debido a la polidispersidad del sistema de MLVs, las bicapas internas subsecuentes no contienen la misma concentración de TCC en el momento de la medición, y por lo tanto, estas contribuciones de entalpía no son suficientes para generar un continuo en el perfil calorimétrico. Una vez que las bicapas internas consiguen gradualmente el estado saturado, su entalpía es sumada al pico izquierdo, lo que explica cómo éste se incrementa a través de los múltiples barridos del DSC. Esto podría ser la razón de tener únicamente dos picos estrechos y no una señal ancha o continua.

Los experimentos en donde el anestésico local es añadido durante el proceso de hidratación de lípidos en la preparación de MLVs, exhibe el mismo resultado que el caso de LUVs; en otras palabras, solo se presenta un pico (ver Fig. 2.2). Esto confirma a su vez que una transición de fase ‘doble’ corresponde a una etapa intermedia de la cinética de difusión del fármaco a través de membranas de lípidos. Se realizaron experimentos control adicionales que demuestran un efecto nulo en las membranas de DPPC ante concentraciones clínicas de Phe. Sin embargo, el efecto de Phe ha sido explorado únicamente en los experimentos realizados bajo ‘condiciones clínicas’. Es importante mencionar que las concentraciones de anestésico utilizadas clínicamente están dentro del régimen de saturación de ΔT_m (datos no mostrados), de modo que sus efectos son comparables. Por lo tanto, e independientemente de una transición de fase ‘doble’ o ‘única’, el orden de ΔT_m fue TCC>LCN>PCN, el cual es consistente con el orden de sus hidrofobicidades y potencias anestésicas [33, 36, 41]. Por consiguiente, estos datos indican que, en ‘condiciones clínicas’, la escala de tiempo para la difusión de anestésicos locales es relativamente lenta para llevar a cabo un análisis más profundo en su cinética de difusión.

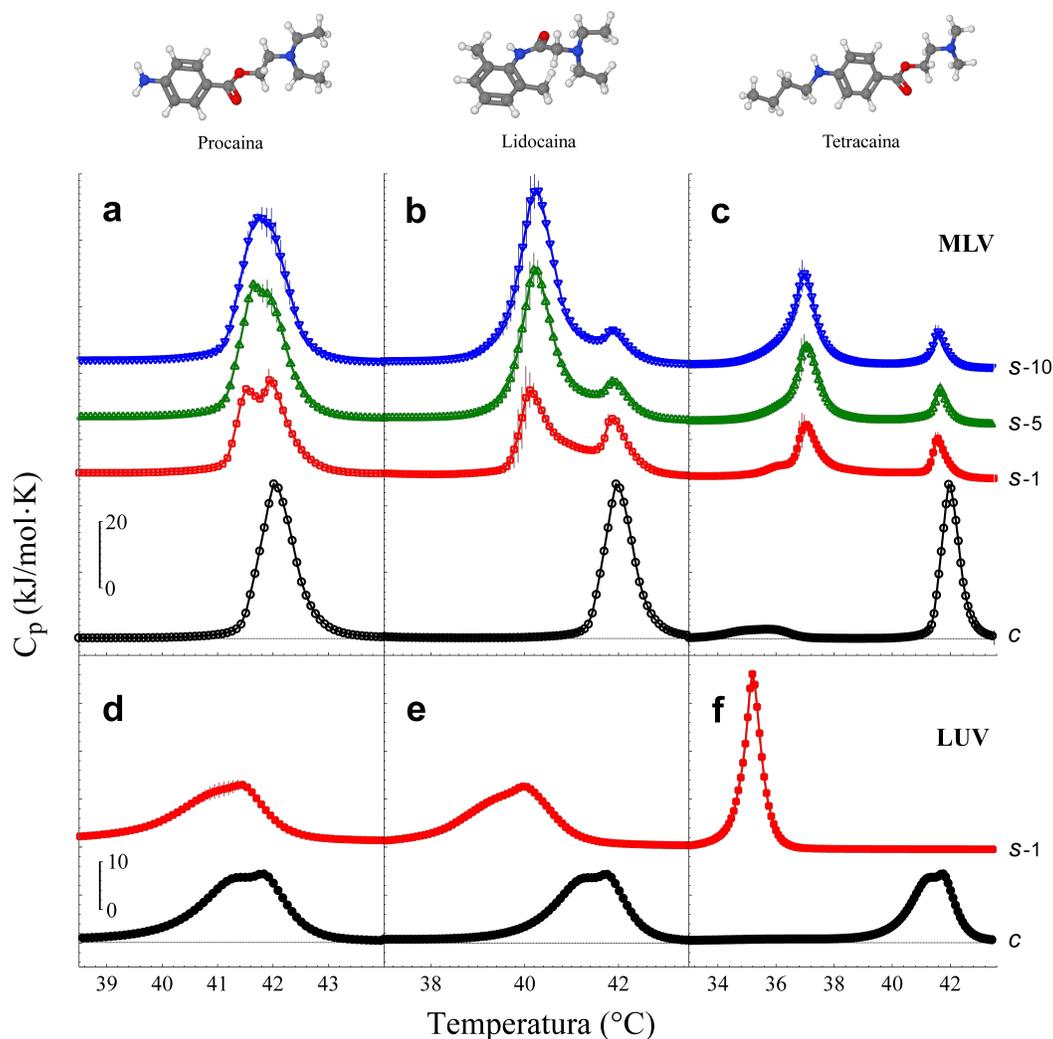


Figura 2.1: Perfiles calorimétricos de MLVs y LUVs bajo la influencia de los anestésicos locales. Los anestésicos locales fueron añadidos a la suspensión de MLVs y LUVs en su respectiva concentración clínica. Después de 10 min, se realizó una secuencia completa de barridos sucesivos en modo calentamiento. (a) Procaína (73 mM), (b) lidocaína (69 mM) y (c) tetracaína (25 mM). De este análisis se muestran los barridos 1 (s-1, \square), 5 (s-5, \triangle) y 10 (s-10, ∇). El tiempo entre barridos fue de aproximadamente 36 min. El mismo proceso se muestra para (d) procaína, (e) lidocaína y (f) tetracaína en una suspensión LUVs. Puesto que los barridos posteriores de LUVs no mostraron diferencias, solo se presenta el primer barrido (s-1, \square). Comúnmente se observaron diferencias intrínsecas entre MLVs y LUVs en los perfiles calorimétricos control, sin embargo, se sospecha que las ‘condiciones clínicas’ fueron la razón de la deformación peculiar en la transición principal de la LUV. Los experimentos control (c, \circ) muestran, tanto en MLVs como LUVs, la temperatura de transición principal en $42.0^\circ\text{C} \pm 0.01^\circ\text{C}$. Las soluciones fueron ajustadas a pH 5 (HCl/NaOH). Las barras de error muestran la desviación estándar.

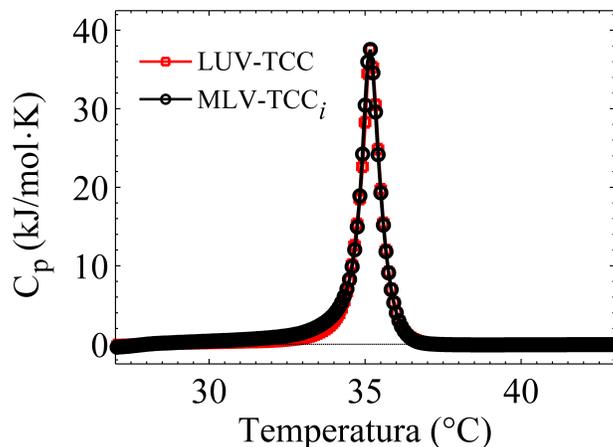


Figura 2.2: Comparación entre LUVs y MLVs bajo diferentes procesos de adición de TCC. En el caso LUVs, la TCC fue añadida una vez que las vesículas se formaron bajo el protocolo estándar (□). Mientras que para los MLVs, la TCC se mezcló previamente con la solución de lípidos en cloroformo/metanol (2:1, v/v), y después de la evaporación de los solventes se procedió a la hidratación y formación de MLVs; dando lugar a liposomas que contienen TCC en todas sus capas (○). Es evidente que ambos casos presentan una transición de fase ‘única’. En ambos casos las vesículas fueron preparadas en ‘condiciones clínicas’ y la TCC fue empleada a 25 mM. Cada experimento se llevó a cabo dos veces debido a la alta reproducibilidad. Las barras de error representan la desviación estándar.

Para comparar la difusividad entre los anestésicos locales y generales a través de las membranas de DPPC, se llevaron a cabo experimentos de DSC con anestésicos inhalatorios (Óxido nitroso, N₂O y Xenón, Xe) e intravenosos (pentobarbital, PB y propofol, PPF). Los experimentos se realizaron en agua ultrapura con la excepción del PB, el cual se usó mediante solución inyectable. Los resultados con inhalatorios (ver Fig. 2.3a, c) e intravenosos (ver Fig. 2.3b, d), ilustran una transición de fase ‘única’ tanto en MLVs como LUVs. Para los anestésicos intravenosos, el ΔT_m fue mayor para PPF que con PB. Por otro lado, con inhalatorios, el ΔT_m fue mayor para Xe que con N₂O, ambos aplicados en las mismas condiciones (40 atm). La hidrofobicidad innata de los anestésicos inhalatorios prohíbe su solubilidad en el medio acuoso de la suspensión de liposomas, por lo cual se requieren altas presiones para aumentar la solubilidad en agua de estos gases a través de la ley de Henry. Para ello se recurrió a un ‘sistema de alta presión’ (SAP), el cual se describe en capítulos posteriores. El uso de altas presiones es necesario para alcanzar el régimen de saturación del ΔT_m inducido por Xe [42] y N₂O (datos no mostrados). Cabe destacar que las altas presiones no son empleadas clínicamente, su uso es exclusivamente necesario para aumentar la solubilidad en agua de ambos gases. Independientemente, nuestros resultados con intravenosos e inhalatorios, en sus respectivas condiciones, son también consistentes con el orden de su hidrofobicidad y su potencia anestésica [43, 44]. En consecuencia, una transición de fase ‘única’ observada en MLVs nos permite inferir que los anestésicos generales presentan una difusión mucho más rápida. Los argumentos moleculares detrás de los resultados anteriores serán discutidos en las secciones posteriores. En el siguiente

apartado se muestra detalladamente el método usado para el estudio de la cinética de difusión y cómo ésta se ve modificada por distintos estados termodinámicos (fases) de la membrana.

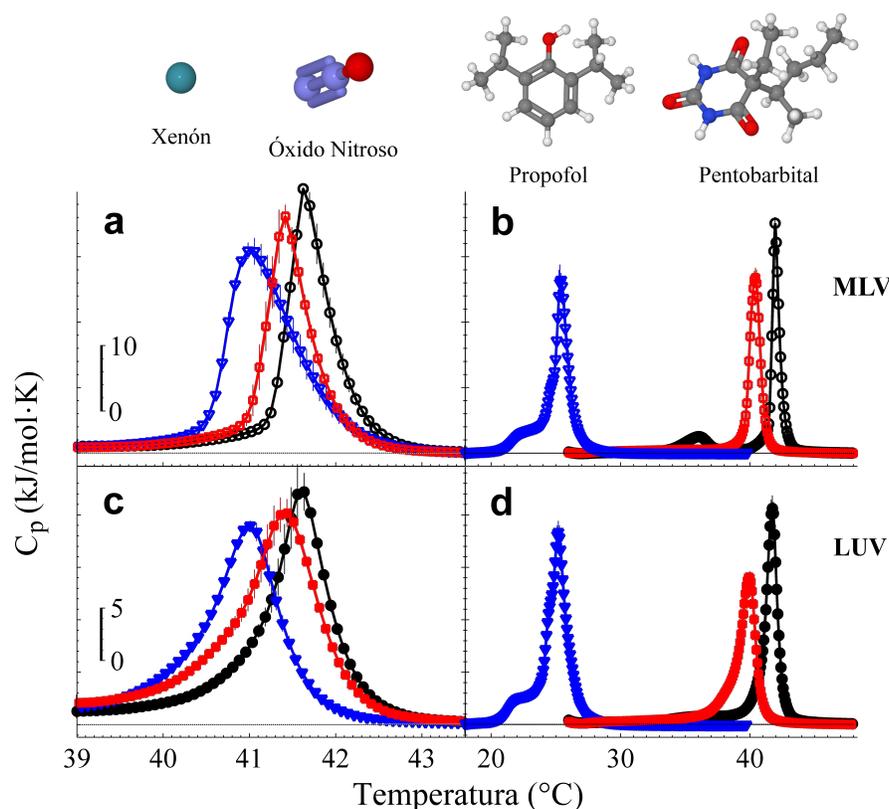


Figura 2.3: Perfiles calorimétricos de MLVs y LUVs bajo la influencia de anestésicos generales. Los anestésicos inhalatorios fueron introducidos a los MLVs y LUVs bajo un sistema de alta presión (HPS) a 40 atm, 70°C, durante 2 horas. Después de este proceso de presurización, se realizó una medición de DSC en modo calentamiento. Los anestésicos inhalatorios, Xe (◻) y N₂O (◿) en los sistemas MLV (a) y LUV (c). Los anestésicos intravenosos fueron añadidos a la suspensión de MLVs y LUVs a sus respectivas concentraciones, 56 mM (PPF) y 25 mM (PB). Después de 10 min se inició el barrido en modo calentamiento. Los anestésicos intravenosos, PB (◻) y PPF (◿) en los sistemas MLV (b) y LUV (d). Los experimentos control (○) muestran la temperatura de transición principal en 41.8°C ± 0.01°C. La solución fue ajustada a pH 5 (HCl/NaOH). Las barras de error representan la desviación estándar.

2.3.2. Cinética de difusión y su dependencia de fase

Para evaluar el tiempo de difusión de los anestésicos locales a través de múltiples bicapas, se eligió la TCC debido a que presenta el ΔT_m más grande en concentraciones clínicas (25 mM). Se obtuvo un conjunto de 65 barridos de DSC sucesivos (modo calentamiento) de una suspensión de MLVs para analizar la cinética de difusión de la TCC. Se comparó la cinética de difusión completa entre ‘condiciones clínicas’ y el caso de ‘condiciones libres’ (libre de NaCl y Phe) (ver

Fig. 2.4a). De la transición de fase ‘doble’, el pico izquierdo (H_1) corresponde a las membranas afectadas por TCC y el pico de la derecha (H_2) a las membranas que aún no han sido alcanzadas por la TCC. Es claro que la TCC induce considerablemente un mayor desorden de membrana en ‘condiciones clínicas’ que en ‘condiciones libres’. Sin embargo, independientemente del ΔT_m inducido por TCC, ambos perfiles cinéticos evidencian que mientras H_1 aumenta, H_2 disminuye. Después de un tiempo muy largo, la distribución homogénea de TCC a lo largo de las múltiples bicapas conduce a la desaparición del pico H_2 . Dicho estado final es equivalente tanto al caso LUV-TCC (ver Fig. 2.1c) como al caso donde la TCC es añadida a los MLVs desde el proceso de hidratación (ver Fig. 2.2). Se calculó la entalpía calorimétrica (ΔH), área bajo la curva, para cada barrido de DSC. El ΔH total es separado en dos secciones a partir el punto medio entre las dos transiciones, donde el área del pico izquierdo corresponde a H_1 y el área del pico derecho a H_2 (ver Fig. 2.4b). Posteriormente, las entalpías calorimétricas individuales fueron monitoreadas con el tiempo. El ΔH total (ΔH_{max}) siempre se conservó: $\Delta H_{max} = \Delta H_1 + \Delta H_2$; donde ΔH_{max} es aproximadamente 36.7 y 34.2 kJ/mol para las condiciones ‘clínicas’ y ‘libres’, respectivamente. Heurísticamente, en el caso del pico H_1 , el modelo de difusión que mejor se adaptó a nuestros resultados experimentales fue:

$$\Delta H_1(t) = \Delta H_{max}(1 - e^{-(\kappa t)^{1/4}}) \quad (2.1)$$

donde κ es un parámetro relacionado con la rapidez de penetración de la droga a través de bicapas (por simplicidad, lo llamamos ‘coeficiente de difusión’). Por otro lado, de la conservación de ΔH_{max} , es fácil observar que:

$$\Delta H_2(t) = \Delta H_{max}(e^{-(\kappa t)^{1/4}}) \quad (2.2)$$

A partir de las ecuaciones (2.1) y (2.2), los valores mejor ajustados para κ , en condiciones ‘clínicas’ y ‘libres’, fueron 2.35 y 0.45 s^{-1} , respectivamente (ver Fig. 2.4b). Por tanto, estos resultados sugieren que las ‘condiciones clínicas’ inducen una difusión más rápida. Hasta donde sabemos, no existen reportes previos con respecto a la permeabilidad y difusión de un fármaco en las diferentes fases de la membrana. Así que, para explorar la dependencia de fase de la membrana en la difusión de TCC, se realizó, en ‘condiciones libres’, una cinética de difusión similar en fase gel (25°C), en el punto de transición de fase (41.8°C) y en fase fluida (55°C) (ver Fig. 2.4c). Nuestros resultados en MLVs indican que la incubación de TCC en la temperatura de transición de fase muestra una difusión más rápida ($\kappa = 9.5 s^{-1}$) que en la fase de fluida ($\kappa = 1.7 s^{-1}$), que a su vez es más rápido que en fase de gel ($\kappa = 0.28 s^{-1}$). Estos resultados pueden explicarse si recurrimos a un hecho muy conocido: las fluctuaciones de entalpía en las membranas son maximizadas en el régimen de la transición de fase, lo que resulta en un máxima de capacidad calorífica pronunciado. Por otra parte, también se conoce que el volumen y el área de la membrana son sometidos a cambios significativos en dicho régimen de fusión, relacionados principalmente con isomerizaciones trans-gauche de las cadenas de lípidos. De las relaciones de proporcionalidad entre el volumen/área y entalpía en el régimen de fusión, la dependencia de la temperatura de las compresibilidades isotérmicas de volumen y de área son

calculadas como una función simple del cambio de capacidad calorífica en la transición [45]. Incluso ambas cantidades se han encontrado experimentalmente con máximos pronunciados en el régimen de fusión [46, 47]. Por lo tanto, nuestros resultados se correlacionan bien con la declaración anterior, donde tanto la compresibilidad isotérmica como la difusividad son máximas en la transición de fase (T_m), y consecutivamente, valores más altos en fase fluida que en gel. A continuación se muestra un estudio del ΔT_m como función del pH, exhibiendo efectos interesantes justo en el rango de pH de las ‘condiciones clínicas’.

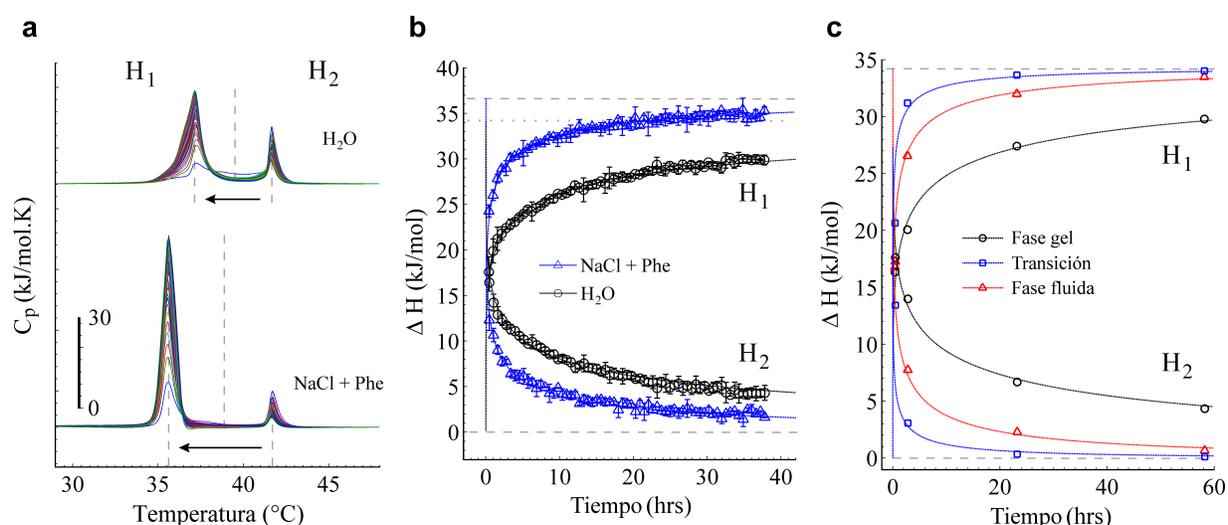


Figura 2.4: Caracterización, modelo difusivo y dependencia de fase de la cinética de difusión. (a) Secuencia de 65 perfiles calorimétricos de la cinética de difusión de TCC en condiciones ‘clínicas’ (curvas inferiores) y ‘libres’ (curvas superiores). La transición de fase ‘doble’ es dividida en dos secciones (H_1 y H_2) del punto medio entre ambas transiciones. El tiempo entre los barridos fue de aproximadamente 36 min. (b) Entalpías de H_1 y H_2 como función del tiempo para las condiciones ‘clínicas’ (Δ) y ‘libres’ (\circ). Se indican los modelos respectivos de mejor ajuste de donde se obtuvo el coeficiente de difusión, κ , de las condiciones ‘clínica’ (2.35 s^{-1}) y ‘libres’ (0.45 s^{-1}). Los valores de la entalpía calorimétrica total (ΔH_{max}) fueron 36.7 y 34.2 kJ/mol para las condiciones ‘clínicas’ (línea discontinua) y ‘libres’ (línea punteada), respectivamente. Las barras de error muestran la desviación estándar. (c) Entalpías de H_1 y H_2 como función del tiempo para los experimentos realizados en fase de gel (25°C ; \circ), fase fluida (41.8°C ; Δ) y la temperatura de transición de fase (55°C ; \square), en condiciones ‘libres’. Los valores de κ para la temperatura de transición de fase (9.5 s^{-1}), fase fluida (1.7 s^{-1}) y fase de gel (0.28 s^{-1}) fueron obtenidos a partir del mejor ajuste al modelo de difusión. Se llevaron a cabo únicamente cuatro etapas representativas de la cinética completa para describir la dependencia de fase de la membrana. La TCC fue añadida a los MLVs y se realizaron doce experimentos independientes incubados el tiempo y a la temperatura respectiva. La TCC fue empleada a 25 mM y la solución fue ajustada aproximadamente a pH 5 (HCl/NaOH).

2.3.3. Dependencia de pH: desorden y difusión.

Dependiendo del pH, diferentes estructuras moleculares de los anestésicos locales pueden ser favorecidas [29]. La TCC tiene dos sitios de protonación y por lo tanto dos valores de pK_a ($pK_{a1} = 3.4$ y $pK_{a2} = 8.4$) (datos obtenidos de *ChemAxon*); en consecuencia, ésta existe en tres estados diferentes. La figura 2.5a muestra la TCC en sus formas no-protonada (1), una vez protonada (2) y doblemente protonada (3). Con el fin de evaluar a fondo cómo las diferentes especies de TCC afectan al ΔT_m , se desarrollaron ensayos calorimétricos para MLVs en un amplio rango de pH, de 2 a 11. Para el control del pH, se utilizaron diferentes soluciones amortiguadoras en función del valor de pH deseado. La figura 2.5b muestra los perfiles de calorimetría con/sin TCC como función del pH. Los experimentos control sin TCC ilustran que tales amortiguadores no afectan la transición principal de las membranas de DPPC. Las especies protonadas de DPPC se vuelven predominantes por debajo de pH 1.8 (pK_a) (dato obtenido de *ChemAxon*). La repulsión electrostática de los grupos fosfato negativos es atenuada después de la protonación de la cabeza de lípidos, lo que implica una rigidización de la membrana donde se incrementa su T_m . Nuestro resultado a pH 2, $T_m = 43.5^\circ\text{C}$, está de acuerdo con observaciones preliminares del DPPC [48]. Por otra parte, la pequeña disminución de la T_m observada en los experimentos control a pH 11, podría atribuirse a un aumento del potencial electrostático negativo en los grupos fosfato debido a la baja concentración de protones. Tal tendencia del $\Delta T_m < 0$ en los experimentos control alcalinos (pH > 10) de DPPC, ha sido obtenida previamente [49]. También se ha reportado la hidrólisis ácida y alcalina del DPPC, sin embargo, ésta no es significativa sino hasta después de 1 día de incubación en condiciones extremas de pH [50]. El ΔT_m disminuye gradualmente hasta pH 10-11 (véase Fig. 2.5c inferior). La especie más hidrófoba de TCC (ver Fig. 2.5a, 1) es básicamente la más predominante por encima de pH 10 (véase Fig. 2.5c superior). Además, su baja solubilidad en agua induce la formación de cristales de TCC en solución, disminuyendo la concentración efectiva de TCC disponible para la interacción con la membrana. Por tanto, estos resultados evidencian que cuanto más sea el carácter hidrófobo de TCC, mayor será el ΔT_m . Sin embargo, de la figura 2.5b, se observa un pico control pequeño (transición de fase ‘doble’) en los experimentos de TCC entre pH 4-6. En primer lugar, nuestros resultados muestran la presencia de transiciones de fase ‘dobles’ exclusivamente entre pH 4-6, el cual corresponde precisamente al rango de pH de aplicación clínica. En segundo lugar, es evidente que el uso de soluciones amortiguadoras en los distintos experimentos de pH tiende a acelerar significativamente el proceso de difusión de la TCC con respecto a tanto condiciones ‘clínicas’ como ‘libres’ (ver Fig. 2.5a, primer barrido). En consecuencia, sospechamos que la participación de un tercer agente en el sistema H_2O -TCC es responsable de tales modificaciones en la difusión de la TCC. En el siguiente apartado se abordan los detalles moleculares detrás de este fenómeno, proponiendo un nuevo participante en la difusión de anestésicos; la tasa de protonación.

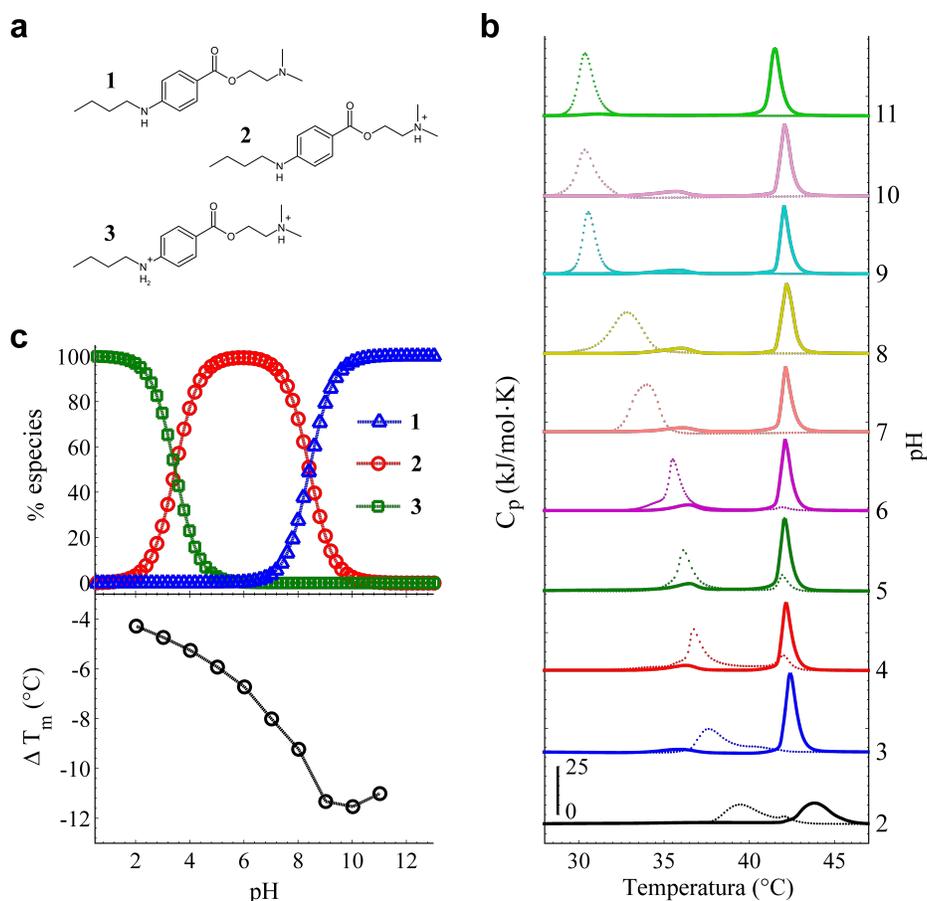


Figura 2.5: Dependencia de pH del ΔT_m . (a) Tres especies de TCC: no-protonada (1), una vez protonada (2) y doblemente protonada (3). (b) Perfiles calorimétricos de experimentos control (línea continua) y TCC (línea punteada) como función del pH. Las muestras de MLVs fueron preparadas en diferentes soluciones amortiguadoras en función de su rango de pH efectivo. Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones 'libres'. Es importante observar la aparición de transiciones de fase 'dobles' debido a la TCC justo en el intervalo de pH de la aplicación clínica (pH 4-6). (c) El panel superior muestra el porcentaje de la distribución de las especies de TCC como función del pH. Cuando el pH se encuentra por encima del pK_{a2} , la especie 1 es más favorecida. Entre los pK_{a1} y pK_{a2} , predomina más la especie 2, mientras que la 3 lo hace por debajo del pK_{a1} . El panel inferior muestra el ΔT_m entre los experimentos control y TCC presentados en b como función del pH.

2.3.4. Tasa de protonación efectiva intermolecular (TPEI).

La transferencia de protones juega un papel esencial en muchos sistemas biológicos [51, 52, 53]. Algunos reportes han mostrado tasas de transferencia de protones en el orden de femtosegundos hasta microsegundos, altamente dependiente de la estructura química de la molécula blanco y su entorno [54, 55, 56]. Recientemente, se han reportado diferencias pequeñas, pero

significativas, en las tasas de transferencia de protones en lisosomas entre células de pulmón normales (30 ps) y células de cáncer de pulmón (25 ps) [57]. Para determinar cómo la cinética difusiva de la TCC es modulada por la tasa de protonación, se utilizaron cuatro ácidos carboxílicos débiles (AC) (ácido fórmico, glicólico, cítrico y málico). Los AC seleccionados contienen diferentes 'grupos radicales' unidos al grupo carboxílico. Dado que los AC no son individualmente amortiguadores de pH, se ajustó cuidadosamente el pH a 5 antes de introducir la muestra en el equipo DSC. Este pH es un valor representativo del rango de pH de las 'condiciones clínicas', lo que implica una concentración constante de $[H^+]$ en cada uno de los experimentos. Por lo tanto, este argumento permite que el 'grupo radical' de los AC sea la variable libre, ya que la estructura química de cada 'grupo radical' proporciona una tasa particular de transferencia de protones con el medio, dando como resultado una 'TPEI'. La figura 2.6a muestra el primer barrido del experimento de AC respectivo. Es fácil observar que el caso 'H₂O' exhibe la etapa más temprana en el proceso cinético, que comprende solo dos reacciones de equilibrio acopladas (H₂O-TCC). A pH 5, el intercambio constante entre especies **2** (97.06%) y **3** (2.9%) de TCC es más favorecido que con la especie **1** (0.04%) (ver Fig. 2.5c superior). Por otro lado, con la participación de los AC, las etapas subsecuentes están dadas por los ácidos málico, cítrico, fórmico y ácido glicólico (véase la Fig. 2.6a, A, B, C, D, respectivamente), que muestran en su primer barrido una etapa cada vez más avanzada de la cinética difusiva. El caso de los AC ahora corresponde a tres reacciones de equilibrio acopladas (H₂O-TCC-AC) con diferentes tasas de transferencia de protones. Se realizaron experimentos control para ilustrar que los AC no afectan las membranas de DPPC (ver Fig. 2.7).

Para explorar las siguientes etapas de las cinéticas individuales de los AC en la difusión de la TCC, se trazaron las entalpías calorimétricas (H_1 y H_2) en función del tiempo (ver Fig. 2.6b). Solo 10 barridos de DSC (modo calentamiento) fueron suficientes para ilustrar que el mismo modelo de difusión rige los comportamientos temporales de los AC. La única diferencia es la rapidez (coeficiente de difusión, κ) para alcanzar el estado final. Para cuantificar los valores de κ para los AC, los datos fueron ajustados utilizando nuestro modelo de difusión. La figura 2.6c muestra los valores κ en función del AC respectivo. Este resultado revela que entre mayor sea el valor de κ , más rápida será la difusión del fármaco, y por lo tanto se requiere menos tiempo para alcanzar la etapa final (transición de fase 'única'). De esta manera, nuestros resultados con los anestésicos generales pueden conjeturar una κ muy grande, puesto que la etapa final (transición de fase 'única') se alcanza casi instantáneamente. Se sabe que cuanto menor es el valor de pK_a , más fuerte es el ácido [58]. Los valores de pK_a para los AC son 5.13 (ácido málico), 4.67 (ácido cítrico), 4.27 (ácido fórmico) y 3.53 (ácido glicólico) (datos obtenidos de *ChemAxon*), y si el agua es considerada como un ácido débil, su pK_a sería aproximadamente 15.7. Ya que la acidez no se correlaciona directamente con la tasa de transferencia de protones, estos resultados parecen esbozar un efecto producido por los AC, donde emerge una correlación entre los valores de pK_a y κ : entre más débil sea el ácido, más lenta será la difusión de la TCC.

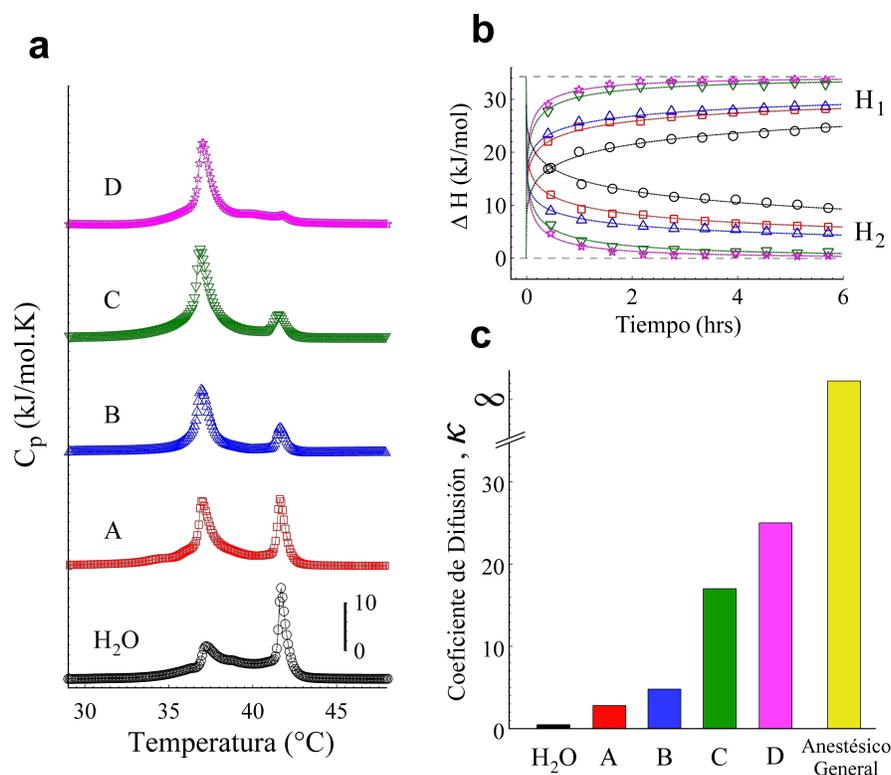


Figura 2.6: Cinética de difusión de TCC modulada por AC. Los liposomas MLVs fueron preparados en diferentes soluciones de AC, ajustados a pH 5 (HCl/NaOH). Después de 10 min de la adición de TCC (25 mM), se tomó una secuencia de 10 barridos consecutivos de DSC (modo calentamiento). (a) Los primeros barridos de cada AC fueron ordenados de acuerdo a su etapa en la cinética de difusión; H₂O (○), ácido málico (A, □), ácido cítrico (B, △), ácido fórmico (C, ▽) y ácido glicólico (D, *). (b) Entalpías de H₁ y H₂ como función del tiempo para H₂O y el respectivo AC. La línea discontinua superior representa el ΔH_{max} (~34.2 kJ/mol), que se mantiene constante a lo largo de todos los experimentos. (c) Los valores de κ respectivos fueron obtenidos a partir del mejor ajuste al modelo de difusión como se ilustra en b. Es importante tener en cuenta que la transición de fase ‘única’ obtenida para los anestésicos generales podría obedecer al modelo de difusión considerando un valor κ muy alto.

Basado en la suposición de que la TPEI es el resultado de una dependencia intermolecular de los participantes involucrados en el medio (H₂O-TCC-AC), sería crucial el cambio en la concentración de cualquiera de estos tres participantes. La figura 2.8 presenta resultados adicionales variando la concentración de AC (A = ácido málico) con el fin de destacar aún más la importancia del concepto ‘TPEI’. Se implementaron dos concentraciones distintas de AC en la preparación de MLVs, inferior (10 mM) y superior (0.1 M) a la usada anteriormente (10 mM). Este resultado sugiere que concentraciones de ácido málico más bajas o más altas reducen o aumentan la TPEI, lo que resulta en una difusión más rápida o más lenta de TCC, respectivamente.

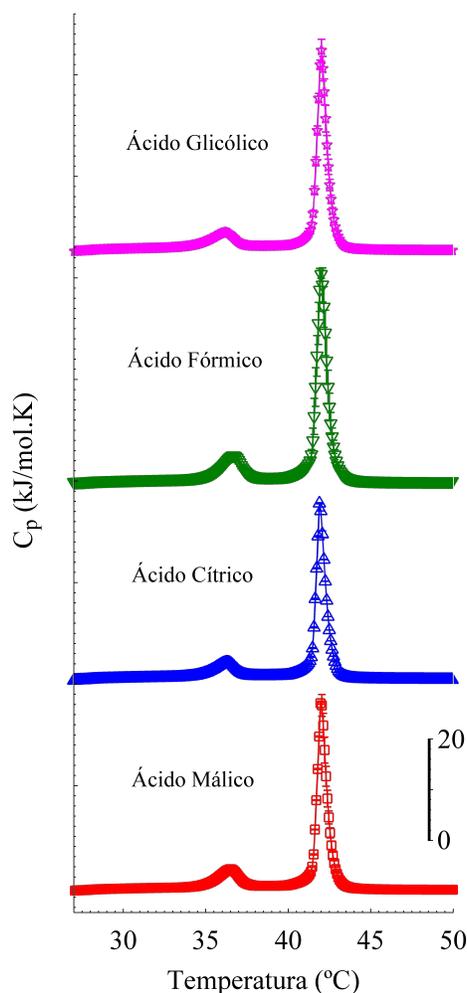


Figura 2.7: Experimentos control de MLVs bajo la influencia de AC. Los cuatro AC fueron probados de forma independiente a través de la solución de hidratación utilizada en la preparación de MLVs, a pH 5, sin TCC. Obsérvese que los AC no afectan la transición de las membranas en las condiciones empleadas.

Además, la figura 2.9 muestra claramente que la difusión de TCC también está regulada por su propia concentración (1:1, 1:6, 1:12 mol/mol DPPC/TCC), exhibiendo distintos ΔT_m . Este análisis sugiere que, efectivamente, la variación de la proporción de cualquiera de los tres participantes involucrados resulta en una TPEI diferente, regulando así la difusión del fármaco.

2.4. Aspectos moleculares de los fenómenos difusivos

Los argumentos moleculares detrás de los resultados anteriores se basan en la naturaleza química de ambos anestésicos locales y generales. Como se mencionó anteriormente, los anes-

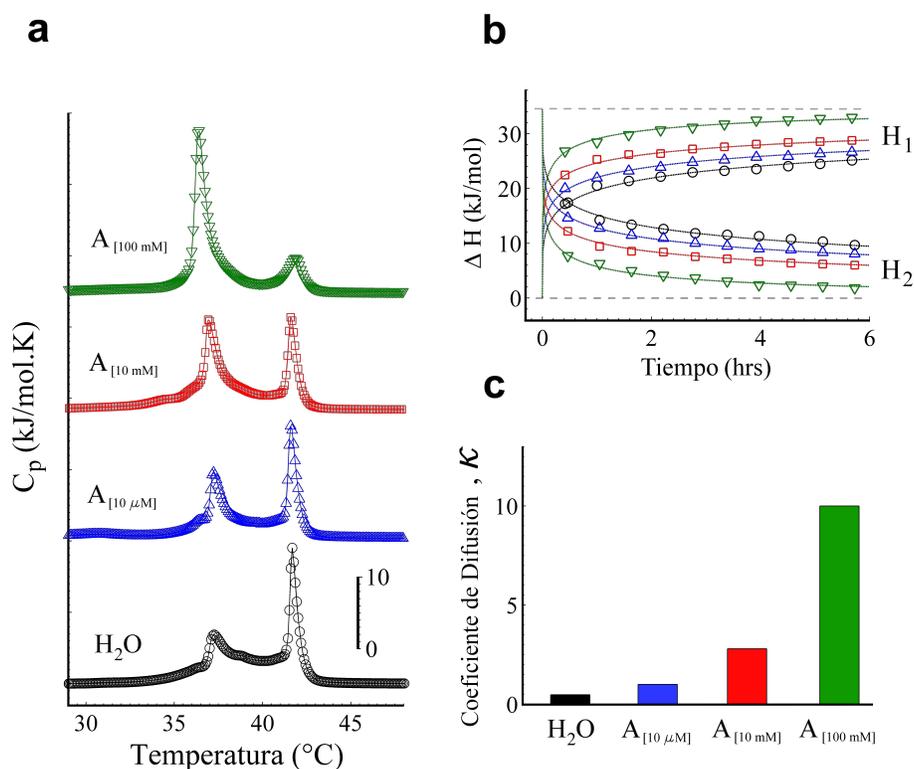


Figura 2.8: Cinética de difusión de TCC modulada por la concentración de ácido málico. Los liposomas MLVs fueron preparados en diferentes concentraciones de ácido málico (A), ajustados a pH 5 (HCl/NaOH). Después de 10 min de la adición de TCC (25 mM), se tomó una secuencia de 10 barridos consecutivos de DSC (modo calentamiento). (a) Los primeros barridos de cada caso se clasificaron de acuerdo a su etapa en la cinética de difusión; H_2O (\circ), ácido málico en 10 mM (Δ), 10 mM (\square) y 100 mM (∇). (b) Entalpías de H_1 y H_2 como función del tiempo para H_2O y la respectiva concentración de ácido málico. La línea discontinua superior representa el ΔH_{max} (~ 34.2 kJ/mol), que se mantiene constante a lo largo de todos los experimentos. (c) Los valores de κ respectivos fueron obtenidos a partir del mejor ajuste al modelo de difusión como se ilustra en b. Este resultado sugiere que las concentraciones inferiores o superiores de ácido málico reducen o aumentan considerablemente la TPEI, lo que resulta a su vez en una difusión de TCC más rápida o más lenta, respectivamente.

tésicos locales son bases débiles con uno o dos grupos amino protonables, que dependiendo del pH, se favorecen las especies protonadas o no-protonadas [29]. Los anestésicos generales son principalmente hidrofóbicos [59]; los inhalatorios no dependen del pH, mientras que los intravenosos no tienen sitios de protonación sino hasta valores extremos de pH. Las moléculas cargadas, tales como las especies protonadas de los anestésicos locales, son regidas por interacciones de tipo Coulomb de largo alcance. Por otra parte, las moléculas hidrofóbicas/átomos, tales como anestésicos generales o regiones hidrofóbicas no-protonadas de los anestésicos locales, se rigen por interacciones de van der Waals de corto alcance [60]. La figura 2.10a pro-

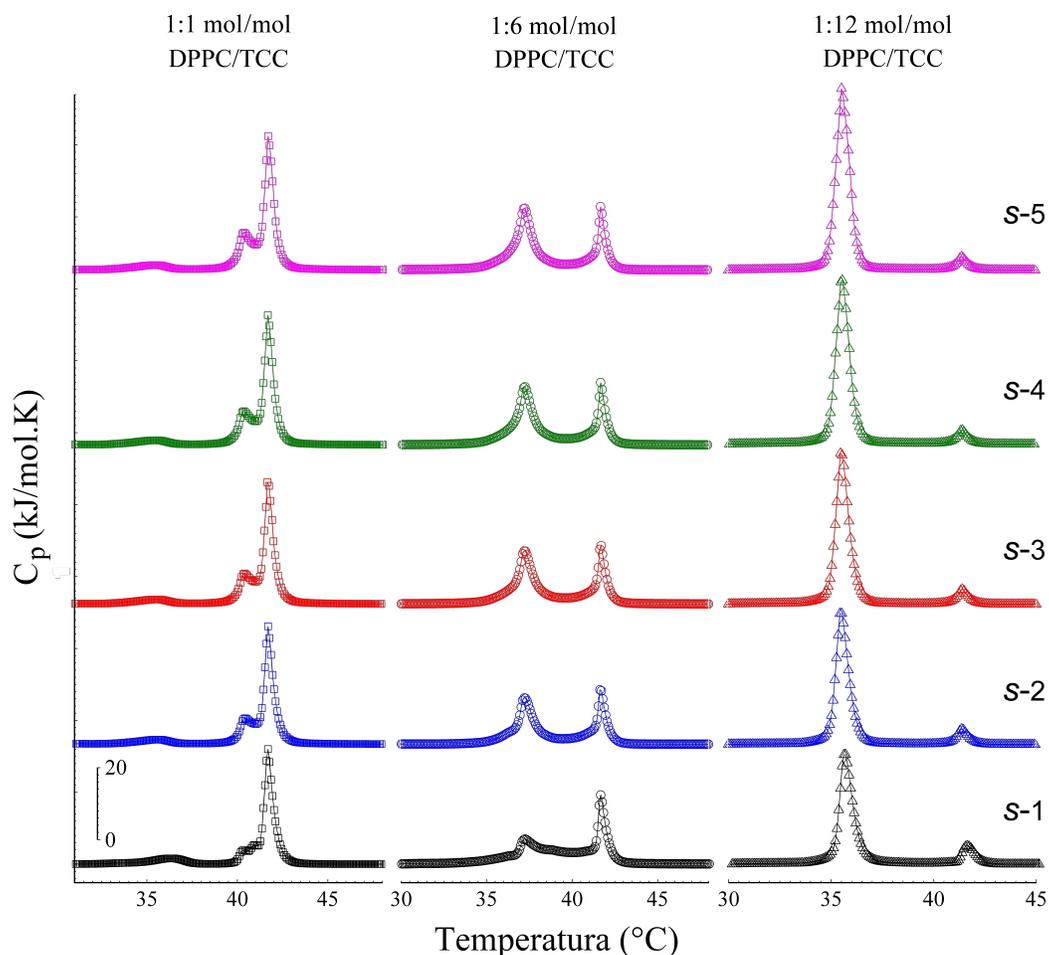


Figura 2.9: Cinética de difusión de TCC modulada por su propia concentración. Los liposomas MLVs fueron preparados en condiciones 'libres', ajustados a pH 5 (HCl/NaOH). Después de 10 min de la adición de TCC a su respectiva concentración, se tomó una secuencia de 5 barridos consecutivos de DSC en modo calentamiento (s-1-5). Se estudiaron 3 relaciones molares de DPPC/TCC; 1:1 (~4 mM TCC, cuadrados), 1:6 (~25 mM TCC, círculos) y 1:12 (~50 mM TCC, triángulos), mientras que el DPPC se mantuvo a una concentración constante de ~4 mM. Está claro que la difusión de TCC está regulada incluso por su propia concentración y su grado de desorden inducido en la membrana (ΔT_m).

porciona una representación esquemática de los potenciales de interacción coulombiana y van der Waals a través de una bicapa de DPPC. Las especies protonadas generalmente exhiben una posición bien definida en la región de la cabeza de lípidos con una orientación preferencial normal al plano de la bicapa, donde la amina terciaria cargada mantiene interacciones coulombicas mediadas por H_2O con los grupos fosfato negativos de los lípidos [61, 62, 63]. Esta interacción electrostática atractiva compite contra el ruido térmico por mantener interacciones duraderas. Algunos cálculos del potencial de fuerza media sugieren que la energía potencial de interacción entre TCC y la cabeza polar de los lípidos de membrana, es aproximadamente tres veces mayor

a la energía térmica ($K_B T$) para la especie cargada, mientras que es menor para la neutra [63]. En contraste, esta forma neutra de los anestésicos locales muestra una penetración más rápida en múltiples bicapas, siendo libre de difundirse en las direcciones laterales así como para saltar de un lado a otro en la bicapa [62, 63]. Debido a la energía potencial negativa de van der Waals en el núcleo acilo del ácido graso, las especies neutras de anestésicos son atraídas y localizadas en la parte superior de las colas de lípidos, perpendicular al plano de la bicapa. Por otro lado, cuando esta especie neutra se adentra aún más en el núcleo hidrofóbico de la bicapa (colas de lípidos) se asume una orientación paralela a dicho plano [62, 63].

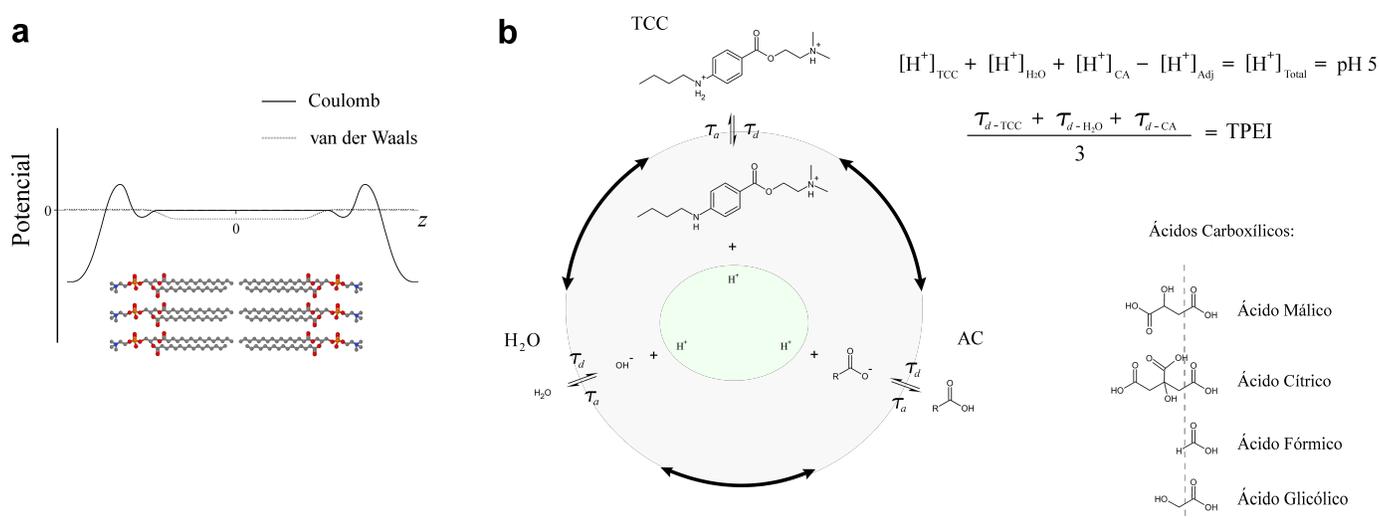


Figura 2.10: Aspectos moleculares detrás de la TPEI. (a) Potenciales de Coulomb y van der Waals a través de una bicapa de DPPC [64]. El grupo fosfato cargado negativamente posee un potencial de interacción negativa mientras que el grupo colina participa con una contribución positiva debido a sus respectivos cargos. Por otro lado, la hidrofobicidad de las cadenas ‘acilo’ contrasta un potencial de interacción negativo de van der Waals. (b) Tres diferentes reacciones acopladas participan en la transferencia dinámica de protones en el medio. La contribución total de protones ($[\text{H}^+]_{\text{Total}}$) de cada reacción fue ajustada a pH 5 utilizando NaOH ($[\text{H}^+]_{\text{Adj}}$). La TPEI puede ser considerada como una consecuencia de la dependencia mutua entre las reacciones involucradas (H_2O -TCC-AC), en las cuales está implicada la tasa de protonación de la TCC. El grupo radical de los AC es la única variable libre en estas reacciones, lo que conduce a una manipulación de la TPEI, que por lo tanto, a su vez regula la difusión de la TCC.

A pesar de que las moléculas hidrofóbicas requieren una distancia más cercana para interactuar y penetrar en las colas de lípidos, son capaces de escapar fácilmente del pozo de potencial (mínimo de energía) debido al ruido térmico (ver Fig. 2.10a). Esto sugiere cómo la especie 1 de TCC o cualquier anestésico general es capaz de penetrar a través de las múltiples bicapas lo suficientemente rápido para producir una transición de fase ‘única’. No obstante, la alternancia perpetua entre las especies protonadas y no-protonadas de los anestésicos locales modula

su solubilidad en lípidos [65], y por lo tanto, retrasa suficientemente su difusión a través de bicapas de lípidos para dar lugar a una transición de fase ‘doble’.

En la literatura, se han reportado tasas de transferencia de protones para el agua en el orden de femtosegundos [66], mientras que para el ácido fórmico en los nanosegundos [67]. Hasta donde sabemos, no existen evidencias sobre el resto de los AC que se utilizaron en este trabajo. Sin embargo, ya que las tasas de transferencia de protones para el agua y el ácido fórmico parecen estar en acuerdo con nuestros resultados (Fig. 2.6a, H₂O y C), es de esperar que los otros tres AC se ajusten a esta correlación. Si tenemos en cuenta que el medio posee siempre la misma [H⁺] (pH 5), la única variable libre reside en el ‘grupo radical’ de los AC. Es bien sabido que la fuerza de ácidos débiles es modificada por la electronegatividad de los átomos que componen el ‘grupo radical’. Valores de pK_a bajos para AC fuertes puede atribuirse a una baja retención electrostática de H⁺ en el grupo protonable, explicando la acidez adquirida del medio. Esta retención electrostática de H⁺ puede resultar en una tasa de protonación baja. La suposición anterior también podría explicar por qué la necesidad de disminuir el pH hasta el valor pK_a incrementando así las especies protonadas, a pesar de la baja retención electrostática de H⁺ de la molécula. En conjunto, podemos concluir que entre más débil sea el AC, más alta será su ‘tasa de protonación’.

La figura 2.10b esquematiza las tres reacciones de equilibrio acopladas, las cuales dependen de ‘grupo radical’ de los AC. El pH ajustado a 5 representa la concentración efectiva de protones [H⁺] del medio. Se espera que el TPEI sea función de las tasas de transferencia de protones individuales de cada una de las tres reacciones de equilibrio acopladas. Así, la dependencia mutua entre la TPEI y la regulación de las especies **2** y **3** de TCC, permite por lo tanto la modulación de la difusión del fármaco. Es importante tener en cuenta que la interacción electrostática entre la amina terciaria positiva de la TCC, correspondiente al pK_{a2} (8.4), y el grupo fosfato del lípido negativo, produce una ligera disminución de tales valores de pK_a [68]. Asimismo, el pK_{a1} (3.4) podría ser desplazado hacia valores inferiores o superiores debido a una interacción electrostática similar. Puesto que los experimentos de AC se llevaron a cabo a pH 5, el intercambio más relevante de especies de TCC ocurre entre **2** y **3** (pK_{a1}). La perturbación del pK_{a1} debido a la interacción TCC-membrana es capaz de afectar, por tanto, la transferencia de protones entre ambas especies de TCC (**2** y **3**). Sin embargo, este efecto es incluido en el TPEI, permaneciendo constante en todos nuestros experimentos.

En general, nuestros datos demuestran que las diferencias en el TPEI juegan un papel crucial en la cinética de difusión de los anestésicos locales a través de múltiples membranas. Desde el punto de vista fundamental nuestros resultados sugieren que la “difusividad” ilustra la esencia inherente detrás del anestésico local o general, lo que podría conducir a la comprensión de un mecanismo de la anestesia más completo. Por otro lado, desde el punto de vista aplicado estos hallazgos prometen una aplicación potencial en la medicina, en particular en la anestesiología, proponiendo el diseño de nuevos fármacos así como también la modulación de la difusión por medio de un ‘agente regulatorio’ en el vehículo de aplicación.

2.5. Metodología experimental

Reactivos. El DPPC fue adquirido en Avanti Polar Lipids, manipulado sin purificación posterior. NaCl, clorhidrato de Phe, clorhidrato de PCN, clorhidrato de LCN, clorhidrato de TCC, PPF, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido málico, ácido glicólico, ácido fórmico, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), tris(hidroximetil)aminometano (TRIZMA), 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (AMPD), 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) y ácido 4-(ciclohexilamino)-1-butanosulfónico (CABS) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. PB sal de sodio fue adquirido en Cheminova (inyección de PB sódico). Todas las sustancias químicas fueron manipuladas sin purificación adicional.

Preparación de MLVs y LUVs. Los lípidos fueron hidratados con la solución acuosa deseada (H₂O Milli-Q, 18.2 MΩ.cm, pH 4-6) por encima de la temperatura de transición del DPPC (41.6°C). La suspensión fue agitada suavemente a 600 rpm durante 30-40 min a 55°C, usando una estación de degasificación (TA Instruments). Este procedimiento genera vesículas multilaminares (MLVs). Los LUVs fueron preparados a partir de la suspensión de MLVs por extrusión a través de membranas de policarbonato de 100 nm (Membranas Nucleopore, Whatman). Este proceso también fue realizado por encima de la transición de fusión de los lípidos usando un mini-extruder (Avanti Polar Lipids). Se usó una concentración de lípidos de 4 mM en todos los experimentos.

Análisis calorimétrico. Los perfiles de capacidad de calorífica fueron tomados a una velocidad de barrido constante de 1°C/min y una presión constante de 3 atm. Antes de que las muestras fueran introducidas en los capilares del DSC, las muestras fueron degasificadas a baja presión (635 mmHg) durante 10 min a 25°C. El calorímetro (microcalorímetro, NanoDSC, TA Instruments) fue conectado por medio de una interfaz a una PC, y los datos fueron analizados utilizando el software proporcionado con el instrumento. Previo a comenzar la exploración calorimétrica, las muestras se equilibraron térmicamente durante 5 min a 25°C. La mayoría de los barridos se realizaron en modo calentamiento de 25 a 50°C. Todos los experimentos de DSC se llevaron a cabo únicamente dos veces debido a la alta reproducibilidad. Los detalles sobre la preparación de las muestras se describen más adelante.

Experimentos con anestésicos locales. En ambas preparaciones, MLVs y LUVs, se utilizó una solución de hidratación de NaCl 100 mM en agua ultrapura. Ambas suspensiones de lípidos fueron ajustadas a las condiciones clínicas estándar mediante la adición del respectivo anestésico PCN (73 mM), LCN (69 mM), TCC (25 mM) y Phe (0.97 mM) [38, 69, 36]. Clínicamente, la Phe es utilizado como vasopresor con el fin de contrarrestar el efecto hipotensor de anestésicos [38]. La solución fue ajustada a pH 5 (HCl/NaOH). Los experimentos control se llevaron a cabo en las mismas condiciones sin el uso de anestésicos. El análisis de DSC se inició 10 minutos después de que los liposomas y el anestésico en cuestión entraran en contacto, de los cuales 5 minutos corresponden a la termalización previa del DSC. Se realizó una secuencia de 10 barridos consecutivos en modo calentamiento para cada experimento.

Experimentos con anestésicos inhalatorios. Se utilizó un 'sistema de alta presión' (SAP) construido en nuestro laboratorio para exponer la suspensión de liposomas a los gases Xe y

N₂O. Los detalles completos del arreglo experimental se describirán en el siguiente capítulo. Tanto MLVs como LUVs, preparados en agua ultrapura, fueron depositados en la SAP donde se introdujo el gas correspondiente. La solución fue ajustada a pH 5 (HCl/NaOH). La temperatura de las muestras fue controlada mediante un sistema de recirculación de agua (PolyScience) conectado al SAP. Este dispositivo fue diseñado para alcanzar altas presiones, lo que nos permitió aumentar alrededor de 10 veces la presión inicial de la cámara. Los parámetros en el proceso de presurización de Xe y N₂O fueron el tiempo de exposición (2 horas), la temperatura (70°C) y la presión de gas (40 atm). Una vez que se alcanzó la presión deseada, comenzó el tiempo de exposición. Por último, una vez que la suspensión de liposomas fue retirada del SAP, se lleva a cabo el análisis calorimétrico. La ley de Henry nos ayudó a comprender cómo los gases se incorporan en la suspensión acuosa [42]. Esta ley establece que, a temperatura constante, la solubilidad de cierto gas en un líquido es directamente proporcional a la presión del gas aplicada sobre líquido.

Experimentos con anestésicos intravenosos. Los liposomas MLVs y LUVs se prepararon en agua ultrapura en donde posteriormente se añaden las concentraciones correspondientes de PPF (56 mM) y PB (25 mM). La solución fue ajustada a pH 5 (HCl/NaOH). Los experimentos de PPF y PB fueron realizados de 15 a 45°C y 25 a 50°C, respectivamente. Los experimentos control se llevaron a cabo en las mismas condiciones sin el uso de anestésicos. El análisis de DSC se inició 10 minutos después de que los liposomas y el anestésico en cuestión entraran en contacto. Se realizó una secuencia de 10 barridos consecutivos en modo calentamiento para cada experimento. Sin embargo, todos los perfiles calorimétricos fueron idénticos (transición de fase 'única').

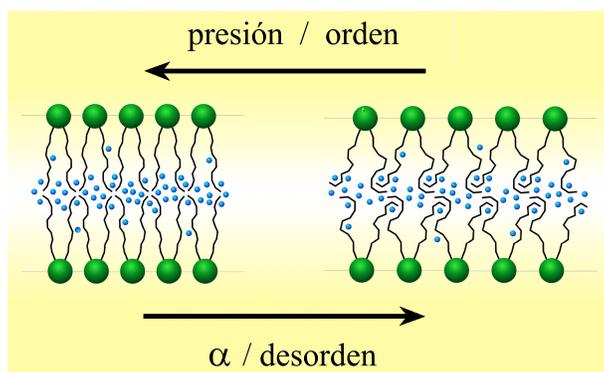
Dependencia de fase de la cinética de difusión. Los liposomas MLVs fueron preparados en agua ultrapura. La solución se ajustó aproximadamente a pH 5 (HCl/NaOH). Se incubaron diferentes muestras con TCC (25 mM) a 25°C (fase gel), 41.8°C (temperatura de fusión) y 55°C (fase fluida). Se llevaron a cabo cuatro etapas representativas de la cinética completa en cada fase (0, 3, 24 y 60 horas). El experimento respectivo se realizó bajo el análisis calorimétrico descrito anteriormente.

Dependencia de pH del ΔT_m . Se realizaron distintas preparaciones de liposomas MLVs en 10 mM de las siguientes soluciones amortiguadoras: glicina-HCl (pH 2), ácido cítrico-citrato de sodio (pH 3, 4 y 5), MES (pH 6), TRIZMA (pH 7), AMPD (pH 8 y 9), AMP (pH 10) y CABS (pH 11). La TCC fue empleada a 25 mM, y las soluciones fueron ajustadas al valor de pH respectivo (HCl/NaOH). Los experimentos control se llevaron a cabo en las mismas condiciones sin el uso de anestésicos.

Dependencia de AC's en la cinética de difusión. Se realizaron distintas preparaciones de liposomas MLVs en soluciones con 10 mM de cada uno de los siguientes AC: ácido málico, cítrico, fórmico y glicólico. Las muestras fueron ajustadas a pH 5 (HCl/NaOH) antes de ser introducidas al DSC. La TCC fue empleada a 25 mM. El análisis de DSC se inició 10 minutos después de que los liposomas y la TCC entraran en contacto. Los experimentos control se llevaron a cabo en las mismas condiciones sin el uso de anestésicos.

3

Gases nobles en membranas de lípidos modelo



3.1. Resumen

El mecanismo de cómo un gas noble modifica la excitabilidad de las células nerviosas y cómo dicha excitabilidad puede ser recuperada bajo presión hiperbárica sigue siendo desconocido. En este capítulo, a través de un estudio calorimétrico, abordamos el fenómeno de la ‘depresión del punto de fusión’ (DPF) inducido por los gases nobles en membranas de lípidos modelo (DPPC), y su recuperación parcial con presión hidrostática. Se encontró además una correlación importante entre la polarizabilidad dipolar eléctrica (α) de estos gases y su efecto en la transición de fusión de las membranas. Estos resultados coinciden con otros hallazgos que apoyan la idea de que la anestesia general solo depende de la capacidad de ciertos átomos o moléculas para aumentar el desorden general de la membrana plasmática.

3.2. La anestesia de los gases nobles

Como vimos en capítulos anteriores, existe una gran variedad de especies químicas de anestésicos y la regla de Meyer-Overton correlaciona de forma robusta su solubilidad en grasas y potencia anestésica. Sin embargo, ¿qué hace un gas noble, neutro, inerte y muy polarizable en dicha regla? Esto cuestiona a su vez los modelos vigentes de receptor-ligando y motiva el estudio de las interacciones entre gases nobles y estructuras lipídicas.

Aunque los gases nobles poseen aparentemente mínimas capacidades de interactuar con sitios de acción putativos, el Xenón es usado clínicamente como anestésico [70]. Además, el kriptón y argón muestran un efecto anestésico a presiones hiperbáricas, mientras que por otro lado, el neón y el menos narcótico, helio, no causan anestesia a presiones parciales sino hasta sus umbrales convulsivos [71, 72]. Curiosamente, incluso el nitrógeno es capaz de inducir narcosis a presiones hiperbáricas [73]. Actualmente, no se han identificado bien los sitios de acción específica para los gases nobles y N_2 , sin embargo, algunos estudios proponen una acción inhibitoria en sitios hidrofóbicos dentro de canales iónicos tales como los receptores N-metilo-D-aspartato (NMDA) [74, 75] y α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) [76, 77], mientras que con el receptor γ -aminobutírico ($GABA_A$) [74, 78] el efecto es despreciable. Otras proteínas han sido postuladas para dicho paradigma [79, 80]. Independientemente de la proteína propuesta, esta percepción indica cambios estructurales causados por los anestésicos, sin embargo, como se discutirá más adelante, la presión hidrostática y otros agentes que revierten la anestesia difícilmente podrían proveer una reversibilidad estructural en las proteínas sin considerar el medio lipídico. Esto solo se ha justificado a través de una dislocación/disociación entre las moléculas anestésicas y sus respectivos sitios de acción [81].

La simplicidad y elegancia de los gases nobles surge del hecho de que todos estos elementos poseen orbitales exteriores completamente llenos de electrones, éstos son simétricamente esféricos, y en consecuencia, son neutros y no tienen momentos dipolares permanentes. Esta peculiaridad hace que no sean capaces de formar puentes de hidrógeno con otros elementos

(al menos en condiciones normales). Estas características magnifican el problema para explicar cómo los gases nobles pueden producir anestesia a través de un enlace específico y suficientemente duradero según la hipótesis del receptor proteico. Por consiguiente, el papel de los gases nobles en la anestesia general puede brindar pistas hacia un mecanismo más adecuado. Igualmente esencial, cualquier intento por definir tal mecanismo molecular debe explicar también el fenómeno de la reversibilidad con presión, el cual se discutirá más adelante. En este apartado se muestra, por primera vez, un estudio experimental del fenómeno de la depresión del punto de fusión (DPF) en membranas puras de lípidos inducido no solo por el Xenón, sino por otros tres gases nobles (He, Ar y Kr).

3.3. Efecto de los gases nobles en la transición de fase de membranas

3.3.1. Caracterización del sistema experimental

Con el fin de explorar la difusividad de los gases nobles en una suspensión de liposomas, se llevó a cabo un estudio previo de caracterización del gas Xenón en función de la presión y tiempo de exposición. En este estudio recurrimos a vesículas unilaminares pequeñas (SUVs) compuestas de DPPC como ‘membrana modelo’ (véase ‘Metodología experimental’ al final del capítulo). La figura 3.1 muestra el valor absoluto del cambio en la temperatura de fusión (ΔT_m) de los liposomas dopados con Xe como función del tiempo de exposición, a 4 atm y 30°C. De estos resultados se puede observar que 2 hrs de exposición al Xe representa el tiempo mínimo para permitir que este gas se difunda hacia los liposomas y produzca su máximo efecto. Una correlación análoga se puede observar para distintas presiones de Xe, con parámetros de presurización de 2 hrs y 30°C. De esto último, el punto de saturación (~ 3 atm) representa la capacidad máxima de los liposomas para contener átomos de Xe e inducir su efecto máximo en el punto de fusión. Al igual que con este gas, una tendencia similar, pero con puntos de saturación más bajos, se puede observar para el resto de los gases nobles; He, Ar, and Kr (datos no mostrados aquí). Por otra parte no se observó ninguna dependencia con el estado termodinámico de la membrana, i.e., el efecto de los gases nobles es el mismo a temperaturas debajo (fase gel) o por encima (fase líquida) de la T_m de las membranas durante el proceso de presurización.

La solubilidad los gases en agua esta dada por la constante de Henry (k_H), la cual a su vez depende de la temperatura [82]. La ley de Henry puede ser usada para obtener una aproximación de la concentración de gas en el medio acuoso como función de la presión aplicada. A continuación se muestra este proceso para los parámetros del Xe, pero es posible esbozar una aproximación similar para los otros gases, usando su correspondiente k_H a la temperatura del experimento. La k_H del Xe es aproximadamente $1.4 \times 10^{-4} \frac{\text{mol}_{\text{gas}}}{\text{atm} \cdot \text{mol}_{\text{soln}}}$, a 30°C [82]. A partir del peso molecular del agua (~ 18.015 g/mol) y su densidad (~ 995.678 g/L) a 30°C [83], se

puede obtener para el agua una molaridad de ~ 55.269 mol/L. Relacionando estos parámetros con la ley de Henry, y usando 1 atm de Xe, se estima que la molaridad de dicho gas es $\sim 7.738 \times 10^{-3} \frac{\text{mol}_{\text{gas}}}{\text{L}}$. Por lo tanto, debido a la linealidad de la ley de Henry, es posible establecer una relación general entre la molaridad del gas (M_{Xe}) y la presión (P_{Xe}) a 30°C : $M_{Xe} \approx 7.738 \times 10^{-3} \frac{\text{mol}_{\text{gas}}}{\text{atm}\cdot\text{L}} \cdot P_{Xe}$.

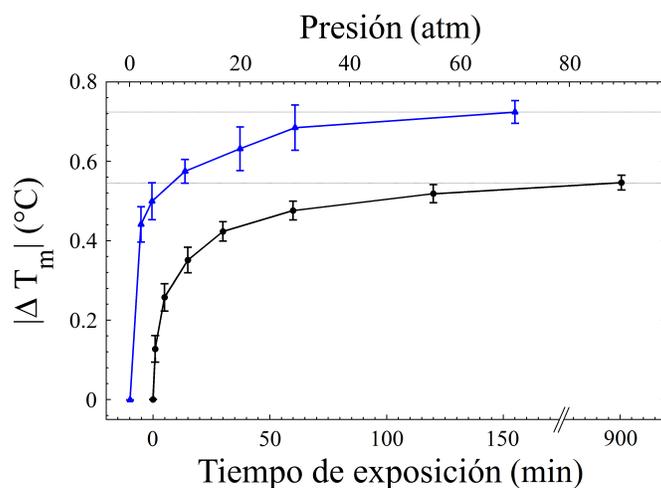


Figura 3.1: Caracterización del efecto del gas Xenón en liposomas. $|\Delta T_m|$ como función de los tiempos de exposición al Xe (\circ) y presiones aplicadas (Δ). Puesto que ΔT_m es siempre negativo (la temperatura final es siempre menor que la inicial), se grafica el valor absoluto para ilustrar la saturación del cambio a altas presiones y tiempos de exposición. La temperatura de fusión control para el DPPC fue $41.815^\circ\text{C} \pm 0.011^\circ\text{C}$, medido a 3 atm.

Una vez explorados los parámetros de presión y tiempos de exposición del Xe en la suspensión de liposomas, es posible abordar el estudio comparativo entre los distintos gases nobles. En el siguiente apartado discutiremos el efecto de los gases nobles en función de algunas de sus propiedades físicas intrínsecas, las cuales pueden ser determinantes en su acción anestésica.

3.3.2. Polarizabilidad y desorden de lípidos

Puesto que tanto los gases nobles como los diatómicos son neutros y no polares, no existen interacciones electrostáticas tipo Coulomb relacionadas con su modo de acción anestésica. Sin embargo, permanecen dos componentes imperativas de la energía de ligadura de van der Waals: el término carga-dipolo inducido (energía de Debye) y el término dipolo inducido-dipolo inducido (energía de dispersión de London). La polarizabilidad dipolar eléctrica (α) es una propiedad física estrechamente relacionada con estas energías de dispersión y representa una medida de la distorsión de las nubes electrónicas de las moléculas en interacción. Entre mayor sea el átomo/molécula (i.e. entre mayor sea la nube electrónica), más grande es α , y por lo

tanto, su hidrofobicidad. Así, entre mayor sea la α de un anestésico, mayor será su tendencia para alcanzar el núcleo hidrofóbico de una membrana de lípidos, lo cual podría perturbar la estabilidad estructural de las colas de los lípidos.

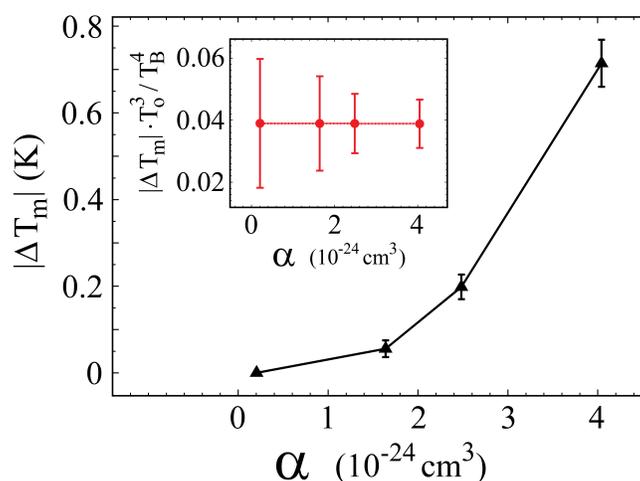


Figura 3.2: Efecto de los gases nobles en la transición de fase de membranas. ΔT_m como función de la polarizabilidad dipolar eléctrica de los gases nobles (Δ). El recuadro interno (\circ) muestra un colapso adimensional del mismo efecto con los puntos de ebullición (T_B) de los respectivos gases y la temperatura del experimento (T_0). Las polarizabilidades de los gases fueron tomadas de [84].

La figura 3.2 muestra el ΔT_m producido por los gases nobles como función de sus respectivas α . El neón, cuyo efecto puede ser considerado entre el helio y el argón, no fue implementado en este trabajo. Todos los gases fueron empleados bajo las mismas condiciones, buscando su efecto máximo: 100 atm de presión durante 2 hrs a 70°C (T_0). El recuadro interno ilustra un colapso adimensional a un mismo valor (~ 0.04) usando el punto de ebullición de cada gas (T_B) y la temperatura del experimento (T_0). La T_B , como algunas otras propiedades de estos gases, está directamente relacionada con las interacciones de van der Waals, donde α está implicada, por lo cual, el colapso obtenido muestra que α puede ser considerada como una signatura en el efecto producido por los gases nobles en membranas de lípidos.

Desde la nube electrónica más pequeña del helio hasta la más grande del Xenón, ocurre una correlación significativa: a mayor α , mayor es el corrimiento en la T_m hacia bajas temperaturas. Puesto que la temperatura es una manifestación de la energía cinética y la cohesión de la energía potencial, el balance entre estas dos formas de energía es responsable de las propiedades físicas de la materia [85]. De modo que, si la cohesión de un sistema es reducida, se requiere menor temperatura para fundirlo. Esto se vuelve más claro si recordamos que siempre hay un equilibrio entre los términos entálpicos y entrópicos como se expresa en la ecuación de la energía libre: $G = H - TS$ [86]. Cuando un átomo noble se difunde dentro de las membranas, 'H' se vuelve menos negativa (i.e. la energía potencial cohesiva entre lípidos decrece), por lo tanto 'S'

aumenta conforme el sistema se vuelve más desordenado. El incremento de entalpía, debido al gas noble intruso, podría ser explicado usando el término Axilrod-Teller del dipolo-triple en el potencial de interacción [87, 88]. Este término es positivo para un arreglo triangular agudo de átomos y negativo para geometrías lineales. Es importante tener en cuenta que la mayor parte del tiempo la interacción de tres cuerpos es positiva, ya que la energía térmica aumenta la probabilidad de encontrar configuraciones triangulares. En una membrana, dos colas de lípidos están unidas por interacciones de van der Waals (la cohesión efectiva de todo el sistema está dada por la suma de estas interacciones por pares). Cuando un átomo noble se aproxima a estas colas de lípidos e interactúa como un tercer cuerpo, es capaz de perturbar la interacción lípido-lípido con una contribución positiva la cual es proporcional a α y escala como r^{-9} [87]. En los gases raros esta contribución es muy pequeña y no afecta a cualquier propiedad medible, excepto cuando los átomos forman un cristal [87]. Es por esto que en el caso de una membrana (visto como un cristal de lípidos) el efecto de un tercer cuerpo es notable, reduciendo la cohesión y, por lo tanto, la T_m . En resumen, visto como un fenómeno de ‘causa-efecto’, se produce el siguiente curso de acontecimientos: un gas noble entra en la membrana, reduce la cohesión (a través del término positivo del dipolo-triple) visto como un incremento de entalpía, que por ende genera un aumento de entropía y, finalmente, ocurre una reducción en la temperatura de fusión del sistema. Esto sugiere una conexión clara entre α y los cambios estructurales ejercidos por los gases nobles en las membranas lipídicas. El efecto se representa esquemáticamente en la figura 3.3.

Las variables físicas de membranas de lípidos, tales como el orden de lípidos, área lateral y volumen, pueden ser gradualmente alterados con la inclusión de átomos inertes, los cuales comparten una única variable física en común: su tamaño y α . Algunos detalles moleculares adicionales son necesarios para elucidar el desorden causado por otras especies de anestésicos más complejas. Mientras que algunos estudios de dinámica molecular reportan una mayor afinidad del Xenón por el núcleo hidrofóbico de membranas [89], otros estudios experimentales sugieren que la interacción Xe-membrana es dirigida a la región anfifílica de los lípidos [90]. Sin embargo, sea cual sea la región precisa de interacción, el desorden de la membrana de lípidos causado por los gases nobles es un hecho inexorable.

3.4. Reversibilidad estructural con presión

Si existiera algún sitio de acción más relevante para el fenómeno de la anestesia, una clave importante para comprender este problema sería el hecho de que la anestesia general es dependiente de la presión hidrostática.

Los primeros indicios del efecto reversible de la anestesia mediante el uso de presión fueron demostrados en el nado de renacuajos [91], donde la presión hidrostática (200-300 atm) fue capaz de revertir el efecto anestésico del etanol y etil carbamato. Subsecuentemente, otros trabajos experimentales sobre este fenómeno fueron extendidos a tritones, ratones y algunos organismos marinos [92, 93, 94], usando una amplia variedad de anestésicos tanto líquidos

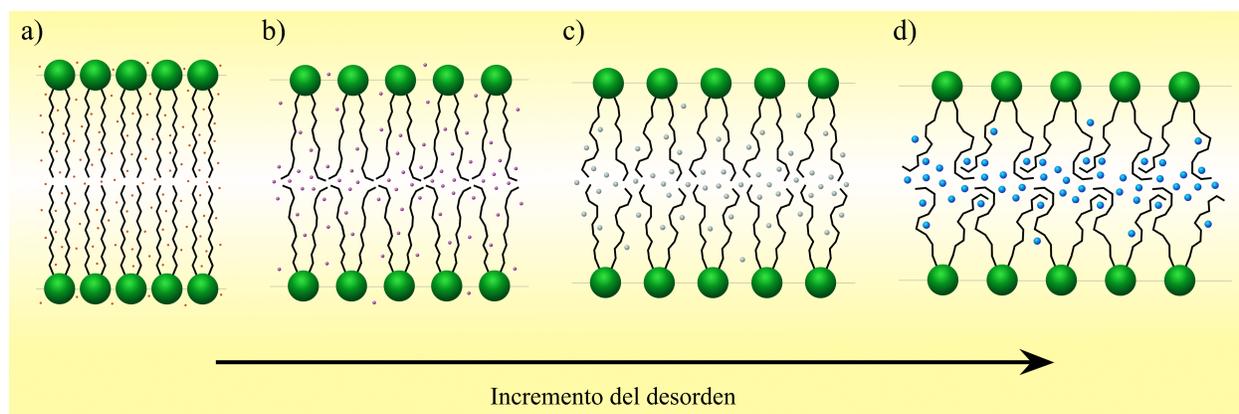


Figura 3.3: Representación esquemática de los cambios estructurales de membrana producidos por los gases nobles. a) He, b) Ar, c) Kr y d) Xe.

como gases.

Recientemente, Yasuoka *et al.* [89] llevaron a cabo Simulaciones de Dinámica Molecular (SDM) para elucidar la naturaleza difusiva del Xenón dentro de una bicapa de lípidos. Ellos reportaron un decremento en el orden de orientación de las colas de lípidos, un incremento en área y volumen por molécula, y un incremento en su difusividad. Además, en este mismo trabajo se destacan, por primera vez tanto en SMD como con un gas noble, evidencias del efecto antagónico entre anestesia y presión.

El estudio que se presenta a continuación fue inspirado en los resultados de SDM de Yasuoka *et al.* [89], en donde demostramos experimentalmente el efecto reversible de la presión hidrostática sobre el fenómeno de DPF inducido por Xenón. La evidencia de dicho efecto se presenta en la figura 3.4, la cual muestra perfiles calorimétricos de liposomas dopados con Xe (4 atm, 2 hrs, 30°C) medidos a distintas presiones hidrostáticas (1, 3 y 6 atm) aplicadas por el calorímetro. Los liposomas dopados con He (mismas condiciones de presurización) ilustran que la presión *per se* no afecta los resultados. El recuadro interno muestra claramente que a mayor presión hidrostática sobre el sistema, menor es el $|\Delta T_m|$. Es importante mencionar que la presión hidrostática máxima alcanzada por nuestro calorímetro es 6 atm, de tal manera que solo fue posible alcanzar un efecto parcial pero decisivo en la reversibilidad de la presión. Sin embargo, es claro que una presión hidrostática mayor sería capaz de revertir completamente la T_m a condiciones control.

Fisiológicamente, el efecto más notable de la presión es la hiperexcitabilidad que ocurre a través de temblores en las extremidades seguido de convulsiones, mientras que un aumento adicional conduce a parálisis y la muerte. Este efecto antagónico de la presión hiperbólica (excitabilidad) y el de los gases nobles (depresión) han sido elucidados a través de un modelo no-específico, donde la estructura de lípidos en la membrana de nervios es modulada. Este modelo es conocido como la ‘hipótesis del volumen crítico’ [93, 95]: la bicapa lipídica se expande debido a los anestésicos disueltos en ella, mientras que la presión hidrostática (ejercida ejercida en todas direcciones del exterior hacia el interior) causa una recuperación en el volumen

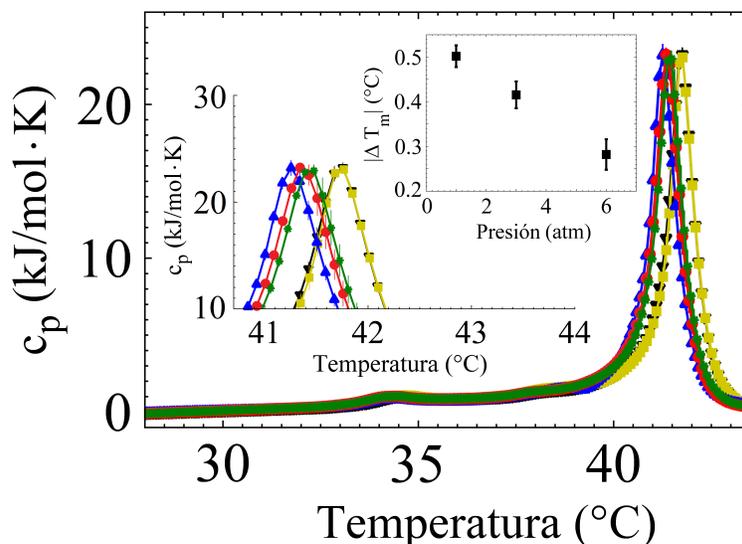


Figura 3.4: Reversibilidad del efecto del Xe en función de la presión hidrostática. Liposomas control a 1 atm (∇), liposomas dopados con He a 1 atm (\square), liposomas dopados con Xe a 1 (\triangle), 3 (\circ), and 6 atm ($*$) de presión hidrostática ejercida por el DSC. Los liposomas fueron previamente dopados con su respectivo gas bajo las mismas condiciones de presurización (4 atm, 2 hours, 30°C). El recuadro interno muestra el $|\Delta T_m|$ como función de la presión hidrostática (\square). Es importante tomar en cuenta que $|\Delta T_m| = 0$ representaría una reversión completa del efecto del Xe debido a dicha presión, el cual se sugiere es lineal [24].

de la misma. De hecho, la hiperexcitabilidad, modelada como una compresión excesiva de la membrana, no ha sido bien comprendida por los modelos actuales de las neurociencias, aunque podría ser explicada fácilmente por el ‘modelo del solitón’ para la propagación de impulsos nerviosos [25]. De hecho, muestras adecuadas de gases “expansores” y “compresores” pueden permitir que altas presiones sean más tolerables en mamíferos. Esta teoría ha sido empleada empíricamente para resolver algunas adversidades mostradas en los buceadores, quienes comúnmente están expuestos a altas presiones en la profundidad del océano [96, 97].

Nuestra evidencia experimental confirma que la presión hidrostática recupera los cambios estructurales inducidos por gases inertes, lo cual está en acuerdo con otros hallazgos que apoyan la idea de que la anestesia general solo depende de la capacidad de ciertos átomos o moléculas para aumentar el desorden general de la membrana plasmática.

En las neuronas, se ha demostrado que algunas proteínas de membrana, involucradas con la propagación del impulso nervioso, son fuertemente dependientes de la fluidez de los lípidos de los alrededores. El trabajo en esta dirección ha demostrado que el anestésico general ‘halotano’, a concentraciones fisiológicas, produce una redistribución pronunciada de lípidos entre dominios de diferente especie de lípidos [98]. Por lo tanto, no es del todo rechazable que los anestésicos, al menos gases nobles, alteren de forma ‘semiespecífica’ la estructura de los lípidos que circundan estas proteínas, hasta un punto en que sus funciones normales sean perturbadas. Es necesario un estudio riguroso de esta hipótesis con el fin de eliminar la necesidad de un nú-

mero muy grande de receptores proteicos (sitios de acción específica) para cientos de especies distintas de anestésicos. Los siguientes capítulos son dedicados a tal hipótesis.

3.5. Metodología experimental

Preparación de liposomas. El DPPC fue adquirido en Avanti Polar Lipids, manipulado sin previa purificación. Todos los experimentos fueron realizados a una concentración de lípidos de 4 mM. Se utilizó una solución amortiguadora para hidratar los lípidos por encima de su temperatura de fusión (Agua Milli-Q, 10 mM HEPES, pH 7, 50°C). La suspensión de lípidos es agitada suavemente por 30-60 minutos a 50°C. Este procedimiento produce vesículas multilaminares (MLVs). Para obtener finalmente vesículas unilaminares pequeñas (SUVs), la suspensión MLV es sonicada por 30 min a 50°C en un baño sonicador (60 W). La suspensión de SUVs resultante es sometida a 2.5 ciclos de enfriamiento-calentamiento de 50°C a 25°C con el fin de alcanzar un tamaño estable de liposomas (10-15 nm) para las necesidades del experimento. La distribución de tamaños de los liposomas fue caracterizada con un Zetasizer (Nano Zs, Malvern).

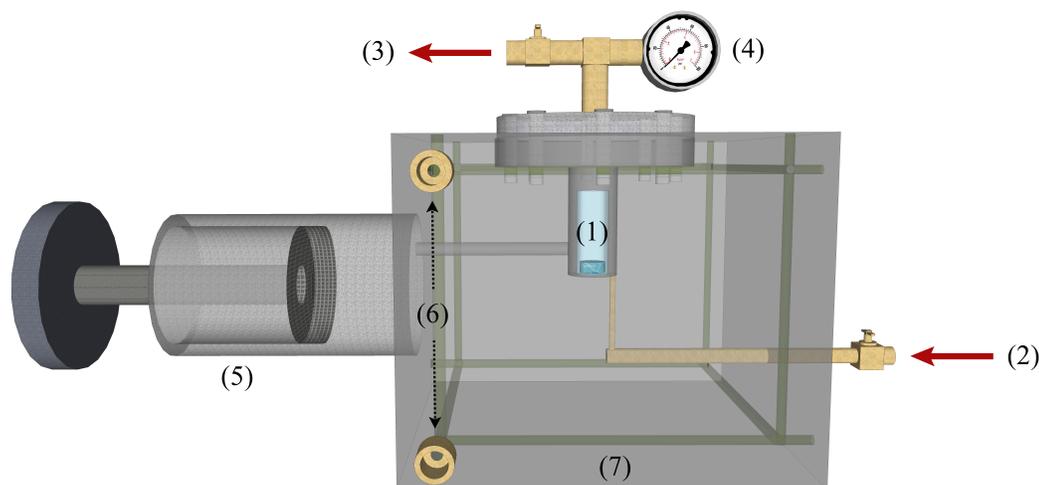


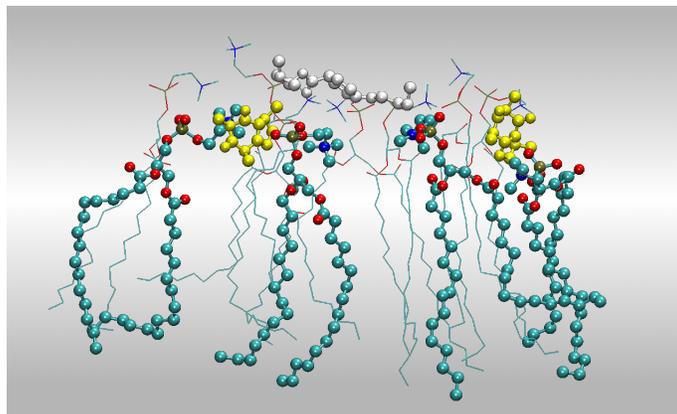
Figura 3.5: Representación esquemática del SAP: proceso de presurización de liposomas. (1) Suspensión de liposomas; (2) válvula de introducción del gas; (3) válvula de purga; (4) Manómetro; (5) Émbolo; (6) Sistema de recirculación de agua (entrada/salida); (7) Cámara sólida de aluminio.

Proceso de presurización. Se diseñó y construyó un ‘sistema de alta presión’ (SAP) para exponer la suspensión de liposomas a los gases nobles (He, Ar, Kr, and Xe) [42]. De la figura 3.5; la muestra de liposomas (1) es depositada en una cámara de aluminio (7), la cual está sellada por una tapa gruesa del mismo material. El contenedor del gas noble deseado es conectado a la válvula de introducción (2). Previo al proceso de presurización, el aire del interior es desplazado por el gas noble usando la válvula de purga (3). Después de unos pocos segundos de esta ventilación, la válvula es completamente cerrada. La cámara se deja termalizar al menos 10 minutos con el fin de lograr la estabilidad termodinámica de la muestra. La temperatura de las muestras es controlada por un sistema de recirculación de agua (PolyScience) conectada a la cámara de aluminio la cual contiene canales interiores para la circulación del agua (6). Es importante asegurar que el émbolo (5) este completamente insertado. Una vez que el gas deseado se encuentra en el compartimento de la muestra y se logra la termalización, el émbolo (5) es retirado a su posición máxima para cargar dicho gas. Esto permite reducir el consumo de gas, así como la adquisición de presiones más altas que las previstas en el tanque de gas. El sistema de presurización fue diseñado para alcanzar altas presiones, permitiéndonos aumentar alrededor de diez veces la presión inicial de la cámara. Posteriormente, la válvula de introducción de gas (2) es cerrada y el émbolo se introduce para aumentar la presión hasta el valor requerido, siendo monitoreada por un manómetro (4). Cuando se alcanza a la presión deseada, comienza el tiempo de exposición. Es importante tener en cuenta que los experimentos realizados en este capítulo no fueron llevados a cabo bajo los mismos parámetros en el proceso de presurización (tiempo de exposición, temperatura y presión de gas). Todos los ensayos se llevaron a cabo a un volumen constante de suspensión de liposomas (1,2 ml). Una vez completado el tiempo de exposición, la válvula de purga (3) libera lentamente el gas, evitando cualquier expulsión no deseada de la muestra. Por último, una vez que el gas sale de la cámara, la suspensión de liposomas puede ser retirada y utilizada en los experimentos de calorimetría. Como hemos mencionado anteriormente, la ley de Henry nos ayuda a comprender cómo los gases se incorporan a la suspensión acuosa [82, 99]. Esta ley establece que, a temperatura constante, la solubilidad de cierto gas en un líquido es directamente proporcional a la presión del gas por encima del líquido.

Calorimetría. Los termogramas fueron registrados a una velocidad de barrido de 1°C/min. Previo a su introducción en el calorímetro, las muestra de liposomas fueron degasificadas a baja presión (635 mmHg) durante 10 min a 25°C. Todos los experimentos se midieron a presión constante (3 atm), con excepción del estudio de reversión con presión. El calorímetro (Microcalorimeter, NanoDSC, TA Instruments) fue manipulado por medio de una interfaz hacia una PC, y los datos fueron analizados a través de un software proporcionado por el instrumento. Antes de comenzar la calorimetría, las muestras fueron equilibradas térmicamente durante 8 min a 25°C. Se realizaron 3 barridos consecutivos de 25°C a 50°C para cada muestra. Cada experimento se llevó a cabo únicamente 2 veces usando distintas preparaciones de liposomas, debido a la buena reproducibilidad de los protocolos.

4

Anestesia-excitabilidad: ¿desorden-orden?



F. J. Sierra-Valdez *et al.* *PLoS ONE* 8(4): e59364 (2013).

4.1. Resumen

La necesidad por validar un modelo general de la anestesia que proporcione una explicación inmediata e intuitiva de los fenómenos de reversibilidad, genera una amplia variedad de preguntas dignas de ser investigadas. En este capítulo se presenta un estudio experimental de la motilidad de espermatozoides de ratón el cual muestra aspectos interesantes característicos de las neuronas: el efecto anestésico (producido por la TCC), excitatorio (producido por cafeína o Ca^{+2}) y su acción antagonica. Mientras que la TCC inhibe la motilidad del esperma y la cafeína muestra una acción excitatoria, la combinación de ambas sustancias contrarresta el efecto inducido por la TCC, produciendo una motilidad bastante similar a la de las células control. Se realizó posteriormente una comparación de este efecto antagonico con membranas de lípidos modelo constituidas por 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (DPPC) y ácido dipalmitoil fosfatídico (DPPA), mediante el estudio de los cambios en la transición de fase de los mismos. La TCC induce un desorden muy significativo de la membrana, disminuyendo en gran medida la temperatura de transición de fase de las mismas. Por otra parte, el efecto de la cafeína es nulo, no obstante, su adición a liposomas dopados con TCC contrarresta parcialmente el desorden inducido en éstos. Una concentración alta de calcio muestra un endurecimiento de las membranas y por ende, reduce el efecto de la TCC en forma similar. De forma adicional, se llevaron a cabo 'simulaciones de dinámica molecular' (SDM) para mejorar la comprensión molecular de los resultados experimentales obtenidos. Se encontró una fuerte correlación entre los estudios de motilidad celular; termodinámica de membranas y dinámica molecular de estos efectos antagonicos, lo cual podría explicar cómo las propiedades físicas de membrana adecuadas para el funcionamiento normal de las células, pueden ser 'afectadas' y 'recuperadas'.

4.2. El espermatozoide como modelo de estudio

Además de las células nerviosas, existen células motiles con una fuerte dependencia de las propiedades elásticas de la membrana plasmática; una de ellas es el espermatozoide [100]. Las teorías actuales sugieren que ciertas condiciones elásticas son un requisito previo para el funcionamiento normal, y que la fluidez y flexibilidad de la membrana plasmática son dependientes principalmente de su composición lipídica y de sus condiciones termodinámicas, tales como la temperatura [100]. Por lo tanto, puesto que en estas células la estabilidad termodinámica de la membrana plasmática juega un papel crucial en su motilidad, y siguiendo la idea de que todas las células deben ser afectadas por los anestésicos a cierta concentración, la motilidad de los espermatozoides es un buen modelo para estudiar el efecto producido por dichos fármacos.

En la literatura, algunos trabajos explican la motilidad de los espermatozoides basada en el funcionamiento coordinado de proteínas de membrana y citoesqueleto. Por ejemplo, se ha propuesto que dos canales de Ca^{+2} están relacionados con la motilidad de estas células, en

donde este ión juega un papel decisivo [101]. Además, se han realizado muchos estudios en espermatozoides bajo el efecto de diversos fármacos anestésicos, por ejemplo, tetracaína, lidocaína, diltiazem, e incluso algunos gases como el isoflurano y sevoflurano, que debido a su acción inhibitoria sobre la motilidad celular, se han especulado como responsables del bloqueo de canales de Ca^{+2} [102, 103, 104]. Por otro lado, las drogas excitatorias en neuronas, tales como la cafeína, han mostrado efectos estimuladores en la motilidad del esperma humano [105]. Se han propuesto diferentes mecanismos en base a una función específica del cAMP [106]. Sin embargo, algunos estudios contradicen tales mecanismos [107, 108], por lo que los argumentos siguen siendo insuficientes. Hasta donde se sabe, existe un único reporte del antagonismo de la cafeína sobre los efectos supresores de la procaína y propranolol en la motilidad de espermatozoides, en donde no se brindan argumentos detrás de tal efecto [109]. A la fecha, no se han realizado estudios de la interacción de cafeína con membranas lipídicas, mientras que, como se discutió anteriormente, es bien sabido que la TCC perturba significativamente las propiedades termomecánicas de las membranas de lípidos [110].

En este capítulo, abordamos otro de los fenómenos de reversibilidad de la anestesia a través del Ca^{+2} , y además exploramos el efecto antagónico de un agente excitatorio del sistema nervioso central como la cafeína. En esta ocasión, presentamos una comparativa de tales efectos entre la motilidad de espermatozoides y membranas de lípidos modelo.

4.3. Correlación entre el modelo celular y membrana de lípidos

4.3.1. Motilidad del Espermatozoide

El estudio fenomenológico de la motilidad de espermatozoides se llevó a cabo a través de un ‘sensor de motilidad celular’ (SMC) desarrollado recientemente por nosotros [111], el cual se muestra esquemáticamente en la figura 4.1. Este dispositivo se basa en una técnica óptica conocida como ‘correlación resuelta en el tiempo’ en un sistema adaptado para manejar varias muestras simultáneamente bajo condiciones controladas (temperatura y presión) y que a su vez permite la estadística de millones de células. La información de la motilidad de los espermatozoides es obtenida mediante el desarrollo temporal un ‘parámetro de motilidad’ τ , que aumenta a medida que disminuye la motilidad [111]. En nuestro sistema, la pérdida de motilidad del esperma con el tiempo puede estar relacionada con varios factores: a) el metabolismo inherente de la célula, b) condiciones físico-químicas (presión, temperatura, pH y otros iones) y c) la interacción con fármacos. Sin embargo, dicha pérdida de motilidad no siempre es debida a la muerte intrínseca de la célula. Por ejemplo, podemos recurrir al efecto de la ‘reversibilidad térmica’ de la motilidad [111], en donde mientras las muestras de espermatozoides incubadas a 37°C presentan una caída pronunciada en su motilidad, un descenso posterior de temperatura a 10°C la recupera significativamente.

La figura 4.2 muestra el comportamiento temporal de τ durante 6 horas. En el experimen-

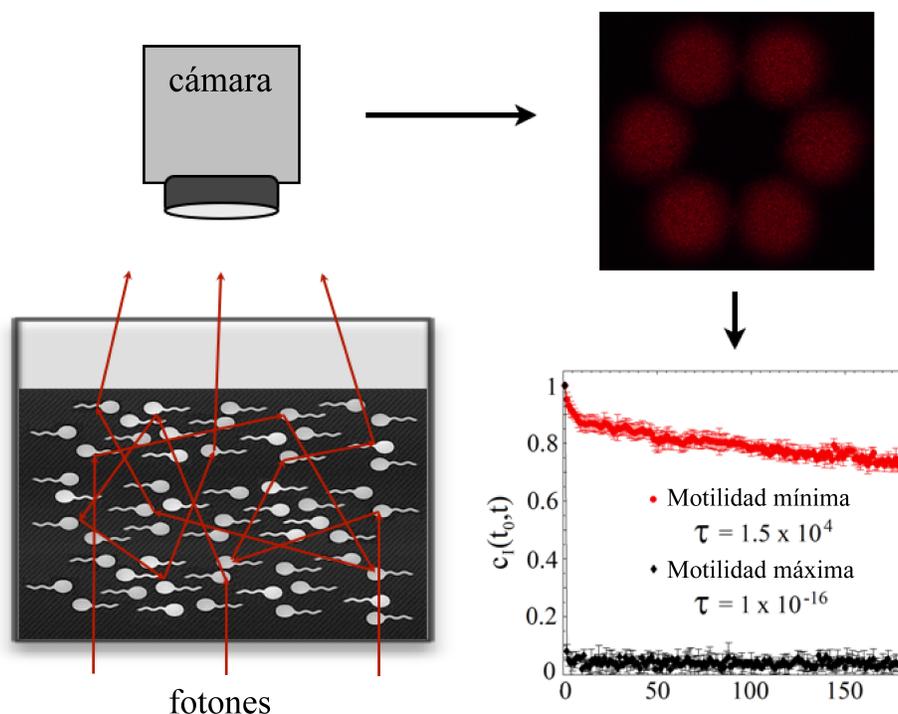


Figura 4.1: Representación esquemática del SMC: estudio de la motilidad celular. Un haz de láser (He-Ne) es dirigido ópticamente a una cámara que contiene las muestras a temperatura constante. Esta cámara tiene en su interior un soporte que consta de seis reservorios en donde las muestras son depositadas de forma aislada. Por lo tanto, la luz pasa a través de cada uno de estos reservorios generando seis respectivos patrones de dispersión, los cuales son registrados por una cámara digital para el análisis de correlación de imágenes. Se ilustra dos curvas de autocorrelación temporal que muestra los extremos de mínima (\circ) y máxima (\diamond) motilidad. El parámetro de motilidad ' τ ' es obtenido a partir las curvas de autocorrelación mediante el ajuste a un modelo de tipo exponencial estrecho. Este parámetro es monitoreado en función del tiempo (hrs) para el estudio fenomenológico de la motilidad celular. Los detalles completos del arreglo experimental se describen en [111].

to de TCC-caféina (25°C) se observa un contraste muy notable entre la rápida inhibición de la motilidad debido a la TCC y la acción excitatoria de la caféina vista como una mayor prevalencia de la motilidad (ver Fig. 4.2a). Sin embargo, la combinación de estas dos sustancias contrarresta tal efecto, produciendo una motilidad similar a las células de control. Por otro lado, el escenario TCC- Ca^{+2} (10°C) muestra un comportamiento temporal de τ muy similar: una alta concentración de Ca^{+2} induce una fuerte inhibición de la motilidad celular (incluso mayor que la TCC), pero la combinación de ambos contrarresta parcialmente el efecto ya que la prevalencia de la motilidad celular es mejorada (ver Fig. 4.2b). Puesto que la motilidad de los espermatozoides es fuertemente dependiente de la temperatura [111], es importante señalar que los controles de la figura 2 son diferentes; la motilidad prevalece por más tiempo a 10°C,

en el medio WH. Así mismo, es pertinente aclarar que cuando nos referimos a una ‘mayor prevalencia de la motilidad’ no hablamos de ‘hipermotilidad’, sino más bien que la motilidad de los espermatozoides se mantiene por más tiempo respecto a un valor inicial.

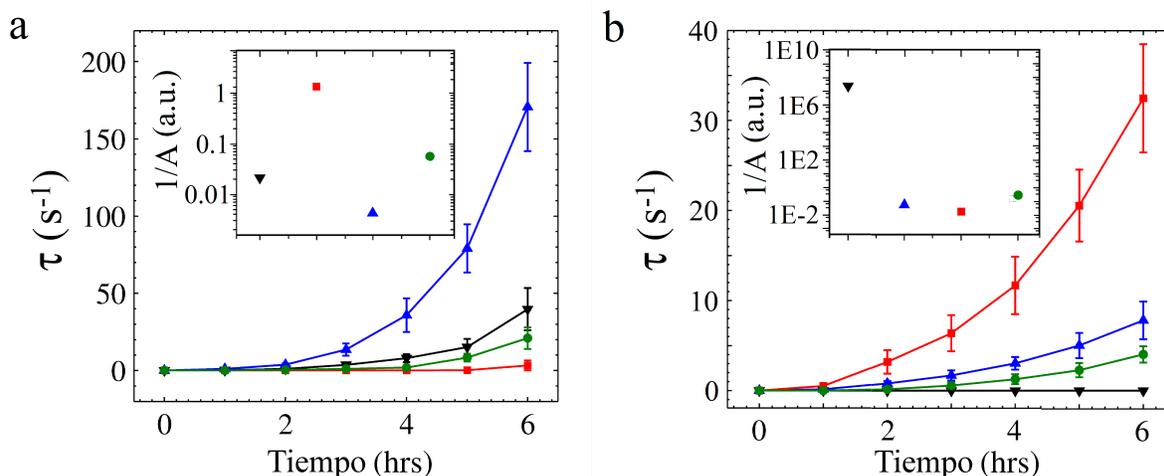


Figura 4.2: Motilidad del espermatozoide: antagonismo TCC-cafeína/ Ca^{+2} . (a) Experimento de TCC-cafeína (25°C): muestra de control (∇), 8 mM de TCC (Δ), 111 mM de cafeína (\square) y la combinación 8 mM de TCC - 111 mM de cafeína (\circ). (b) Experimento de TCC- Ca^{+2} (10°C): muestra de control (∇), 8 mM de TCC (Δ), 200 mM de Ca^{+2} (\square) y la combinación 8 mM de TCC - 200 mM de Ca^{+2} (\circ). El recuadro interno muestra el inverso del área bajo la curva (A) de cada uno de los desarrollos temporales, destacando las diferencias en la motilidad general.

4.3.2. Calorimetría de membranas modelo

En esta sección, recurrimos a vesículas unilaminares pequeñas (SUVs) compuestas de DPPC/DPPA como ‘membrana modelo’ (véase ‘Metodología experimental’ al final del capítulo). A pesar de que la cafeína es una molécula polar, sus regiones hidrófobas fueron capaces de producir un ligero desorden en el sistema DPPC/DPPA, como se observa en el pequeño desplazamiento hacia bajas temperaturas en la figura 4.3a. Además, como era de esperar, la TCC induce una depresión aún mayor en la temperatura de transición del sistema. Es notable que la adición de cafeína, que de forma independiente tiene la capacidad de debilitar ligeramente las membranas, rigidice en gran medida el sistema DPPC/DPPA dopado con TCC. En otras palabras, la cafeína produce un ligero desorden cuando la membrana está relativamente compacta, pero induce orden cuando la membrana no lo está. El efecto de la cafeína es aún más pronunciado para concentraciones de TCC mayores (ver Fig. 4.4). Esto por otra parte sugiere un escenario alternativo en donde la cafeína apantalla la acción de la TCC en la superficie de la membrana, reduciendo el efecto total de este anestésico, i.e., un ΔT_m de saturación menor. Estas suposiciones serán discutidas a detalle en los apartados siguientes.

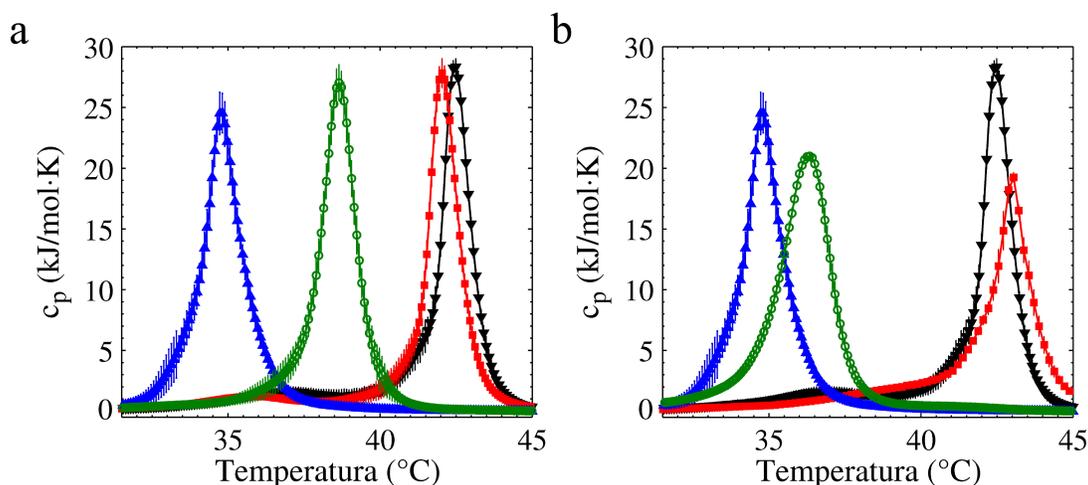


Figura 4.3: Calorimetría de liposomas DPPC/DPPA: antagonismo TCC-cafeína/ Ca^{+2} . (a) Experimento de TCC-cafeína: muestra de control (∇), 8 mM de TCC (Δ), 111 mM de cafeína (\square) y la combinación 8 mM de TCC - 111 mM de cafeína (\circ). (b) Experimento de TCC- Ca^{+2} : muestra de control (∇), 8 mM de TCC (Δ), 200 mM de Ca^{+2} (\square) y la combinación 8 mM de TCC - 200 mM de Ca^{+2} (\circ). Los liposomas de DPPC/DPPA (95:5 mol/mol) muestran una relativamente alta temperatura de transición en $42.5^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$, por tanto, la energía invertida para llevar la membrana a la fase fluida es mayor que para otras membranas de lípidos.

Sorprendentemente, un agente polar puro (i.e. Ca^{+2}) no muestra la dicotomía producida por la cafeína. En la figura 4.3b se muestran los perfiles calorimétricos del experimento TCC- Ca^{+2} , donde una alta concentración de calcio siempre incrementa, un poco o mucho, la estabilidad de liposomas, puros o dopados con TCC, respectivamente.

4.4. Especulación molecular del antagonismo

Cuando una membrana está a una temperatura T_0 inferior a su temperatura de transición T_m , cualquier agente que desplace esta T_m hacia temperaturas más bajas aumenta entonces la compresibilidad elástica $\kappa(T_0)$ de la misma (el efecto es máximo cuando T_m alcanza a T_0). Por otro lado, un cambio de T_m hacia temperaturas más altas representa por tanto una disminución en $\kappa(T_0)$ [44]. Esto nos ayuda a comprender las implicaciones mecánico-elásticas de los efectos producidos por los anestésicos en la termodinámica de las membranas.

En las membranas lipídicas reside una repulsión electrostática permanente entre las cabezas de dipolos eléctricos (región polar) de los lípidos, que a su vez conviven en una interacción favorable con las moléculas de agua. A pesar de esta repulsión (un poco apantallada por la presencia de iones), las fuerzas van der Waals existentes entre las colas de los lípidos (región hidrófoba) son lo suficientemente grandes para producir la estructura de una membrana excluyendo eficazmente el agua de su región de lípidos. Por otro lado, la alta polarizabilidad eléctrica de la TCC ($31.379 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$ obtenido de Chemspider) responsable de su alta hidrofobicidad

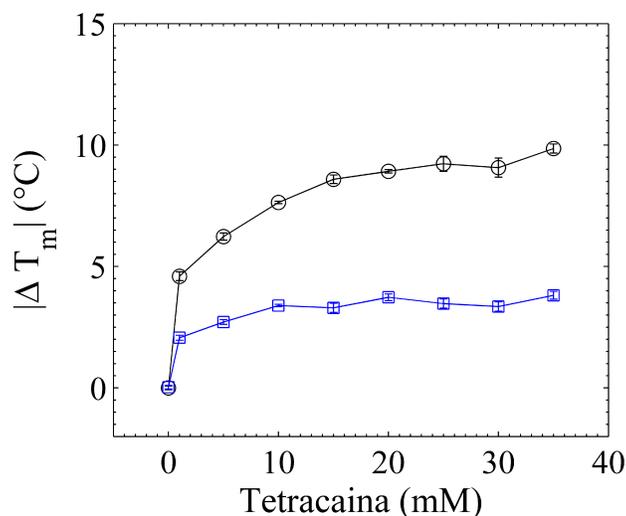


Figura 4.4: Antagonismo de la cafeína dependiente de [TCC]. Experimento [TCC]-cafeína: cambio de la temperatura de fusión con respecto al control (ΔT_m) en los liposomas dopados con distintas concentraciones de TCC; con (□) y sin (○) 111 mM de cafeína. Puesto que ΔT_m es siempre negativo (la temperatura final es siempre menor que el inicial), representamos gráficamente su valor absoluto para ilustrar la saturación del cambio a altas concentraciones de TCC. Así, en ambos caso podemos observar un comportamiento tipo Michaelis-Menten, al menos para las concentraciones reportadas en este trabajo.

y coeficiente de partición, además de su estructura molecular (ver Fig. 4.5c), son tales que, una vez que se inserta en la membrana, debilita las interacciones de Van der Waals, perturbando de esta manera la organización de la membrana. Cabe señalar que este fenómeno se debe a un balance entre la entalpía y entropía del sistema. Cuando el fármaco se inserta entre dos colas de lípidos reduce su interacción cohesiva entre pares, que como se discutió en el capítulo anterior, posiblemente sea a través del término Axilrod-Teller de la interacción de ‘tres cuerpos’, el cual en la mayoría de los casos es positivo [88]. Como resultado, la transición gel-fluido (T_m) es desplazada a temperaturas más bajas (véase Fig 4.3). Este hecho nos permite considerar la posibilidad de que el desorden producido en la membrana plasmática del espermatozoide podría ser responsable de la disminución en su motilidad (véase Fig. 4.2). Es evidente que mientras la TCC induce desorden (liposomas) o disminución de la motilidad (espermatozoides), en ambos escenarios la inclusión de cafeína revierte parcialmente el efecto.

Incluso si la termodinámica de membranas ofrece una interpretación correcta del sistema macroscópico (celular), es necesaria una visión a nivel molecular. Por tanto, se llevaron a cabo ‘simulaciones de dinámica molecular’ (SDM) con el fin de validar y complementar el razonamiento antes mencionado. Las SDM han sido ampliamente utilizadas en el estudio de interacciones moleculares específicas en membranas de lípidos. Los resultados de SDM que se presentan a continuación forman parte del proyecto de maestría del M.C. Patricio Zapata Morín, en donde se colaboró en el análisis e interpretación de los resultados. Los detalles de las

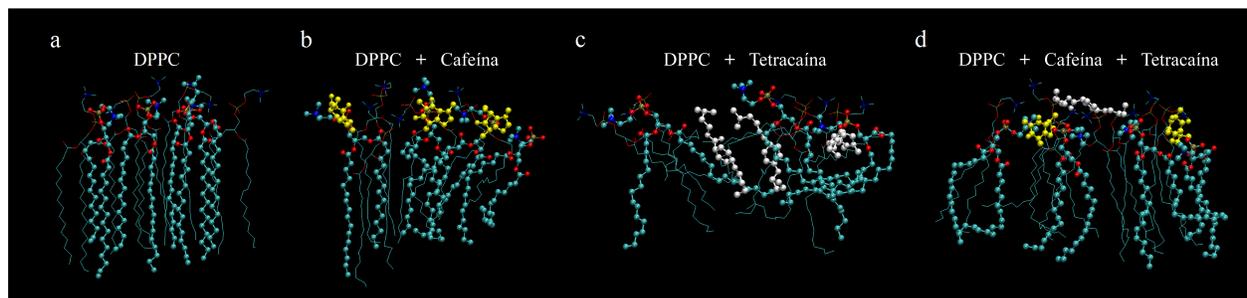


Figura 4.5: Imágenes instantáneas de SDM del sistema DPPC-cafeína/TCC. (a) Membrana control que muestra un sistema altamente ordenado. Los puntos en azul y rojo destacan la región polar de los lípidos (oxígeno y nitrógeno, respectivamente), las cadenas de puntos en azul claro corresponden a las colas hidrofóbicas. (b) La cafeína (amarillo) interactúa principalmente con las cabezas hidrófilas. (c) La TCC (blanco) se inserta dentro de la membrana desordenando considerablemente la organización de lípidos en la región hidrofoba. (d) La combinación de cafeína y TCC resulta en una membrana menos desordenada. Estas imágenes corresponden a simulaciones independientes cuyas posiciones fueron obtenidas a los 15 ns después del inicio de cada simulación.

simulaciones se mencionan al final del capítulo (véase ‘Metodología experimental’).

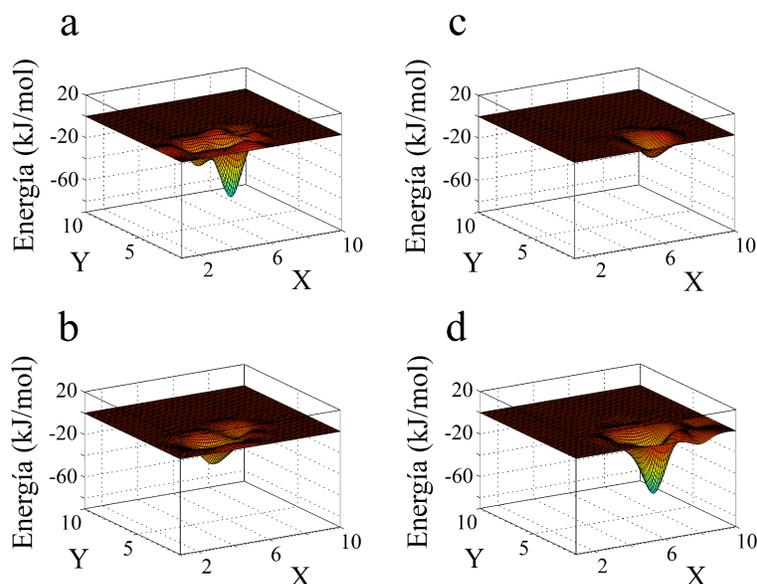


Figura 4.6: Mapas representativos de energía: Coulomb y Lennard-Jones. Estos fueron construidos tomando la interacción de una sola molécula de cafeína o TCC con cada uno de los lípidos de la cara superior de la membrana (una matriz de 10x10 lípidos). Los mapas muestran la morfología de los potenciales de interacción, permitiendo identificar el potencial más profundo, i.e., de mayor interacción, en cada sistema. (a) Potencial de Coulomb para la cafeína. (b) Potencial de Lennard-Jones para la cafeína. (c) Potencial de Coulomb para la TCC. (d) Potencial de Lennard-Jones para la TCC. Las escala en el plano X-Y está en unidades de lípidos (~ 0.8 nm).

La figura 4.5 muestra imágenes instantáneas de SDM de una pequeña zona de la parte superior de la membrana de DPPC, y los sitios respectivos de interacción con cafeína y TCC. Esta imagen ilustra que la cafeína, con su alta naturaleza polar responsable de la interacción con las cabezas de los lípidos, produce un desorden de membrana mucho menor comparado con el inducido por la TCC, la cual penetra dentro de la región anfifílica. La figura 4.6 muestra los mapas de energías de interacción de Coulomb y van der Waals obtenidos de SDM, los cuales confirman de forma cuantitativa las contribuciones respectivas en las interacciones membrana-fármaco (cafeína o TCC). En efecto, la interacción de coulomb (polar) predomina para la cafeína (véase Fig. 4.6a), mientras que van der Waals o 'Lenard-Jones' (hidrofóbica) para la TCC (véase Fig. 4.6d). Esto confirma porqué la cafeína interactúa principalmente con las cabezas polares de los lípidos (véase Fig. 4.5b), mientras que la TCC con la región anfifílica de la membrana (véase Fig. 4.5c). Por otra parte, cuando la cafeína y TCC se encuentra compitiendo en un mismo escenario, debido a su interacción de coulomb de largo alcance, la cafeína llega a la membrana más rápido que la TCC. Tal comportamiento se observa claramente en las trayectorias completas de ambas moléculas en la figura 4.7b. En consecuencia, especulamos que las moléculas de cafeína aumentan el empaquetamiento de las cabezas polares de los lípidos, impidiendo que las moléculas de TCC se inserten más allá de la región polar de la membrana y reduzcan el orden estructural (véase Fig. 4.5d).

Los protones y cualquier otro ión positivo como el Ca^{+2} también son capaces de producir un efecto de apantallamiento a las cabezas negativas de los lípidos, dando lugar a una disminución significativa en la repulsión electrostática. Además, algunos estudios mencionan que el Ca^{+2} , por ser divalente, se une a los fosfolípidos a través de la unión de dos fosfatos de cabezas de lípidos adyacentes [112], resultando en una membrana más rígida lo cual se traduce en un incremento en la T_m de la misma. Estos argumentos explican cómo el Ca^{+2} puede revertir la acción de la TCC a través de un balance orden-desorden (véase Fig. 4.3b).

Al igual que en otras células, el movimiento de los flagelos del espermatozoide es atribuido a motores moleculares. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el funcionamiento normal de las células de esperma es fuertemente dependiente de las propiedades elásticas de la membrana plasmática [100], de modo que cualquier perturbación en tales propiedades óptimas se reflejaría como un cambio en la motilidad celular. Esta idea, sumada a nuestros resultados de la parte celular, calorimétrica y molecular, nos permite inferir que la temperatura de transición (T_m) de la membrana plasmática del espermatozoide podría verse afectada de la misma manera que las membranas modelo por estas drogas antagónicas. Por lo tanto, debido a la correlación entre los tres distintos escenarios, nuestros resultados destacan nuevamente la participación de los lípidos sugiriendo así un modelo alternativo que no necesita recurrir a proteínas de membrana para explicar el efecto antagónico de la cafeína y Ca^{+2} en contra de la anestesia.

Se ha demostrado que algunas proteínas de membrana del espermatozoide, importantes para su funcionamiento normal, se encuentran situadas en dominios de lípidos que les confieren una alta estabilidad [113]. Así como en el capítulo anterior, pero en esta ocasión por medio de un fenómeno más complejo como es el "antagonismo" entre dos agentes, se sospecha que tales dominios de lípidos juegan un papel principal mediante interacciones semiespecíficas que

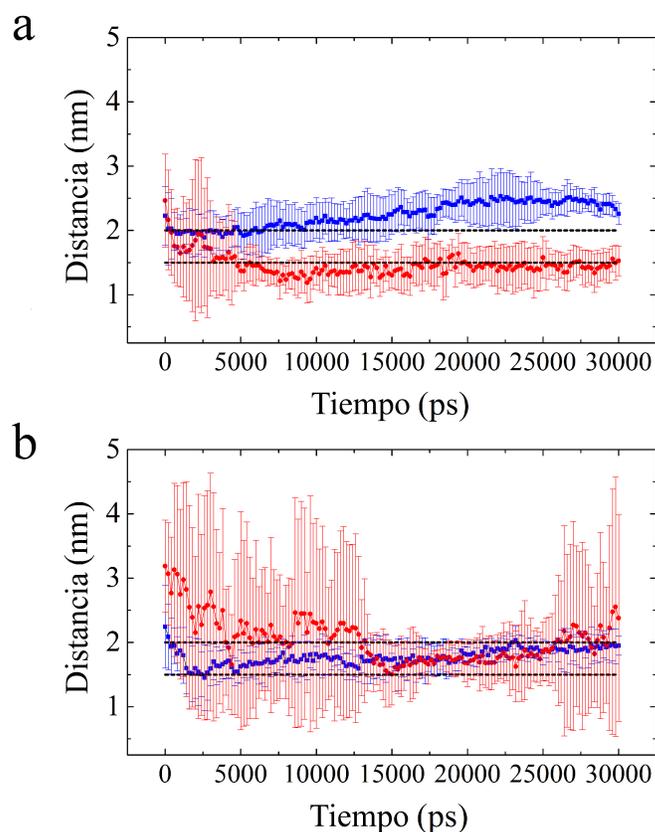


Figura 4.7: Trayectorias promedio de cafeína y TCC obtenidas mediante SDM. (a) Trayectorias promedio de cafeína (\square) y TCC (\circ) en simulaciones independientes (diez moléculas para cada caso). **(b)** Trayectorias promedio de ambas moléculas en la misma simulación (cinco y cinco). Las líneas discontinuas delimitan la región de la cabeza polar de los lípidos de la cara superior de la membrana. Las barras de error se calcularon a partir de las trayectorias de todas las moléculas (centros de masa) implicadas en las simulaciones.

regulan la función de ciertas proteínas.

El siguiente capítulo, a través de un estudio centrado en dichos dominios lipídicos, aborda a su vez uno de los problemas que han cuestionado por mucho tiempo la participación de los lípidos en el mecanismo de la anestesia; el fenómeno de *cut-off* de los *n*-alcoholes.

4.5. Metodología experimental

Preparación de las muestras de espermatozoides. Los espermatozoides fueron extraídos de ratones macho (CD1) de 3-5 meses de edad. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y ambos epidídimos fueron diseccionados y lavados en 2 ml de medio Whitten-Hepes (WH), el cual comprende (en mM): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgSO₄, 10 HEPES, 10 glucosa y 1 piruvato de sodio a pH 7.3 (NaOH). El medio WH mantiene las condiciones fisiológicas del espermatozoide de incubación [114]. Se realizaron varias incisiones en el epidídimo en solución, y se utilizó el método de 'swim-up' para separar el espermatozoide con una motilidad superior al 90 % [115]. Por último, la parte superior de la solución que contiene los espermatozoides más móviles fue aislada en otro recipiente con el fin de evitar la contaminación de los tejidos del epidídimo, consiguiendo, por tanto, una 'suspensión final' de espermatozoides. Además, para evitar el crecimiento bacteriano, se utilizó penicilina y estreptomina como antibióticos a una concentración de 1 % en cada muestra. Se realizó un estudio cuidadoso para asegurar que los antibióticos no afectan la motilidad del espermatozoide a esta concentración. Más detalles sobre el aislamiento, preparación y análisis de motilidad celular son descritos en [111]. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en el Cinvestav (CICUAL, Número Permiso: 457-10). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales. La 'suspensión final' de espermatozoides fue preparada como se describe a continuación. Para el experimento de TCC-cafeína, realizado a 25°C, consistió de los grupos independientes: control sin tratamiento, con TCC (8 mM), con cafeína (111 mM) y la combinación TCC (8 mM) - cafeína (111 mM). Para el experimento de TCC-Ca²⁺, realizado a 10°C, consistió de los grupos independientes: control sin tratamiento, con TCC (8 mM), con CaCl₂ (200 mM) y la combinación TCC (8 mM) - CaCl₂ (200 mM). Los fármacos y el CaCl₂ fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Cada experimento fue llevado a cabo tres veces para el análisis estadístico respectivo. La TCC fue disuelta previamente en sulfóxido de dimetilo (DMSO) a 14 mM y se verificó que la motilidad del espermatozoide no fuera afectada por este compuesto.

Preparación de liposomas. Los liposomas de 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol-3-fosfatidilcolina y ácido dipalmitoil fosfatídico (DPPC/DPPA) (Avanti Polar Lipids) se prepararon en una relación molar 95:5 y a una concentración total de lípidos de 3mg/ml (~4 mM). Los lípidos fueron manipulados sin purificación adicional. Es importante mencionar que el lípido poliinsaturado más abundante en la membrana plasmática del espermatozoide el ratón [100] presenta una transición de fusión (T_m) por debajo de la temperatura mínima de trabajo de nuestro calorímetro (-10°C). Por lo cual, optamos por trabajar con algunos de los lípidos más comunes en las membranas plasmáticas con una T_m por encima de 0°C; es decir, DPPC. El bajo porcentaje de DPPA se utilizó para conferir carga negativa a los liposomas (a pH 7) y evitar la floculación, promoviendo así la estabilidad de los liposomas por más tiempo. En primer lugar, se mezcló en cloroformo la cantidad apropiada de lípidos para obtener las proporciones deseadas. La mezcla resultante se mantuvo bajo una corriente de nitrógeno para la evaporación del solvente, manteniendo la mezcla por encima de su T_m (50°C), la cual forma durante el proceso una

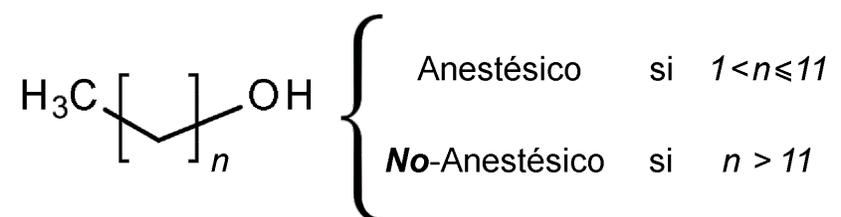
película completamente extendida en la parte inferior del matraz de fondo redondo. En segundo lugar, la película lipídica seca es hidratada con una solución amortiguadora por encima de la T_m que consta de las mismas condiciones fisiológicas utilizadas anteriormente (medio WH), y posteriormente es agitada por un vórtex. A continuación, la suspensión de lipidos es sometida a varios ciclos de enfriamiento-calentamiento en un baño de ultrasonido (60 W) por encima de la T_m hasta alcanzar una solución cristalina, resultando así en liposomas unilaminares pequeños (SUVs). Cabe señalar que este proceso de preparación de SUVs tiene algunas diferencias respecto al protocolo mencionado en el capítulo anterior. Esto se debe a distintas necesidades técnicas y al hecho de que cada especie de lípido o mezcla de los mismos requiere pequeñas adecuaciones en dichos protocolos. Tal como en los experimentos de motilidad de espermatozoides descritos anteriormente, se utilizaron los mismos agentes (a través de la solución amortiguadora de hidratación) y concentraciones para el respectivo grupo experimental del análisis calorimétrico.

Calorimetría. Los termogramas fueron registrados una velocidad de barrido de $1^\circ\text{C}/\text{min}$. Previo a su introducción en el calorímetro, las muestra de liposomas fueron degasificadas a baja presión (635 mmHg) durante 10 min a 25°C . El calorímetro (microcalorímetro, NanoDSC, TA Instruments) fue conectado por medio de una interfaz a una PC, y los datos fueron analizados utilizando el software proporcionado con el instrumento. Las muestras fueron equilibradas térmicamente durante 8 min a 25°C . Se realizaron tres barridos en modo calentamiento ($25\text{-}50^\circ\text{C}$) para cada muestra. Cada experimento se realizó únicamente dos veces debido a la buena reproducibilidad de los resultados (barrido tras barrido y muestra tras muestra). Es importante mencionar que independientemente del orden en que los agentes TCC, cafeína o Ca^{+2} hallan sido agregados en sus respectivas combinaciones, los resultados no son afectados. También se verificó que el DMSO, a la concentración empleada (14 mM), no alterara el comportamiento de fase de los liposomas.

Simulaciones de Dinámica Molecular (SDM). Las simulaciones corrieron 30 ns utilizando el programa GROMACS con pasos de tiempo de 2 fs. Estas se llevaron a cabo utilizando 200 moléculas de DPPC, 15,000 de agua, 10 de cafeína y TCC (cinco y cinco en el caso de la combinación) en un medio fisiológico a 37°C . Debido a la baja concentración de DPPA en los experimentos, este lípido no fue considerado en las simulaciones. Las estructuras 3D, campos de fuerza y cargas parciales de las moléculas, fueron obtenidas de diferentes fuentes. La estructura del DPPC se obtuvo a partir de [116], la cafeína de [117] y la TCC fue construida usando el servidor en línea PRODRG (disponible en <http://davapc1.bioch.dundee.acuk/prodrgr/>) y SwissParam (<http://swissparam.ch/>). En la figura 4.6 se utilizó una interpolación cúbica de orden 10 para suavizar los mapas de energía. Mientras que el 'paso de tiempo' para guardar los parámetros de la simulación fue 2 ps, cada punto en las trayectorias representadas en la figura 4.7 fue tomado cada 200 ps.

5

Fenómeno de *cut-off* de los *n*-alcoholes



F. J. Sierra-Valdez, P. A. Zapata-Morín & J. C. Ruiz-Suárez, *en preparación* (2015).

5.1. Resumen

Los *n*-alcoholes alifáticos actúan como anestésicos solo hasta una cierta longitud de cadena (C_{2-12}), más allá de la cual su actividad biológica desaparece ($\geq C_{13}$); conocido también como fenómeno de “cut-off”. Aunque los principales sitios de acción difieren entre las teorías propuestas para la anestesia, éstas a su vez postulan que el efecto de los alcoholes resulta finalmente en una alteración de la función de proteínas involucradas en la neurotransmisión. La dependencia funcional de dichas proteínas de membrana con los ‘dominios’ o ‘balsas’ de lípidos, propone un nuevo escenario para la comprensión del cut-off y por tanto de la anestesia general. En este capítulo, estudiamos de forma sistemática, mediante DSC, la interacción de los *n*-alcoholes en sistemas de lípidos homogéneos y heterogéneos (balsas de lípidos). Nuestros resultados en membranas homogéneas demuestran un efecto diferencial del *n*-alcohol en función de la especie lipídica de interacción. Así mismo, se llevó a cabo una caracterización termotrópica del sistema de balsas, cuya composición y proporción de lípidos es basada en la membrana de sinapsis. A través de un cut-off en el desplazamiento ΔT_m (orden-desorden), hemos encontrado que el punto exacto de cut-off es estrictamente dependiente de la especie de lípidos en interacción. En contraste con el cut-off reportado en la anestesia de renacuajos (C_{12}), que a su vez difiere con algunos reportes en fosfatidilcolina (C_{10}), nuestro estudio en balsas, así como en distintas especies individuales de lípidos, expande nuestra comprensión en la interacción específica existente entre lípidos y fármacos.

5.2. Anestesia de los *n*-alcoholes

Durante casi un siglo se ha sabido que los alcoholes pueden actuar como anestésicos generales [8, 9]. La potencia anestésica de varios miembros de la serie homóloga de alcoholes alifáticos saturados e insaturados suele ser determinada en renacuajos, a través de su pérdida de arcos reflejos como criterio para la anestesia. A medida que la longitud de cadena de un alcohol aumenta, también lo hace su potencia como un anestésico ($= -1/ED_{50}$, donde ED_{50} es la dosis para alcanzar el 50% del efecto). Eventualmente, sin embargo, la potencia anestésica comienza a estabilizarse, y se alcanza un punto más allá del cual desaparece; este fenómeno se le conoce como “cut-off”. Para los alcoholes primarios, la potencia anestésica se estabiliza justo después del 1-undecanol (C_{11}) y completamente desaparece después del tridecanol (C_{13}) [118].

Puesto que las propiedades físico-químicas de los *n*-alcoholes, tales como la solubilidad en lípidos, correlacionan con su potencia anestésica, uno podría esperar por tanto que tal correlación fuese lineal a lo largo de toda la serie. Sin embargo, el hecho de que los alcoholes continúan solubilizándose en bicapas de lípidos después de que su actividad biológica ha cesado, viola la regla de Meyer-Overton y aparentemente suma en favor de una acción específica en proteínas

[16].

A lo largo de las últimas décadas, el fenómeno del *cut-off* se ha atribuido a una acción tanto en 'lípidos' como 'proteínas'. En lípidos, se ha demostrado un *cut-off* en el 'desorden de membrana' [12]; el parámetro de orden en lípidos fue reducido por alcoholes anestésico ($C_{8,10,12}$), mientras que los alcoholes no-anestésicos no lo alteraron significativamente (C_{14}), o bien, lo incrementaron ($C_{16,18}$). El *cut-off* de la 'temperatura de transición de fase' [15, 119]; a través del desplazamiento hacia bajas o altas temperaturas de la T_m de membranas de lípidos se observó un *cut-off* similar. El *cut-off* de 'rompimiento de puentes de hidrógeno' [120]; mediante una competencia por puentes de hidrógeno con los lípidos de la membrana, se reportó un *cut-off* en C_{10} , mientras que en C_{14} el efecto se reduce casi por completo. Por otro lado, en proteínas, se han propuesto el *cut-off* a través de sitios de acción específicos en cavidades de aminoácidos hidrofóbicos expuestos hacia la fase acuosa, de tal manera que cuando el alcohol excede el tamaño de dicha cavidad, la adición de grupos metilo no incrementa más su potencia anestésica [121]. Este fenómeno ha sido explorado en una amplia variedad de canales iónicos involucrados en la neurotransmisión. La acción inhibitoria de alcoholes en los receptores nicotínicos de acetilcolina de neuronas corticales (nAChRs) alcanzó un máximo en C_{10} y se redujo para cadenas más grandes de carbonos [122], mientras que, en contraste, los alcoholes de cadena corta de C_{1-4} mejoran su actividad y de C_{5-10} la inhiben en nAChRs de Torpedo [123]. Se ha encontrado que la potencia de inhibición de los receptores *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) incrementa exponencialmente para los alcoholes de C_{1-5} , alcanzando un máximo en C_{6-8} , y después desaparece abruptamente [124]. Para el receptor del ácido γ -aminobutírico tipo A ($GABA_A$), los estudios indicaron que la potenciación de éste receptor por los alcoholes exhibe un *cut-off* entre C_{12-13} , el cual fue consistente con el efecto reportado en lípidos [121]. De la misma manera los receptores de kainato, AMP y 5-HT₃ exhiben puntos de distintos de *cut-off* y significativamente más bajos que aquellos reportados en lípidos [121].

En general, las discrepancias entre los puntos de *cut-off* encontrados en los diferentes sistemas se alejan del *cut-off* fisiológico encontrado en renacuajos entre C_{12} y C_{14} . Aunque cabe la posibilidad de que este fenómeno, *in vivo*, haya sido subestimado por las condiciones experimentales e incluso sea un resultado particular del modelo biológico empleado [12]. Además, es evidente que tales observaciones en lípidos y proteínas no pueden consolidar, de forma independiente, un mecanismo general para comprender el fenómeno del *cut-off*. En consecuencia, algunos autores han sugerido que los alcoholes actúan sobre el anillo de lípidos que rodean las proteínas de membrana [125, 126]. Estos modelos postulan que los alcoholes o bien interrumpen la interacción lípido-proteína, por ejemplo, mediante la alteración de los puentes de hidrógeno entre las proteínas y los grupos de las cabezas de lípidos [127], o alteración del orden de los lípidos en un subdominio alrededor de la proteína [125]. Actualmente, a estos dominios los conocemos como 'balsas de lípidos', sin embargo, no existen estudios que aborden de forma puntual el fenómeno de *cut-off* de los *n*-alcoholes bajo la 'hipótesis balsas de lípidos'.

5.3. Efecto de los *n*-alcoholes en balsas de lípidos ‘modelo’

5.3.1. Caracterización de los sistemas lipídicos

En este trabajo se estudian las especies de lípidos más importantes de la membrana sináptica de cerebro de rata [128, 129]. Dentro de los elementos más predominantes en balsas de lípidos podemos encontrar a los siguientes: 1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicerol-3-fosfatidilcolina (DPPC), *N*-stearoil-*D*-eritro-esfingosilfosforilcolina (SM), colesterol (Chl) y el gangliósido GM₁. El 1,2-dioleoil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina (DOPC) es el representante principal de los lípidos fuera de balsa. Con el fin de hacer una comparación adicional con la estructura molecular de los lípidos antes mencionados, se realizaron algunos experimentos con 1,2-Dimiristoil-*sn*-glicerol-3-fosfatidilcolina (DMPC).

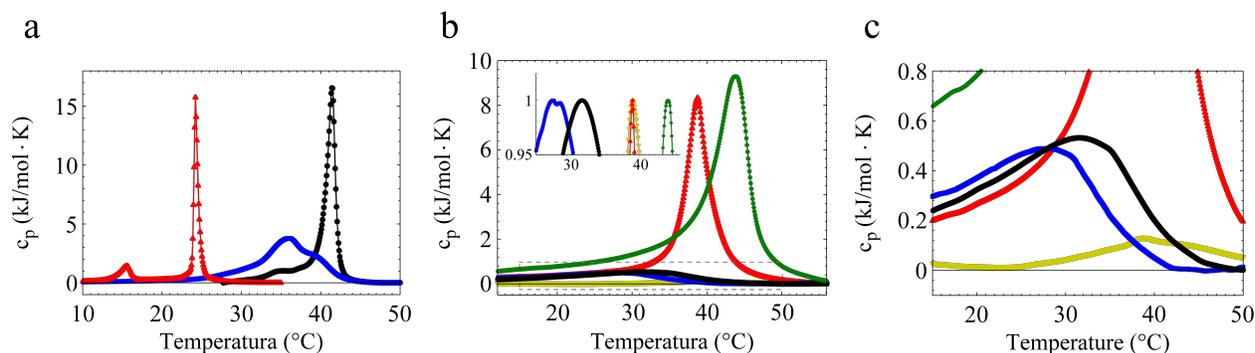


Figura 5.1: Caracterización termotrópica de membranas homogéneas y heterogéneas. (a) Termogramas de membranas homogéneas (T_m): DMPC (24.2°C, Δ), SM (35.9°C, \square) y DPPC (41.4°C, \square). (b) Termogramas de membranas heterogéneas (T_m s): SM/Chl (38.77°C, ∇), SM/Chl/DPPC (37.70°C, Δ), SM/Chl/DPPC/GM₁ (42.52°C, $*$), SM/Chl/DPPC/DOPC (27.44°C, \square), SM/Chl/DPPC/DOPC/GM₁ (31.61°C, \circ). (c) Acercamiento en la región señalada en b. Los liposomas MLV fueron preparados en 10 mM de solución amortiguadora HEPES, pH 7. En todos los casos la concentración total de lípido se mantuvo en 4 mM. Las respectivas mezclas de lípidos fueron realizadas en las proporciones correspondientes a balsas de membrana sináptica [128, 129].

En la figura 5.1a se muestran los termogramas característicos de liposomas MLV homogéneos de DMPC, SM y DPPC, cuyas transiciones individuales son $T_m = 24.2, 35.9$ y $41.4^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$, respectivamente. En la figura 5.1b se ilustran los termogramas característicos de mezclas de lípidos cada vez más complejas hasta alcanzar el ‘modelo de balsas’ sinápticas. Cabe mencionar que a lo largo de las distintas mezclas de lípidos, siempre se respetaron las proporciones adecuadas de sinapsis.

Partiendo de los resultados de membranas homogéneas de SM (35.9°C), observamos que al integrar colesterol en una relación molar 2:1 SM/Chl, la T_m es desplazada $\sim 2.8^\circ\text{C}$ hacia altas temperaturas, además de presentar un incrementando en el ancho de la transición y una reducción en su altura (c_p), es decir, el sistema redujo su cooperatividad. Es interesante que, a pesar de presentar una baja cooperatividad apenas detectable por el DSC, el sistema SM/Chl sea la

causa de la gran estabilidad de las balsas de lípidos [130]. Posteriormente, se observó que la inclusión de DPPC, en una relación molar 2.1:1:6.8 SM/Chl/DPPC, sorprendentemente no induce cambios significativos en la T_m . Sin embargo, puesto que el DPPC participa en una mayor proporción, únicamente se produce un incremento en la cooperatividad del sistema, ejerciendo un efecto opuesto al colesterol. Es bien sabido que el DPPC, SM y Chl forman parte fundamental en la constitución lipídica de las balsas biológicas [131], en donde dichos lípidos se encuentran presentes exclusivamente en la lámina extracelular de las mismas (principalmente conformada por lípidos neutros), en la mayoría de los eucariontes [130]. Las balsas de lípidos neuronales contienen en particular un gangliósido (GM_1) que últimamente se ha encontrado involucrado en muchos procesos celulares [130]. La inclusión de dicho gangliósido al sistema anterior, en una relación molar 1.6:0.8:5.1:2.1 SM/Chl/DPPC/ GM_1 , produce un incremento de $\sim 5^\circ\text{C}$ en la T_m , así como un incremento aun mayor en su cooperatividad. Hasta este punto, hemos observado gradualmente el comportamiento termotrópico de un sistema que va adquiriendo la composición de balsas sinápticas. Sin embargo, aún no existe la formación de dominios de lípidos.

Por otro lado, para consolidar la formación y características propias de un sistema de balsas (dominios de lípidos), es necesario introducir al menos un lípido que no sea soluble en ellas, es decir, que induzca la una separación de fases entre él (estructura líquido-desordenada) y el resto de los lípidos que conforman la balsa (estructura líquido ordenada). El DOPC es el lípido más abundante de la lámina extracelular de las membranas de eucariontes, y que además, por ser insaturado, se encuentra fuera de balsas [130]. La figura 5.1b muestra además un sistema de balsas consolidado con y sin la participación del gangliósido GM_1 , en las relaciones molares 0.6:0.3:1.8:2.4 SM/Chl/DPPC/DOPC y 0.5:0.2:1.6:2:0.6 SM/Chl/DPPC/DOPC/ GM_1 . A partir del sistema SM/Chl/DPPC (37.7°C), podemos notar que la presencia del DOPC induce una reducción de $\sim 10^\circ\text{C}$ en la T_m , acompañada de una disminución dramática en su cooperatividad. Sin embargo, de este último sistema SM/Chl/DPPC/DOPC (27.44°C), la presencia del GM_1 eleva $\sim 4^\circ\text{C}$ su T_m . Por lo tanto, el sistema final de balsas modelo es SM/Chl/DPPC/DOPC/ GM_1 (31.61°C), en donde cada especie lipídica juega un papel determinante para sus características termotrópicas. A la fecha no existen reportes de un sistema más completo de 'balsas de lípidos modelo', tanto en composición como proporciones adecuadas a lo biológico.

5.3.2. El *cut-off* en membranas 'homogéneas' y 'heterogéneas'

Como vimos en capítulos anteriores, el DPPC es una de las especies de lípidos más abundantes en las membranas plasmáticas [39]. Sin embargo, resulta interesante investigar su contribución al punto de *cut-off* de los *n*-alcoholes. En la figura 5.2 se muestra la serie de los *n*-alcoholes de cadena larga (C_{8-16}) en membranas de DPPC. El *cut-off* en este sistema homogéneo se encontró entre C_{10} y C_{11} , mostrando un efecto de desordenamiento y sobreordenamiento respecto al control, respectivamente. Así mismo, se observa una disminución gradual en la cooperatividad respecto al control, independientemente del alcohol y de su efecto. Es importante mencionar que las concentraciones anestésicas (ED_{50}) de los *n*-alcoholes son del orden de micromolar

[118], comparado con la concentración usada en este experimento (1 mM). Sin embargo, así como en lo demostrado en capítulos anteriores (Fig. 3.1 y 4.4) y en muchos otros trabajos, el efecto de los anestésicos, al menos en términos de orden/desorden, siempre presenta el mismo comportamiento dependiente de la concentración, de tal manera que usar 1 mM únicamente escala el mismo efecto inducido a bajas concentraciones (ED_{50}). También es bien sabido que los alcoholes de cadena corta inducen un efecto lineal [10], por tal motivo estos resultados se presentan solo a partir del 1-octanol (C_8).

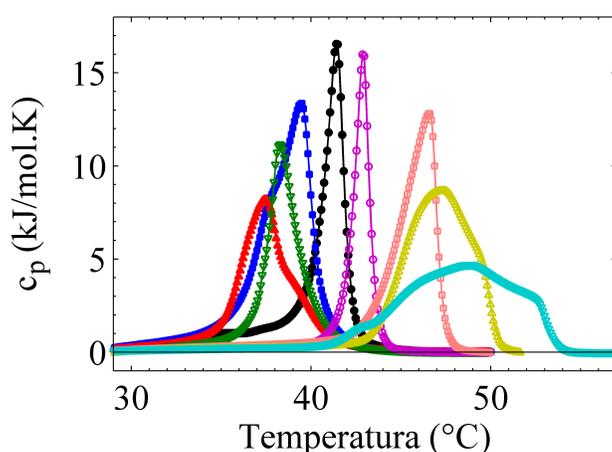


Figura 5.2: Estudio del cut-off en membranas de DPPC. Control (41.4°C, \circ) y la serie de *n*-alcoholes de cadena larga: 1-octanol (C_8 , 39.5°C, \square), 1-nonanol (C_9 , 37.5°C, \triangle), 1-decanol (C_{10} , 38.3°C, ∇), 1-undecanol (C_{11} , 42.9°C, \circ), 1-dodecanol (C_{12} , 46.5°C, \square), 1-tetraecanol (C_{14} , 47.3°C, \triangle), 1-hexadecanol (C_{16} , 48.8°C, ∇). Los liposomas MLV fueron preparados en 10 mM de solución de amortiguamiento HEPES, pH 7. En todos los experimentos se mantuvo la misma relación molar 4:1 lípidos/alcohol.

Puesto que el *cut-off* en el DPPC está desplazado dos carbonos hacia abajo respecto al reportado fisiológicamente (C_{12}), es importante comparar el efecto de estos alcoholes en distintos sistemas homogéneos, con el fin de obtener información puntual de su interacción con distintas especies de lípidos. Realizando dicho estudio en membranas de DMPC, SM y DPPC, la figura 5.3a demuestra un *cut-off* dependiente de las características moleculares de cada uno de los lípidos en cuestión, y a su vez ilustra que los desplazamientos ΔT_m son distintos para un mismo alcohol. Por ejemplo, mientras que C_{10} desordena las membranas de DPPC ($\Delta T_m < 0$), ordena las de DMPC, generando un efecto incluso mayor en SM. Estos hallazgos demuestran que la interacción de los *n*-alcoholes es ‘lípidodependiente’.

Continuando con la exploración ‘lípidodependiente’ del *cut-off*, la figura 5.3b muestra una comparación de los efectos de C_{10} y C_{12} en las membranas heterogéneas presentadas en la figura 5.1. Cabe señalar que el caso SM/Chl no es presentado en este apartado ya que su transición de fase posee tan baja cooperatividad que la adición de cualquier alcohol desaparece la señal por completo. Tomando como referencia el caso de ‘balsas modelo’ (SM/Chl/DPPC/DOPC/GM₁) podemos observar que la ausencia de GM₁ pronuncia los efectos de ambos alcoholes (SM/Chl/DPPC/DOPC).

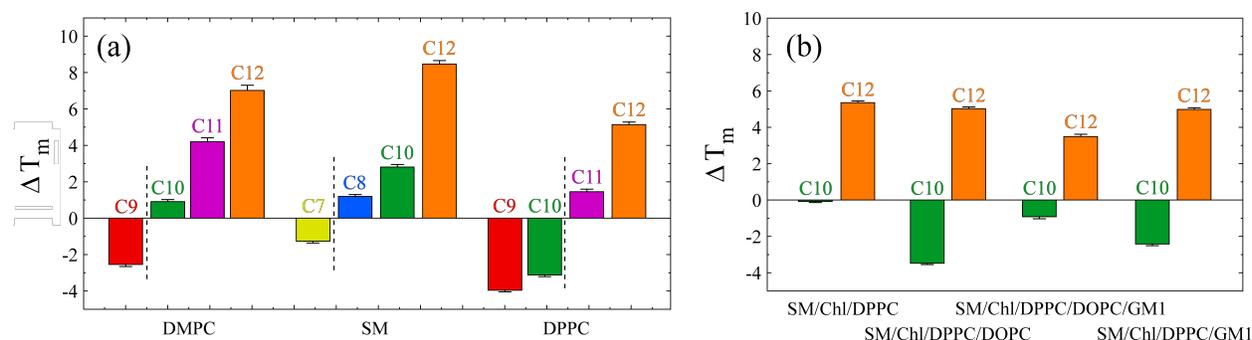


Figura 5.3: Estudio del *cut-off* en membranas homogéneas y heterogéneas. (a) Comparativa del efecto de varios *n*-alcoholes en el ΔT_m de membranas de DMPC, SM y DPPC. La línea punteada señala el punto de *cut-off* para cada caso. (b) Comparativa del efecto de C₁₀ y C₁₂ en el ΔT_m de las mezclas de lípidos SM/Chl/DPPC, SM/Chl/DPPC/DOPC, SM/Chl/DPPC/DOPC/GM₁ y SM/Chl/DPPC/GM₁. Los liposomas MLV fueron preparados en 10 mM de solución de amortiguamiento HEPES, pH 7. En todos los experimentos se mantuvo la misma relación molar 4:1 lípidos/alcohol.

De forma similar, la remoción de DOPC al sistema de balsas, amplifica los efectos de ambos alcoholes, sin embargo, el efecto causado por C₁₀ es significativamente menor que el observado en el caso sin GM₁. Finalmente, la remoción tanto de GM₁ como DOPC mantienen el ΔT_m de C₁₂, mientras que el efecto causado por C₁₀ es casi nulo. Como era de esperarse, la participación de cada lípido inducen cambios en la interacción con cada *n*-alcohol. Es importante aclarar que los resultados anteriores en membranas heterogéneas se muestran exclusivamente para dos alcoholes debido a los altos costos del gangliósido GM₁.

5.4. Especulación molecular del *cut-off* fisiológico

Todo parece indicar que cada especie lipídica contribuye de forma distinta en el punto exacto de *cut-off*. Puesto que el DMPC y el DPPC comparten el mismo grupo funcional en la cabeza polar y difieren exclusivamente en dos carbonos de la cadena acílica (DMPC, 14:0 y DPPC, 16:0), sus valores de T_m cambian de 24.2 (DMPC) a 41.4°C (DPPC), lo cual sugiere por tanto que el DPPC posee un mayor orden estructural que el DMPC. De la figura 5.3a podemos observar que las membranas de DPPC son desordenadas por C₁₀ ($\Delta T_m < 0$), mientras que este mismo alcohol genera el efecto opuesto en las de DMPC ($\Delta T_m > 0$). Este resultado podría sugerir que cierto alcohol es capaz de ordenar membranas de bajo orden y a su vez desordenar membranas de mayor orden, o bien, aumentar la estructura de un lípido y disminuirla la de otro. Sin embargo, si la temperatura de transición de fase fuera suficiente para entender este fenómeno, uno debería encontrar que C₁₀ induce un efecto intermedio en las membranas de SM, cuya T_m es intermedia al DMPC y DPPC (35.9°C). A pesar de que los tres lípidos poseen el mismo grupo funcional ‘colina’, difieren en la unidad estructural que une las cadenas hidrocarbonadas con el grupo fosfato; en donde DMPC y DPPC contienen un grupo ‘glicerol’ y la SM al grupo

‘ceramida’. Este último parece ser el único responsable de que los distintos alcoholes aumenten el orden estructural de las membranas de SM respecto al DMPC y DPPC (ver Fig. 5.3a), dicho de otra manera, los grupos hidroxilo (-OH) de los alcoholes parecen tener una mayor afinidad electrostática con los grupos cerámica de tal forma que la cohesión del sistema alcohol-SM incrementa. Esos argumentos a su vez explican los distintos puntos de *cut-off* dependientes de la estructura molecular del lípido.

Por otro lado, conforme los sistemas se vuelven más complejos (heterogéneos), el *cut-off* adquiere un comportamiento interesante. Como describimos en el apartado anterior, el sistema SM/Chl presenta una cooperatividad tan baja que cualquiera alcohol desaparece su perfil calorimétrico. Si partimos del sistema SM con un *cut-off* en C_7 y C_8 , se puede observar que la participación del Chl y DPPC genera una reducción considerable del efecto del C_{12} , siendo apenas significativo y opuesto para C_{10} (ver Fig 5.3b). Además, es interesante que el efecto pronunciado de ambos alcoholes en el sistema SM/Chl/DPPC/GM₁ (42.5°C), sea reducido considerablemente por la participación del DOPC. Como se demuestra en la figura 5.1b, la adición de DOPC al sistema SM/Chl/DPPC/GM₁ genera una reducción en la T_m de casi 11°C, i.e., el nuevo sistema es más fluido. Esto puede explicar que el DOPC, el cual constituye la fase líquido-desordenada, sea capaz de amortiguar el efecto de C_{10} y C_{12} (ver Fig 5.3b).

En las células eucariotas existe una gran variedad de lípidos [132]. Dentro de un mismo organelo, podemos encontrar membranas con distintas propiedades físicas [133, 134], incluso al comparar la membrana del mismo organelo entre dos especies distintas de mamíferos [133, 135]. Estas diferencias nos permiten especular que incluso en neuronas de distinto organismo podrían existir variaciones pequeñas pero significativas en la proporción lipídica de membrana. Por tanto, podemos suponer que el *cut-off* ‘fisiológico’ reportado exclusivamente en renacuajos [91], es solo un caso particular, puesto que otra especie animal adaptada a condiciones ambiente distintas, presentaría un *cut-off* particular.

Como se mencionó al inicio de este capítulo, la gran variabilidad en los *cut-off*s encontrados en estudios de proteínas, a su vez pone en duda la rigurosidad con la que se ha criticado al modelo de Meyer-Overton para predecir la potencia anestésica. Se ha reportado que algunas proteínas transmembranales están asociadas a distintos tipos de dominios de membrana [136]. Además, otros trabajos muestran la existencia balsas de lípidos con especies particulares de gangliósidos [137]. Así mismo, resulta altamente probable que cada receptor involucrado en la neurotransmisión, esté asociado a dominios con diferencias sutiles en su composición lipídica, tales que sus propiedades físico-químicas dicten el umbral con el que estos dominios puedan ser perturbados por un fármaco y modificar la función de la proteína.

En el siguiente capítulo, con el fin de profundizar en la hipótesis de balsas, realizamos un estudio biofísico-bioquímico de la anestesia en membranas cerebrales.

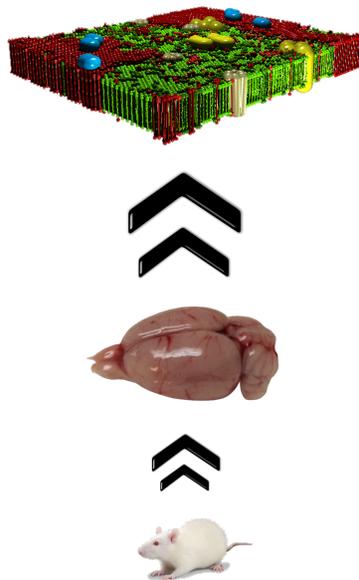
5.5. Metodología experimental

Preparación de liposomas. Todos los lípidos (DPPC, SM, Chl, DOPC y GM₁) fueron adquiridos en Avanti Polar Lipids, manipulados sin previa purificación. La SM fue adquirida de extracto de cerebro de cerdo, cuya especie más abundante son 18:0 en 50%, 24:1 en 21%, seguida de especies con porcentajes irrelevantes. Esta pequeña distribución de especies es la causa de una transición amplia (baja cooperatividad) respecto a las transiciones comúnmente estrechas (alta cooperatividad) en especies puras de lípidos (ver Fig. 5.1). La mezcla de lípidos requerida fue disuelta en exceso de *tert*-butanol y posteriormente liofilizada. La mezcla de lípidos resultante fue resuspendida en una mezcla diclorometano/metanol a una relación 1:1 v/v, en la cual se agregó la cantidad necesaria del respectivo *n*-alcohol. Los alcoholes sólidos (>C₁₂) a temperatura ambiente, fueron solubilizados por una mezcla CHCl₃/MeOH a una relación molar 2:1 v/v. En el caso de una sola especie de lípidos no fue necesario el proceso de liofilización. Posteriormente, la mezcla lípidos-alcohol se mantuvo bajo una corriente de nitrógeno para la evaporación de los solventes, en agitación permanente y temperatura constante (500 rpm, 60°C), durante ~40 min para un volumen aproximado de ~3 ml. Este proceso forma una película completamente extendida en la parte inferior del frasco, la cual es hidratada con una solución amortiguadora por encima de la T_m de los lípidos (Agua Milli-Q, 10 mM HEPES, pH 7, ~50°C). Seguido a esto, la suspensión fue agitada inmediatamente por un vórtex para asegurar el desprendimiento de la película de lípidos. Esta suspensión es agitada por 30-60 minutos (500 rpm, ~50°C) para producir finalmente vesículas multilaminares (MLVs). Todas las mezclas de lípidos fueron ajustadas a una concentración de 4 mM, y para los alcoholes una concentración de 1 mM, dando como resultado una relación molar constante 4:1 lípidos/alcohol. Cabe señalar que todas las mezclas de lípidos mencionadas a lo largo del texto fueron tomadas de las proporciones de lípidos de membrana sináptica de cerebro de rata [128, 129].

Calorimetría. Los termogramas fueron registrados a una velocidad de barrido de 1°C/min. Previo a su introducción en el calorímetro, las muestras de liposomas fueron degasificadas a baja presión (635 mmHg) durante 10 min a 3°C. Todos los experimentos se midieron a presión constante (3 atm). El calorímetro (Microcalorimeter, NanoDSC, TA Instruments) fue manipulado por medio de una interfaz hacia una PC, y los datos fueron analizados a través de un software proporcionado por el instrumento. Antes de comenzar la calorimetría, las muestras fueron equilibradas térmicamente durante 5 min a 4°C. Los barridos fueron realizados de 0°C a 60°C. Cada experimento se llevó a cabo únicamente 2 veces usando distintas preparaciones de liposomas, debido a la buena reproducibilidad de los protocolos.

6

Anestesia en membranas cerebrales: plasmática y balsas de lípidos



F. J. Sierra-Valdez, I. Delit-Ramírez & J. C. Ruiz-Suárez, *en refereo* (2015).

6.1. Resumen

Estudios recientes han demostrado que los agentes anestésicos alteran las propiedades físicas de las balsas de lípidos en membranas modelo. Sin embargo, a la fecha, se desconoce si dicha desestabilización puede afectar la interacción lípido-proteína en membranas cerebrales. En este capítulo, se analizaron los efectos producidos por el anestésico general pentobarbital (PB) en las membranas plasmáticas y balsas de lípidos cerebrales in vivo. Se caracterizó, por primera vez, el comportamiento termotrópico de las membranas plasmáticas, sinaptosomales y balsas de lípidos de cerebro de rata. Hemos encontrado que la temperatura de transición de fase (T_m) de la parte lipídica es cercana a la temperatura fisiológica. Además, hemos demostrado, por primera vez, que la PB disminuye la T_m de membranas plasmáticas y balsas de lípidos, sugiriendo una alteración de la estructura lipídica. Posteriormente, se llevó a cabo un estudio del efecto de la PB en la composición proteica de las balsas lipídicas. Nuestros resultados muestran una reducción de la proteína total asociada a balsas, con una mayor reducción del receptor NMDA en comparación con el receptor $GABA_A$. Ambos receptores son considerados los principales sitios de acción de PB. En general, nuestros resultados sugieren que las balsas de lípidos pueden ser mediadores plausibles en acción anestésica, brindando soporte a la idea de que los anestésicos modifican, de forma ‘semiespecífica’, las propiedades físicas de las dichas balsas, lo cual a su vez altera la afinidad de canales iónicos particulares a estos dominios para una función específica.

6.2. La hipótesis de ‘balsas de lípidos’

Reportes recientes destacan la participación de las balsas de lípidos en muchos procesos biológicos. Ejemplos de estos son: fusión de virus [138], modulación inmune [139], cáncer [140], Alzheimer [141], endocitosis [142], activación de células T [143] y señalización de neurotransmisores [144]. La razón para estudiar tales estructuras de lípidos es porque el modelo clásico de ‘mosaico fluido’ de Singer-Nicolson de la membrana celular (como una estructura homogénea) no puede explicar en muchos casos la interacción receptor-efector.

Las balsas de lípidos son pequeñas (10-200 nm), heterogéneas, altamente dinámicas, dominios de membrana enriquecidos con esteroides y esfingolípidos capaces de compartimentar la distribución espacial de los receptores y sus efectores próximos en la membrana [131]. Ellos forman, a temperaturas fisiológicas, una estructura altamente ordenada (fase líquido-ordenado, L_o) con características intermedias entre gel y la fase líquido-cristalina, en coexistencia con el resto de la membrana (fase líquido-desordenada, L_d). La alta afinidad de algunas proteínas a estos microdominios facilita la formación de complejos y la activación de vías de señalización específicas [145].

Como se ha discutido en capítulos previos, la anestesia es uno de los tantos problemas de la neurociencia estudiados bajo el paradigma del ‘receptor-ligando’. Sin embargo, la implicación

de recurrir a dicha tradición sin la participación de los lípidos, en la mayoría de los casos, es la fuente de confusión en la comprensión de mecanismos celulares inequívocos [146].

Recientemente, algunos estudios realizados en membranas artificiales [147] o de eritrocito [148] sugieren que las balsas de lípidos podrían mediar la respuesta anestésica a través de la alteración de las propiedades físicas de los lípidos. Esto, en neuronas, podría afectar a su vez las funciones normales de receptores implicados en la neurotransmisión. De hecho, y dando un crédito parcial a esta hipótesis, los canales iónicos activados por ligando como el NMDA [149] y GABA_A [150], relacionados con la anestesia, se han encontrado asociados a tales dominios de lípidos [144]. Actualmente, no existen estudios que demuestren el efecto físico-químico de los anestésicos en membranas cerebrales, así como su efecto en la asociación balsa-receptor.

En el presente estudio adoptamos, por primera vez, la ‘hipótesis de balsas’ para investigar los efectos de los anestésicos en las membranas cerebrales, en particular, el anestésico general PB. Para comenzar dicho estudio, realizamos una caracterización termotrópica (DSC) de las membranas plasmáticas, sinaptosomales y balsas de lípidos de cerebro de rata. Encontramos que el PB induce alteraciones estructurales en el medio de lípidos y modifica a su vez el perfil energético de desnaturalización de las proteínas inducido por calor, tanto en membranas plasmáticas como en balsas lipídicas. Además, nuestros resultados muestran que el desorden inducido en la membrana correlaciona fuertemente con una reducción de la proteína total asociada a balsas de lípidos durante el estado de anestesia, en particular los receptores de NMDA y GABA_A, los cuales han sido postulado con sitios específicos para el PB. Estos resultados experimentales pueden abrir un nicho para futuras investigaciones al considerar a las balsas de lípidos como mediadoras en la acción anestésica.

6.3. Caracterización termotrópica de membranas cerebrales

La calorimetría de membranas biológicas ha sido también ampliamente estudiada [151]; en membranas aisladas de bacterias [22], espermatozoides [152], eritrocitos [153] y algunas otras células [154, 155]. Sin embargo, para membranas cerebrales tal estudio no ha sido realizado.

Para caracterizar el comportamiento termotrópico de las membranas cerebrales se aislaron membranas plasmáticas [156], sinaptosomales [157] y balsas de lípidos [158] (véase ‘Metodología experimental’ al final del capítulo). Las T_m ’s correspondientes a la fase lipídica de todas las membranas cerebrales se encontraron en el intervalo de 26-27°C, excepto las balsas de lípidos con una T_m mayor en 32.19°C ± 0.22°C (ver Fig. 6.1). Estos termogramas corresponden a curvas representativas de cada tipo de membrana. La variabilidad en la eficiencia de aislamiento de membranas, a través de diferentes protocolos, no permite una comparación de la escala de capacidad calorífica (C_p) entre diferentes membranas. Por tanto, las unidades de capacidad calorífica para las membranas biológicas son siempre ‘arbitraria’, debido al desconocimiento tanto de la concentración total como del peso molecular promedio de todos los componentes implicados. Los perfiles de transición de lípidos son completamente reversibles, tal como se observó en un segundo barrido (datos no mostrados); donde las proteínas son desplegadas de

forma irreversible y aparece únicamente el perfil de transición de lípidos. Las transiciones de lípidos ‘amplias’ y de ‘baja amplitud’ ocurren debido a la baja cooperatividad como resultado de la gran variedad de componentes lipídicos en el sistema. Se sabe que las balsas comprenden lípidos de temperatura de fusión alta (saturados) y colesterol, por lo que es de esperarse un valor más alto de T_m que las otras membranas, las cuales contienen lípidos de temperatura de fusión baja (insaturados) en las regiones no-balsa. El perfil característico del desplegamiento de proteínas corresponde a temperaturas superiores a 40°C para cada membrana. Es importante tener en cuenta que la técnica DSC es altamente susceptible a la composición y concentración de lípidos y proteínas, por lo que el perfil lípido-proteína característico de cada membrana es altamente sensible al protocolo de aislamiento y al tipo de membrana. Nuestros datos suman evidencia al hecho de que las membranas biológicas, en particular las membranas cerebrales, se encuentran en la fase fluida a temperatura fisiológica (T_p). Esto implica que la composición lipídica de membrana es responsable de la T_m ligeramente por debajo de T_p .

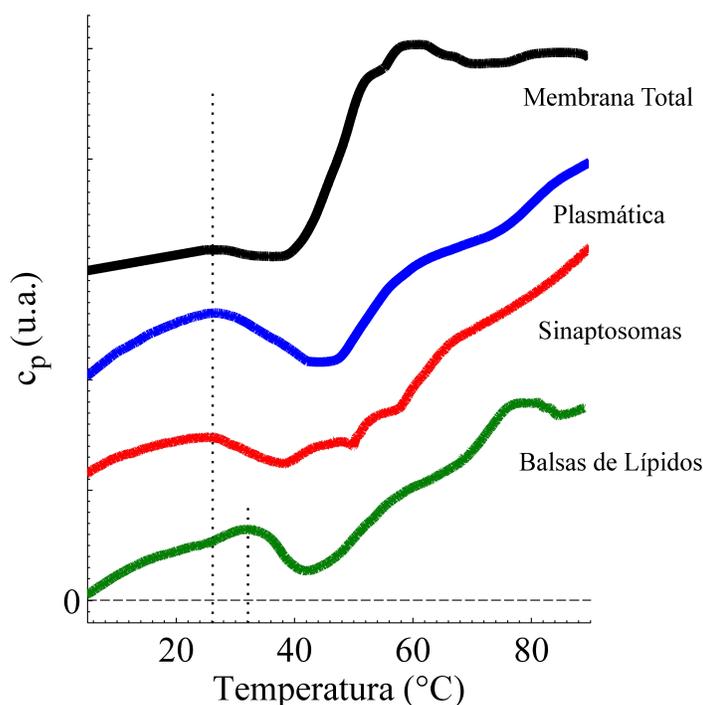


Figura 6.1: Caracterización termotrópica de membranas cerebrales. La T_m de la fase lipídica para todas las membranas cerebrales se encuentra en el intervalo de $26\text{-}27^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$, excepto las balsas de lípidos con una T_m mayor de $32.19^\circ\text{C} \pm 0.22^\circ\text{C}$. Las temperaturas superiores a $\sim 40^\circ\text{C}$ muestran el perfil de desplegamiento de proteínas característico. Todos los termogramas son resultados representativos de al menos 3 experimentos.

6.4. Influencia del PB en la físico-química de membranas cerebrales

6.4.1. Fenómeno de DPF en membranas plasmáticas cerebrales

El fenómeno de depresión del punto de fusión (DPF) inducido por agentes anestésicos, el cual implica desorden de membrana, ha sido reportado solo en membranas de lípidos artificiales [159, 160]. Sin embargo, no existe evidencia previa que justifique tal fenómeno en membranas biológicas, en particular, en membranas plasmáticas neuronales. En dicho estudio se llevaron a cabo aislamientos de membrana plasmática cerebral con el fin de explorar los cambios termotrópicos inducidos por el PB (3 mM) en el perfil de lípidos y proteínas (véase Fig. 6.2a). La suspensión de membranas plasmáticas fue incubada con PB previo a la medición de DSC. Se observó una disminución en la T_m de los lípidos ($\Delta T_m \approx -1.8^\circ\text{C} \pm 0.4^\circ\text{C}$) con respecto al control. Este resultado ilustra un aumento en el desorden de los lípidos de membrana debido al PB. También se observa que PB aumenta la entalpía calorimétrica (área bajo la curva) del perfil de desplegamiento de proteínas (véase Fig. 6.2a). Tal aumento de cohesión puede ser causado por cambios estructurales o agrupamientos de proteínas durante el tratamiento de PB (este hecho será discutido más adelante). El resultado anterior demuestra el desorden de la fase lipídica de las membranas plasmáticas inducido por PB. A continuación, nos centraremos particularmente en el efecto que este anestésico produce sobre las balsas de lípidos.

6.4.2. Estabilidad ‘lípidoproteína’ de balsas de lípidos

Para estudiar, *in vivo*, el efecto de la anestesia de PB en las balsas de lípidos, estas fueron aisladas a partir de cerebro de rata en estado de anestesia, a través del método ‘libre de detergente’ [158] (véase ‘Metodología experimental’). En primer lugar, el análisis termotrópico de estas balsas muestra una disminución pequeña pero significativa de la T_m de los lípidos ($\Delta T_m \approx -1.15^\circ\text{C} \pm 0.57^\circ\text{C}$), de ratas tratadas con PB comparadas con su control (ver Fig. 6.2b). El desorden de lípidos asociado a esta reducción de T_m puede atribuirse a: 1) residuos de PB en las balsas de lípidos después del proceso de aislamiento, o 2) durante el estado de anestesia, la PB desestabiliza las balsas de lípidos reduciendo la cantidad de proteínas asociadas, y como resultado, la cohesión natural de dichas balsas disminuye. Consideramos que la segunda hipótesis es más plausible puesto que si realizamos un segundo barrido en balsas de lípidos control (después del desplegamiento de proteínas ocurrido en el primer barrido) (ver Fig. 6.2c), la señal de lípidos muestra una reducción significativa de la T_m ($\Delta T_m \approx -11.27^\circ\text{C} \pm 0.47^\circ\text{C}$). Es importante mencionar que después del segundo barrido, la señal de lípidos prevalece sin alteraciones en barridos posteriores. Curiosamente, esta diferencia entre el primer y segundo barrido fue apenas significativa en membranas plasmáticas (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que para balsas de lípidos, la T_m de la fase lipídica depende en forma importante de la conformación estructural y cantidad de proteínas asociadas.

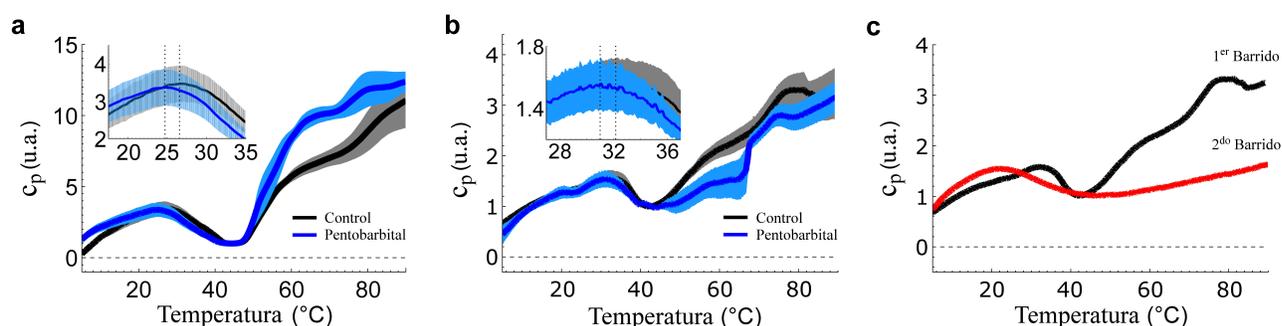


Figura 6.2: Influencia de PB en la estabilidad lípido-proteína de membranas cerebrales. (a) El PB induce cambios estructurales en membranas plasmáticas; fenómeno de DPS de la fase lipídica. El recuadro interno muestra un acercamiento de la transición de fase de lípidos. La T_m de las membranas de control fue $26.58^{\circ}\text{C} \pm 0.19^{\circ}\text{C}$, mientras que para las membranas incubadas con PB (a 3 mM) en $24.72^{\circ}\text{C} \pm 0.21^{\circ}\text{C}$. Los datos son representados como el promedio \pm SEM; $n = 3$ (6 cerebros cada uno). (b) En la anestesia con PB, la T_m de las balsas de lípidos fue $32.19^{\circ}\text{C} \pm 0.22^{\circ}\text{C}$ y $31.04^{\circ}\text{C} \pm 0.35^{\circ}\text{C}$ para los casos control y PB, respectivamente. Los termogramas individuales fueron normalizados respecto al punto medio entre las señales de lípidos y proteínas. Los datos son representados como el promedio \pm SEM; $n = 3$ (3 cerebros cada uno). (c) La T_m de la fase lipídica de balsas depende de la conformación estructural de la proteína. Después de calentar hasta 90°C en la primer barrido (modo calentamiento) donde se despliegan las proteínas (transición irreversible), el segundo barrido muestra una disminución significativa en la T_m de la fase lipídica. La T_m de la fase lipídica fue $32.19^{\circ}\text{C} \pm 0.22^{\circ}$ y $20.92^{\circ}\text{C} \pm 0.25^{\circ}$ en el primer y segundo barrido, respectivamente. Este termograma es un resultado representativo de al menos 3 experimentos.

La reducción en el perfil de desplegamiento de proteínas de la figura 6.2b parece indicar que la proteína total presente en las balsas de lípidos disminuye durante el estado de anestesia. Para demostrar lo anterior, se empleó un método basado en el uso de detergente [161] que permite separar las balsas de lípidos y una fracción enriquecida con la ‘densidad postsináptica’ (DPS) sin balsas. El marcador de balsa lipídica Caveolin-1 y el gangliósido GM_1 se concentran en la fracción 2, mientras que la proteína TfR, que no está asociada a balsas, no está presente en dicha fracción (ver Fig. 6.3a). Como se mencionó anteriormente las subunidades del receptor NMDA se encuentran en las fracciones de balsas de lípidos y en la enriquecida con DPS (sin balsas). La concentración de proteína total fue determinada por la prueba Bradford en balsas aisladas de ratas control y anestesiadas previamente. Las balsas de lípidos de ratas anestesiadas presentaron una menor concentración de proteínas, aproximadamente del 35% en comparación con el control (ver Fig. 6.3b). También se observó que la concentración de proteína en la DPS y fracción soluble no mostró cambios significativos. Además, para determinar si el cambio en la proteína total fue debido a una disminución general en la cantidad de balsas de lípidos, se midió la cantidad de gangliósido GM_1 en la fracción de las balsas de lípidos (ver Fig. 6.3c). Sin embargo, no se detectó una disminución significativa en la cantidad de este lípido, lo que sugiere que el PB altera la interacción de las proteínas con balsas de lípidos sin modificar la cantidad de estos últimos. En conjunto, estos datos indican que la anestesia con PB induce una disminución de la proteína total asociada a las balsas de lípidos.

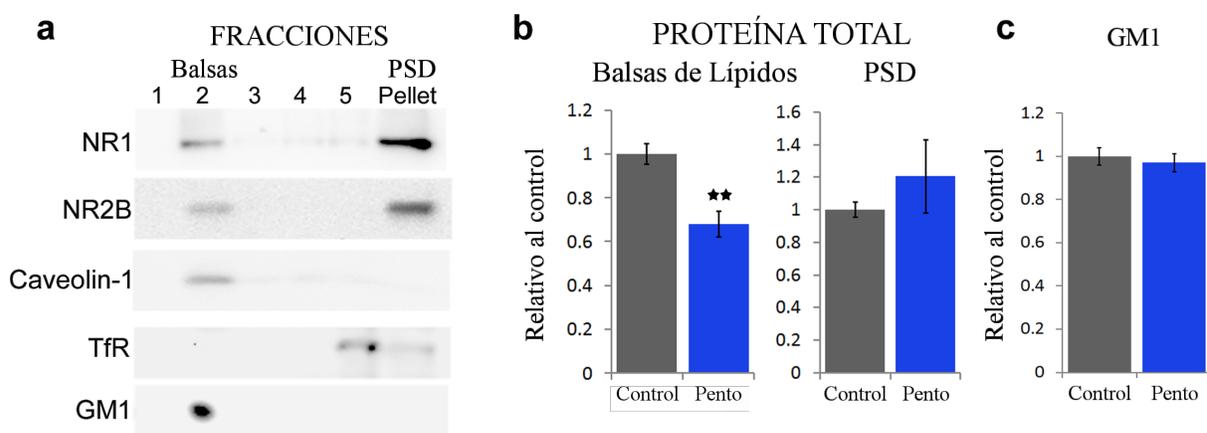


Figura 6.3: Efecto de la anestesia en la cantidad de proteína total en balsas de lípidos. Los cerebros de rata fueron extraídos en 1% Triton X-100 y separados en un gradiente de densidad. (a) Se obtuvieron cinco fracciones (de arriba hacia abajo) de cada gradiente y un volumen igual de estas fracciones fue inmunotransferido para las proteínas indicadas. Las fracciones también se analizaron para el gangliósido GM₁ (ensayo de dot-blot utilizando la toxina del cólera). (b) La concentración total de proteínas (Bradford) se analizó en las fracciones de balsas de lípidos y en las enriquecidas con DPS, aisladas de animales control y anestesiados (PB). (c) El GM₁ se analizó (dot blot) en un volumen igual de la fracción de balsas de lípidos. Los gráficos muestran la concentración de proteínas y el análisis de densitometría dot-blot expresado como el cociente entre ratas tratadas con PB y control (media ± SEM) (Se utilizaron al menos 9 animales por grupo). ** $p < 0.01$.

6.4.3. Asociación de los receptores NMDA y GABA_A con balsas de lípidos

Algunos estudios han demostrado que los anestésicos generales potencian la función del receptor ácido γ -aminobutírico tipo A (GABA_A) [162] y/o inhiben los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) [163, 164]. Para evaluar el efecto de PB en la asociación de estos receptores con balsas lipídicas, se cargó la misma cantidad de proteína total para ser analizada por Western blot. Esto significa que compensamos la disminución de la cantidad total de proteína en las balsas de ratas anestesiadas para evaluar particularmente los cambios en la concentración de los receptores NMDA y GABA_A. Hemos encontrado que PB disminuye aún más la cantidad de las subunidades NR1 y NR2B del NMDAR en las balsas de lípidos en comparación con la actina o la subunidad α del receptor GABA_A (ver Fig. 6.4a). No se detectaron cambios significativos en la DPS o fracción soluble (ver Fig. 6.4b y c). Los niveles de los receptores GABA_A fueron similares en el control y ratas anestesiadas, lo que significa, por tanto, que este receptor se reduce solo un $\approx 30\%$ en la cantidad de proteína total de la fracción de balsas de lípidos.

Los resultados previos fueron confirmados por el método 'libre de detergente' [158], usado en los experimentos de DSC para balsas de lípidos. Este método, que implica una resuspensión en un amortiguador a 0.5 M de bicarbonato (pH ~ 11), rompe las membranas celulares en pequeños fragmentos, despojándolos de proteínas citosólicas. El homogenado fue fraccionado, sin la eliminación de los extractos solubles, por centrifugación en un gradiente discontinuo de

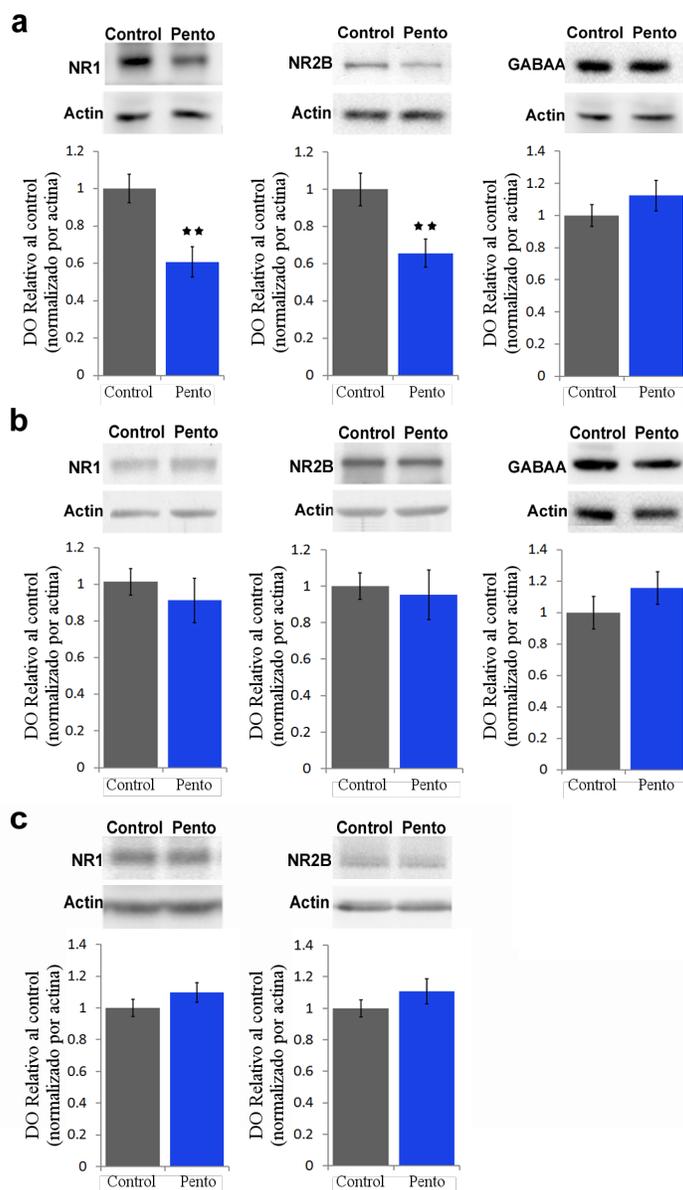


Figura 6.4: Efecto de la anestesia en la asociación de los receptores NMDA y GABA α con balsas de lípidos. (Protocolo con detergente) Las balsas de lípidos de cerebro de ratas control y anestesiadas con PB fueron extraídas en 1% Triton X-100 y separadas en un gradiente de densidad de sacarosa. Después de la determinación de proteína total, se analizaron por Western blot cantidades iguales de proteínas de balsas de lípidos (a), DPS (b) y extracto soluble (c), para las proteínas indicadas; subunidades NR1 y NR2B del NMDAR, y α de GABA α . Los gráficos muestran la lectura espectrofotométrica y el análisis de densitometría dot-blot normalizado por actina (media \pm SEM), expresado como la razón de la inmunoreactividad entre las ratas tratadas con PB y control (Se utilizaron al menos 9 animales por grupo) ** $p < 0.01$.

sacarosa para separar las balsas de lípidos de baja densidad a partir de membranas de alta densidad (ver Fig. 6.5a). De forma similar, la anestesia con PB reduce la asociación de proteínas con balsas de lípidos sin cambiar la cantidad de GM₁ (ver Fig. 6.5b). Se cargó la misma concentración de proteína total para analizar de forma particular la cantidad de NMDAR por Western blot. También se encontró que el PB disminuye en un grado mayor la cantidad de subunidades NR1 del NMDAR en esta fracción (ver Fig. 6.5c). Por lo tanto, ambos métodos de extracción de balsas de lípidos, con y sin detergente, y pese a sus diferencias en la pureza/eficiencia de extracción, confirman la reducción de proteína asociada a dichas balsas, en particular de los receptores NMDA y GABA_A.

Por otra parte, la anestesia con PB disminuyó la cantidad de NMDAR en la fracción de balsas de lípidos pero no se detectó un aumento significativo en la fracción de DPS. Esto podría significar que el PB indujo una remoción del NMDAR de la sinapsis. Para hacer frente a esta hipótesis, se aislaron sinaptosomas [157] de ratas control y anestesiadas. Se evaluó la cantidad de este receptor en la fracción sinaptosomal, sin embargo, no se encontraron cambios significativos (ver Fig. 6.6). Este resultado sugiere que, al menos después de 15 minutos de la inyección intraperitoneal de PB, no existe endocitosis del NMDAR en la sinapsis.

6.5. El desorden de membrana y su implicación en las balsas de lípidos

Una gran cantidad de estudios de DSC han demostrado que los lípidos de las membranas biológicas existen exclusivamente en fase fluida a temperaturas fisiológicas (T_p). Sin embargo, la T_m de estos lípidos puede ir en un rango amplio de temperatura por debajo de T_p , dependiendo de la célula e incluso el organelo [151]. Por ejemplo, se sabe que las membranas internas mitocondriales de hígado de rata tienen una transición de fase gel-fluido amplia y reversible centrada en 0°C, siendo validada por extractos de lípidos puros [133]. Sin embargo, en el mismo organelo, se ha reportado que la transición de la membrana externa se produce a una temperatura ligeramente más baja que la transición de la membrana interna ($\sim 10^\circ\text{C}$) [134]. En primer lugar, estos resultados mostraron que la membrana interna es más rígida que la membrana externa, y en segundo lugar, que cada tipo de membrana biológica posee diferentes propiedades físicas críticas para llevar a cabo sus funciones normales.

Como se describió anteriormente, nuestros resultados proporcionan por primera vez una caracterización termotrópica de membranas plasmáticas cerebrales y balsas de lípidos. De manera interesante, la transición de fase (T_m) del medio lipídico se produce a temperaturas relativamente más altas respecto a otras membranas biológicas, mostrando una amplia transición muy cerca de la temperatura fisiológica ($T_p \approx 37^\circ\text{C}$). El hecho de que las membranas cerebrales se encuentren cerca de la transición implica que pequeñas perturbaciones pueden ser capaces de desencadenar cambios considerables en las constantes elásticas de la membrana. Este hallazgo provee a su vez uno de los requisitos termodinámicos fundamentales detrás del 'modelo del solitón' [22] para el impulso nervioso (véase Capítulo 1).

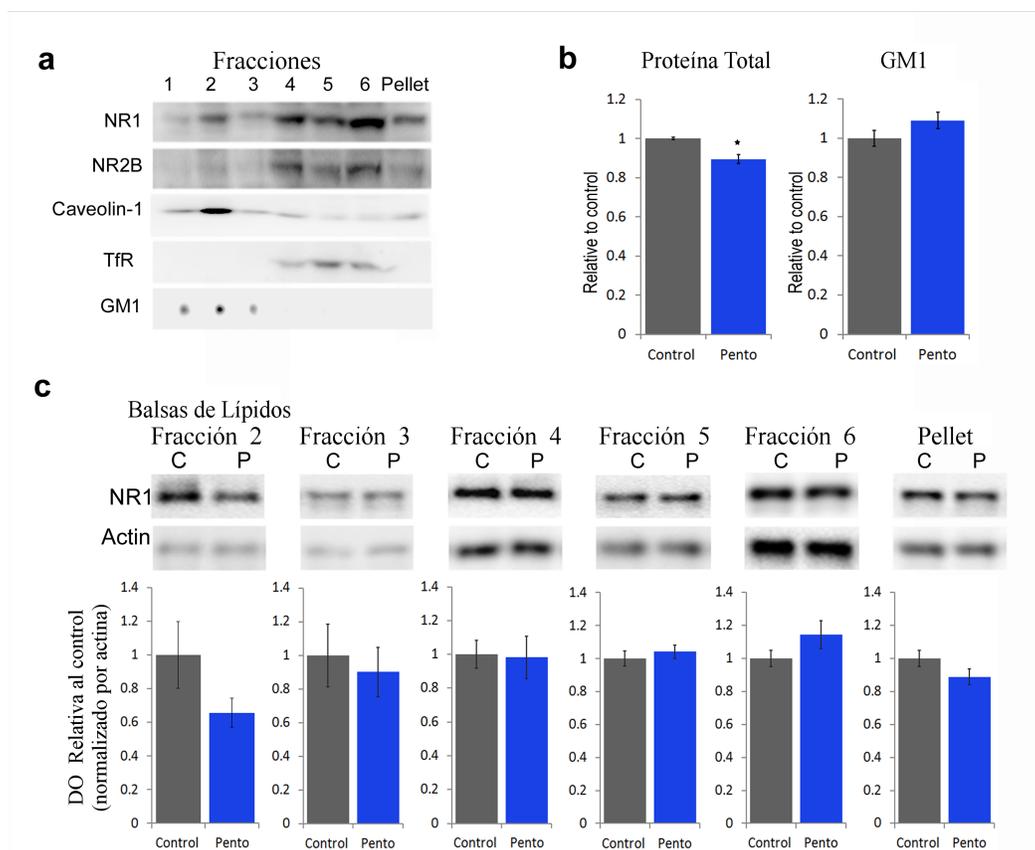


Figura 6.5: Efecto de la anestesia en la asociación del receptor NMDA con balsas de lípidos. (Protocolo sin detergente) Las balsas de lípidos de cerebro de ratas control y anestesiadas con PB fueron extraídas en un amortiguador de NaHCO_3 (0.5 M) libre de detergente y separadas en un gradiente de densidad de sacarosa. **(a)** Se obtuvieron siete fracciones (de arriba a abajo) de cada gradiente y un volumen igual de estas fracciones fue inmunotransferido para la proteína indicada; subunidad NR1 del NMDAR. Las fracciones también se analizaron para el gangliósido GM_1 (ensayo de dot-blot utilizando la toxina del cólera). **(b)** La concentración total de proteína (Bradford) se analizó para las fracciones de balsas de lípidos y en las enriquecidas con DPS, aisladas de animales control y anestesiados (PB). El GM_1 se analizó (dot blot) en un volumen igual de la fracción de balsas de lípidos. El gráfico muestra la concentración de proteínas y el análisis de densitometría dot-blot expresados como el cociente entre ratas tratadas con PB y control (media \pm SEM) (Se utilizaron al menos 3 animales por grupo). * $p < 0.05$. **(c)** Después de la determinación de proteína total, se analizaron por Western blot cantidades iguales de proteínas de cada fracción (excepto la fracción 1), para la misma subunidad NR1. El gráfico muestra la lectura espectrofotométrica y el análisis de densitometría dot-blot normalizado por actina (media \pm SEM), expresado como la razón de la inmunorreactividad entre las ratas tratadas con PB y control (Se utilizaron al menos 3 animales por grupo).

Mediante el uso de pruebas de fluorescencia para estudiar el orden de la membrana, se ha demostrado que diferentes anestésicos tales como el fenobarbital, pentobarbital, prilocaína, procaína y etanol son capaces de aumentar la fluidez de la membrana (desorden) de membrana plasmática de fibroblastos LM [165] y sináptica [166]. Por otro lado, el único experimento de

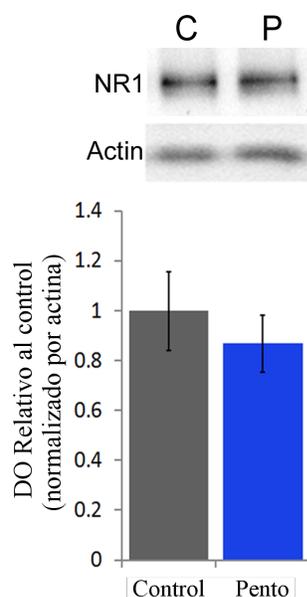


Figura 6.6: Efecto de la anestesia en la asociación del receptor NMDA con la sinapsis. Los sinaptosomas se aislaron mediante un gradiente de densidad sacarosa a partir de animales control y en estado de anestesia (PB). Se analizó por Western blot la subunidad NR1 en la misma cantidad de proteínas sinaptosomales. El gráfico muestra la lectura espectrofotométrica y el análisis de densitometría dot-blot normalizado por actina (media \pm SEM), expresado como la razón de la inmunorreactividad entre las ratas tratadas con PB y control (Se utilizaron al menos 5 animales por grupo).

DSC reportado de membranas plasmáticas (eritrocitos) con anestésicos, sugiere una desestabilización de la estructura lipídica inducida por tetracaína [167]. Sin embargo, se ha explorado muy poco acerca de los aspectos físico-químicos en la interacción anestésica con membranas cerebrales. Nuestros datos de DSC muestran la primera evidencia de una disminución significativa del punto de fusión (T_m) de la fase lipídica de membranas plasmáticas de cerebro, debido a la interacción con el anestésico PB; donde éste no solo induce desorden estructural de los lípidos, sino también afecta la interacción lípido-proteína. Si recurriésemos al ‘modelo del solitón’ para tratar de explicar la anestesia, tal reducción de T_m , que a su vez se aleja de T_p , aumenta el costo energético de la membrana para alcanzar su transición gel-fluido y que por ende, la generación del potencial de acción sea suprimida [25] (véase Capítulo 1).

Como se discutió en el capítulo anterior, algunas moléculas que normalmente organizan membranas poco ordenadas, son capaces de desordenar aquellas muy ordenadas, así como las balsas de lípidos. Además, se ha demostrado que la afinidad del etanol por las membranas de lípidos es altamente sensible a cambios en la estructura central de los lípidos, grupo glicerol (fosfatidilcolina) o ceramida (esfingomielina/gangliósidos) [168]. El etanol mostró una alta afinidad por los lípidos que contienen el grupo ceramida, los cuales son componentes esenciales de las balsas de lípidos. Recientemente, se ha propuesto un modelo de heterogeneidad de membrana plasmática que atribuye esta estructura a la presencia de un punto crítico de miscibilidad

(T_c) en membranas plasmáticas [169, 170]. Este modelo predice que el tamaño, la composición y duración de las estructuras mediadas por lípidos, en células intáctas y a temperatura fisiológica, serán sensibles a la temperatura del punto crítico subyacente. Veatch y colaboradores también han encontrado que los alcoholes anestésicos disminuyen estas temperaturas críticas por 4°C a su respectiva dosis anestésica [171]. Dentro de este modelo, un compuesto que reduce la T_c (de manera similar a T_m en nuestro caso) podría también reducir el tamaño, duración y el contraste de composición de los dominios mediados por lípidos en la membrana plasmática a temperatura fisiológica. Todos estos hallazgos son argumentos importantes para recurrir a la ‘hipótesis de balsas de lípidos’ de la anestesia.

Nuestros datos de DSC en balsas de lípidos de cerebro bajo anestesia (PB) mostraron una ligera pero significativa disminución de la T_m de los lípidos y una disminución de la señal de la proteína. También se observó una disminución de $\approx 30\%$, en la cantidad de proteína total en las fracciones de balsas de lípidos, determinado por el ensayo Bradford. De manera interesante, encontramos que el PB induce una disminución adicional del NMDAR en la fracción de balsas de lípidos (un $\approx 35\%$ adicional), lo cual no ocurre con el receptor GABA_A.

El efecto diferencial de PB en la asociación de proteínas con balsas lipídicas podría deberse a la diversidad de composición de las mismas. Sería de esperar que diferentes canales proteicos presenten ligeros cambios en la composición lipídica en su entorno. En las células HEK, se observó recientemente una existencia simultánea de múltiples tipos de dominios de membrana [136]. Por otra parte, dos receptores, previamente identificados como constituyentes de las balsas de lípidos, fueron encontrados en dominios de lípidos diferentes e independientes de la membrana plasmática. Además, los estudios en células T sugieren balsas de lípidos funcionales que contienen subconjuntos específicos de especies de gangliósidos [137]. Es importante destacar que tales diferencias de composición, entre balsas de lípidos de una misma membrana plasmática, suponen diferencias en sus propiedades físico-químicas, y como resultado, diferentes susceptibilidades al desorden estructural. Por lo anterior, es posible que el PB y otros anestésicos tengan efectos diferenciales sobre dominios de lípidos específicos que afectan por ende a las proteínas asociadas.

Diferentes estudios han demostrado que las balsas de lípidos están presentes en dendritas y membranas postsinápticas que interactúan con proteínas de la DPS [172, 173]. También se ha encontrado que la asociación de los NMDARs con balsas lipídicas es un mecanismo regulador finamente coordinado durante la plasticidad sináptica, isquemia y el desarrollo [149, 174, 175]. Es importante mencionar que los NMDARs forman diferentes complejos de señalización en las balsas de lípidos, los cuales correlacionan con mayores niveles de fosforilación de sus subunidades NR2 en tales microdominios [161]. La fosforilación de estas subunidades se ha relacionado con una función potenciada [176]. Además, varios estudios han demostrado que las estatinas, metil-ciclodextrinas, o cualquier otro compuesto que reduzca los niveles de colesterol de la membrana alterando por tanto las balsas lipídicas, protegen a las neuronas de la excitotoxicidad (exceso de excitación) mediada por el NMDAR asociado a las mismas [177, 178]. Estos estudios muestran la importancia de la interacción NMDAR-balsas de lípidos, sugiriendo fuertemente que la remoción de dicho receptor de balsas de lípidos disminuye su función excitatoria.

En el presente trabajo hemos encontrado que el PB reduce en forma importante la asociación del NMDAR con balsas de lípidos (aproximadamente en un 70%), lo que podría explicar el efecto inhibitorio de PB en el NMDAR.

Es bien sabido que PB aumenta la inhibición mediada por el receptor GABA_A, aumentando el tiempo medio de activación de dichos canales [179], lo que prolonga la inhibición de las corrientes postsinápticas. Aunque se ha demostrado la existencia de grupos de receptores GABA_A asociados a balsas de lípidos [150], la interacción entre tales receptores con su vecindario lipídico no ha sido bien estudiada. Es importante aclarar que este receptor presenta su actividad inhibitoria únicamente fuera de balsas. De hecho, la asociación de este receptor a las balsas de lípidos parece ser un mecanismo de ‘regulación hacia abajo’ (conocido también como ‘regulación negativa’), ya que se ha encontrado que la disrupción de balsas de lípidos potencia el efecto de las benzodiazepinas en GABA_A [180] y también evitar el efecto inhibitorio del ‘factor neurotrófico derivado del cerebro’ (FNDC) [181]. Por lo tanto, la remoción de los receptores GABA_A de balsas, incluso en un grado menor que los NMDAR, podría ser responsable del efecto potenciador de PB en las corrientes de GABA_A.

Algunos estudios han reportado que el Xenón y el isoflurano inhiben los receptores de NMDA mediante el mismo sitio de unión que el coagonista glicina [75]. La mutación de la subunidad NR1 (F639A), localizada en este sitio de unión, disminuyó la sensibilidad de este receptor ante ambos anestésicos. Sin embargo, estos estudios también demostraron un componente de inhibición no-competitiva, insensible a la mutación de NR1. Nuestros resultados sugieren que el desorden estructural de la membrana y la subsecuente alteración en la interacción proteína-balsas de lípidos, podrían ser el componente no-competitivo compartido por todos los anestésicos. En apoyo de esta hipótesis, un estudio reciente demostró que diferentes tensioactivos inhiben al receptor NMDA y a su vez potencian al receptor GABA_A de la misma manera que el isoflurano y etanol [182]. Estos tensioactivos son compuestos anfífilos que interactúan con la membrana, inducen desorden y desestabilizan la interacción lípido-proteína. Es importante mencionar que, en contraste con el isoflurano y etanol, dichos tensioactivos no disminuyeron la modulación del NR1 mutante (F639A) en comparación con los receptores de tipo silvestre [182].

Hasta donde sabemos, solo existe un reporte acerca de la estabilidad termodinámica lípido-proteína [135]. Éste demostró, en membranas internas mitocondriales de corazón de res, una amplia transición de fase reversible (de lípidos) centrada a -10°C la cual es desplazada a 20°C después de la desnaturalización térmica de proteínas. La membrana interna de mitocondria posee cantidades considerables de lípidos de transiciones altas, como la cardiolipina, la cual brinda rigidez y juega un papel determinante en la estabilidad estructural y activación de muchas enzimas mitocondriales, especialmente aquellas relacionadas con la síntesis de ATP y transducción de energía, entre otras funciones [183]. Por tanto, el desplazamiento de la T_m de lípidos hacia altas temperaturas reportado en [135], sugiere que los complejos proteicos, previo a su desnaturalización por calor, brindaban una mayor fluidez (reducción de cohesión) a la membrana interna mitocondrial intrínsecamente rígida. Este fenómeno, sin embargo, no había sido explorado en las membranas plasmáticas. Nuestros resultados de DSC en balsas de lípidos ce-

rebrales, muestran que la desnaturalización de proteínas induce de forma considerable una desorganización estructural de la fase lipídica, a través de la reducción en la T_m de los lípidos ($\Delta T_m \approx -11.27^\circ\text{C}$). Esto demuestra que las proteínas asociadas a balsas, en contraste con [135], aumentan la estabilidad o cohesión de tales dominios lipídicos intrínsecamente más fluidos.

En resumen, los resultados presentados en este capítulo proporcionan evidencia importante para la comprensión del mecanismo anestésico. Por primera vez: 1) es caracterizado el comportamiento termotrópico de membranas cerebrales; 2) se demostró el desorden estructural de lípidos inducido por PB en la membrana plasmática cerebral; 3) tal desorden de membrana correlacionó con una reducción del $\approx 30\%$ en la proteína total asociada a balsas de lípidos (incluyendo los receptores GABA_A) durante el estado de anestesia. Por último, 4) también encontramos que el PB indujo una disminución diferencial adicional ($\approx 70\%$) en la asociación del NMDAR, el cual, junto con GABA_A han sido postulados como sitios de acción para este anestésico. En general, esta serie de datos suman en favor de la 'hipótesis de balsas de lípidos'; sugiriendo que tales dominios lipídicos son mediadores plausibles en la acción anestésica.

6.6. Metodología experimental

Animales. Se utilizaron ratas adultas Wistar macho. Ellas fueron mantenidas en jaulas individuales en un ciclo de 12 hrs luz:12 hrs oscuridad. Las ratas recibieron comida y agua *ad libitum*. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las reglas en materia de salud (Ministerio de Salud, México) y con la aprobación del Comité de Cuidado de Animales local. Las ratas tratadas con PB fueron sacrificadas 15 minutos antes de la inyección intraperitoneal de 5 mg/kg de pentobarbital sódico.

Anticuerpos. Ratón anti-NR1 (cat. 320500 Zymed, San Francisco, CA), ratón anti-NR2B (Cat. 610417, BD Biosciences San Jose, California), receptor GABA alfa-1, cat (PA1-4658. Thermo Scientific), anti TfR (Cat. H68.4; Life Technologies).

Aislamiento de membranas plasmáticas. La fracción de membranas plasmáticas fue aislada como se describió anteriormente [156]. Los tejidos cerebrales frescos se lavaron con solución salina enfriada con hielo y se homogeneizaron con un homogeneizador de teflón-vidrio preenfriado en 2 ml de solución amortiguadora de homogeneización (sacarosa 0.25 M, HEPES 10 mM, PMSF 1 mM, cóctel de inhibidores de proteasas completo, Roche, pH 7.5). La muestra se centrifugó a 1,000 x g durante 10 min, el sedimento se lavó con 1 ml de la solución de homogeneización y se centrifugó de nuevo a 1,000 x g durante 10 min. El sobrenadante de ambas centrifugaciones fue mezclado y centrifugado a 50,000 x g durante 20 min. El sedimento resultante fue resuspendido en 0.8 ml de 69% de sacarosa (añadiendo gota a gota al sedimento con agitación vigorosa con el fin de evitar la aglutinación de las membranas y su posterior contaminación) y fue posteriormente cargado en la parte inferior de un gradiente discontinuo de sacarosa. Cada gradiente, comenzando desde la parte inferior del tubo, estuvo compuesto de 0.8 ml de solución de sacarosa al 54, 45, 41 y 37%, respectivamente, y se añadió el medio de homogeneización para llenar por completo el tubo. El gradiente fue centrifugado a 70,000 x g durante 3 hrs. Se recogió la banda sedimentada entre 37 y 25% de sacarosa, correspondiente a las membranas plasmáticas. Esta fracción se diluyó 1:4 con HEPES 10 mM y se sedimentó por centrifugación a 30,000 x g durante 15 min. Finalmente, el sedimento se lavó tres veces con 10 mM de solución amortiguadora HEPES, pH 7.4.

Aislamiento de sinaptosomas. La fracción de sinaptosomas fue aislada como se describió anteriormente [157] con algunas modificaciones. Los cerebros de ratas adultas se homogeneizaron en 2 ml de solución 'A' enfriada con hielo (0.32 M de sacarosa, 0.5 mM CaCl_2 , 1 mM de NaHCO_3 , MgCl_2 y NaF, 2 mM de ortovanadato de sodio, 20 mM de glicerol 2-fosfato, cóctel de inhibidores de proteasas completo, Roche). Se realizaron una homogeneización con doce golpes arriba y abajo del homogeneizador de teflón-vidrio. La muestra fue centrifugada a 1,000 x g durante 10 min, el sedimento se lavó con 1 ml de la solución 'A' y fue centrifugada de nuevo a 1,000 x g durante 10 min. El sobrenadante de ambas centrifugaciones fue mezclado y centrifugado a 15,000 x g durante 15 min. El sedimento resultante fue resuspendido en una 1 ml de la solución 'B' (solución 'A' sin CaCl_2 y MgCl_2), fue posteriormente cargado en la parte superior de un gradiente discontinuo de sacarosa (volúmenes iguales de 0.85 ml, 1.0 y 1.2 M de sacarosa, cada uno preparado en solución 'B') y fue centrifugado a 82,500 x g durante 2 h. Se

recogió la banda sedimentada entre 1.0 y 1.2 M de sacarosa, correspondiente a sinaptosomas. Esta fracción (0.8 ml) se diluyó 1:1 con solución 'B'. Los sinaptosomas fueron sedimentados por centrifugación a 20,000 x g durante 20 min y resuspendidos en una solución amortiguadora de lisis con Triton X-100 (0.25%). La misma cantidad de proteína de la fracción sinaptosomal fue separada por SDS-PAGE e inmunotransferencia con los anticuerpos indicados.

Aislamiento de balsas de lípidos. Las balsas de lípidos se prepararon a partir de un extracto insoluble de tejido homogeneizado como se describió anteriormente [184] con algunas modificaciones [158]. Un cerebro de rata por muestra fue homogeneizado en la solución amortiguadora de lisis (0.5 ml de NaCl 150 mM, Tris-HCl 25 mM pH 7.5, que contiene 10 mM NaF, 10 mM NaP₂O₇, 1 mM de ortovanadato de sodio, cóctel de inhibidores de proteasas completo (Roche, Mannheim, Alemania) y 1% de Triton X-100. Después de la homogeneización (treinta golpes arriba y abajo) con un homogeneizador de teflón-vidrio, las muestras fueron centrifugadas a 1000 x g durante 10 min, y la concentración de proteína fue posteriormente determinada por la prueba Bradford. La concentración de proteína fue ajustada a 1 mg/ml de proteína en 5 ml (1:1 relación proteína/detergente) por muestra y se incubó durante 30 min a 4°C. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 16,000 x g durante 15 min a 4°C, para separar un extracto soluble de Triton X-100 y el sedimento insoluble. El sedimento fue resuspendido en 0.5 ml de solución amortiguadora de lisis, mezclado con 2 M de sacarosa (0.8 ml), luego esta mezcla es superpuesta con 1 M (1.6 ml) y posteriormente con 0.2 M (1 ml) de sacarosa, para ser finalmente centrifugada a 200,000 x g durante 18 hrs a 4°C. Después de la centrifugación, se recogieron cinco fracciones de la parte superior (fracción 1) a la parte inferior del gradiente. El sedimento se resuspendió en 1 ml de solución amortiguadora de lisis. Se midieron volúmenes iguales de cada fracción del gradiente para los marcadores de balsas lipídicas GM₁, caveolina-1 y para el receptor de transferrina (TGF) como marcador de no-balsa. La concentración más alta de todas estas proteínas fue encontrada en la fracción 2 como se reportó anteriormente. También se ha reportado de que el sedimento corresponde a una fracción insoluble de alta densidad que contiene la mayor proporción de proteínas de la densidad postsináptica (PSD-93, PSD-95, GluR1, NMDAR). El pellet no mostró niveles detectables de lípidos tales como el GM₁ y altos niveles de receptor de NMDA, por lo tanto podemos considerar que esta fracción contiene la DPS libre de balsas lipídicas. En consecuencia, la fracción 2 es referida como la fracción de balsa de lípidos y el sedimento como la fracción de DPS. Para comparar la cantidad de receptores NMDAR y GABA_A en balsas de lípidos entre el control y los animales anestesiados, la fracción de balsas fue sedimentada y resuspendida en la solución amortiguadora de lisis con 0.25% de Triton X-100. La concentración de proteína fue medida por la prueba Bradford. La misma cantidad de proteína total por muestra se analizó por Western blot.

Aislamiento de balsas de lípidos por el método 'libre de detergente'. Los cerebros de rata fueron resuspendidos en 0.45 ml de carbonato de sodio 0.5 M, pH 11.5, con inhibidores de proteasas y posteriormente fueron sometidos a ultrasonido con tres periodos de 30 s. El homogeneizado se ajustó a 40% de sacarosa mediante la adición de 0.7 ml de 60% de sacarosa en MBS (MES 25 mM, pH 6.4, NaCl 150 mM y carbonato de sodio 250 mM), colocado bajo un gradiente discontinuo de sacarosa 5-30% y centrifugado a 200,000 x g durante 15 hrs a 4°C.

Se recogieron siete fracciones (0.8 ml cada una) de la parte superior del tubo, mezcladas con 2 volúmenes de MBS y centrifugadas a 20,000 x g durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes se descartaron, y los sedimentos de membrana se resuspendieron en solución amortiguadora de lisis con 0.25% de Triton X-10052. La concentración de proteína fue medida por la prueba Bradford. La misma cantidad de proteína total por muestra se analizó por Western blot.

Análisis de calorimetría. Se analizaron cuatro diferentes tipos de membranas cerebrales: membrana total, plasmática, sinaptosomal y balsas de lípidos. Después del protocolo de aislamiento respectivo, todas las membranas fueron lavadas tres veces, y resuspendidas finalmente en 10 mM de la solución amortiguadora HEPES, pH 7.4 (300,000 x g, 15 min, 4°C). Previo a la introducción de las muestras en las cubetas preenfriadas del DSC, las muestras fueron degasificadas a baja presión (635 mmHg) durante 10 min a 4°C. Los perfiles de capacidad calorífica fueron obtenidos por medio de un microcalorímetro (NanoDSC, TA Instruments) interconectado a una PC, y los datos fueron analizados utilizando el software que provee el instrumento. Una vez que las muestras han sido introducidas en el calorímetro, éstas fueron equilibradas durante 5 min a 0°C. Se llevaron a cabo dos barridos en modo calentamiento de 0° a 90°C con una velocidad de barrido de 0.1°C/min para cada muestra. La capacidad calorífica fue medida a presión constante (3 atm). Debido a los resultados robustos en los perfiles de capacidad calorífica, se realizaron únicamente tres experimentos para cada tipo de membrana, usando extracciones cerebrales independientes. Puesto que no hay conocimiento de la masa de la muestra y su respectivo peso específico, las unidades de capacidad calorífica no pueden ser obtenidas, y por lo tanto, se sustrajo una línea recta propuesta como 'línea base' para todos los perfiles de capacidad calorífica. Para eliminar la variabilidad en la eficiencia de aislamiento (concentración de membrana) del análisis de datos, se realizó una normalización respecto al punto medio entre la señal de lípidos y proteínas en el perfil de capacidad calorífica. En los experimentos de DSC correspondientes al estudio de la interacción PB-membrana plasmática, la suspensión final obtenido del protocolo de aislamiento de membranas plasmáticas fue separada en dos; una muestra fue utilizada como grupo control, y la otra para la adición de PB (3 mM). Se llevaron a cabo al menos tres experimentos para cada caso, usando seis ratas por experimento para la interacción PB-membrana plasmática y tres ratas para el estudio de la anestesia con PB y su efecto en balsas de lípidos.

Análisis de Western-blot. Las muestras se mezclaron con una solución amortiguadora Leammeli y 3% de 2-mercaptoetanol, hervido y separados en 8% de SDS-PAGE. Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas durante 2 hrs a temperatura ambiente en una solución amortiguadora TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 0.9%, Tween 20 0.1%, pH 7.5) que contiene 5% de BSA. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios durante la noche a 4°, se lavaron (4 veces / 5 min) en TBS-T con 1% de BSA, y se incubaron durante 1 hr con el anticuerpo secundario conjugado con HRP. Los controles negativos fueron preparados por omisión de los anticuerpos primarios. Las proteínas fueron detectadas por ECL (Immobilon Wester, Millipore) y visualizadas por el sistema XRS ChemiDoc (BioRad).

Determinación del GM₁ por dot-blot. Para determinar el nivel de monosialogangliósido (GM₁), 1 ml de cada fracción de gradiente de densidad fue analizado por dot-blot sobre nitrocelulosa, y fue bloqueado como se ha descrito anteriormente. Después de la incubación con la toxina B del cólera conjugada con HRP (1/10.000) (Sigma, Saint Louis Missouri, EE.UU.), los puntos fueron revelados por quimioluminiscencia.

Análisis estadístico. Las diferencias estadísticas entre las muestras fueron evaluadas mediante la prueba *t* de Student no apareada para una muestra de $n \geq 5$, o el uso de la prueba *U* no paramétrica de Mann-Whitney para una muestra de $n = 3$. Todos los resultados se expresan como la media \pm SEM.

7

Conclusiones generales

Conclusiones generales

La tesis de este trabajo se ha centrado en tres aspectos generales, nunca antes considerados, en la interacción anestésicos/membranas: 1) la difusión de los anestésicos locales y generales depende de su propia naturaleza química la cual es regulada por la tasa de protonación efectiva del medio, 2) la reversibilidad del efecto anestésico mediante el uso de presión, Ca^{+2} y cafeína, tanto en sistemas celulares como de membranas de lípidos modelo, puede ser explicada a través de un efecto exclusivo en lípidos de membrana. Y por último, 3) nuestros resultados de anestesia en balsas de lípidos modelo y biológicas, proponen que tales dominios generan un 'umbral de desorden' distinto según su composición lipídica, brindando una explicación molecular coherente del efecto diferencial de los anestésicos. Todo esto propone que el mecanismo de acción anestésica ocurre a través de interacciones 'semiespecíficas' con los dominios de lípidos de la membrana neuronal, en donde tales dominios modulan a su vez la función de una gran variedad de receptores involucrados en la neurotransmisión.

8

Perspectivas

Perspectivas

- En la práctica, los anestésicos suelen usarse en combinación según su finalidad clínica. Por lo tanto, es interesante explorar la difusión de estas combinaciones clínicas de anestésicos en sistemas multilaminares, con el fin de estudiar su influencia mutua en la tasas de protonación resultante en el medio. Así como también es importante comprobar la relevancia de la tasa de protonación en la 'regulación' del efecto anestésico en sistemas animales.
 - El fenómeno de *cut-off* de los *n*-alcoholes es modulado por la composición del sistema lipídico. En consecuencia, este fenómeno puede ser extrapolado a membranas biológicas para detectar diferencias en la composición de balsas lipídicas.
 - El pentobarbital mostró un efecto diferencial sobre la asociación el receptor NMDA con las balsas de lípidos. Esta semiespecificidad puede ser explorada con otros anestésicos haciendo hincapié en los respectivos receptores propuestos como sitios de acción específica y su asociación a balsas de lípidos.
-

9

APÉNDICE

9.1. Otras colaboraciones

- Efectos de alta presión en el crecimiento y morfología bacteriana.
- SDM de anestésicos locales en membranas de lípidos
- Caracterización de la interacción de Dopamina-DPPC

9.2. Publicaciones y Congresos

Publicaciones:

1. F. J. Sierra-Valdez, L. S. Forero-Quintero, M. Costas, P. A. Zapata-Morin, A. Chavez-Reyes & J. C. Ruiz-Suárez. **The influence of non polar and polar molecules in motile cells membranes and pure lipid bilayers**, *PLoS one*, **8** (4), e59364 (2013).
 2. F. J. Sierra-Valdez & J. C. Ruiz-Suárez. **Noble gases in pure lipid membranes**, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 3167-3172 (2013).
 3. P. A. Zapata-Morin, F. J. Sierra-Valdez & J. C. Ruiz-Suárez. **The interaction of local anesthetics with lipid membranes**, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **53**, 200-205 (2014).
 4. Rosendo Pérez-Isidoro, F. J. Sierra-Valdez & J. C. Ruiz-Suárez. **Anesthetic diffusion through lipid membranes depends on the protonation rate**, *Nature Scientific Reports*, **4**, 7534 (2014).
 5. F. J. Sierra-Valdez, I. Delint-Ramirez & J. C. Ruiz-Suárez. **Pentobarbital modifies the lipid raft-protein interaction: a new hypothesis about the anesthesia mechanism on NMDA and GABAA receptors**, *en revisión Nature Comms* (2015).
 6. S. Salinas-Almaguer, A. Angulo-Sherman, F. J. Sierra-Valdez & H. Mercado-Uribe. **Sterilization by Cooling in Isochoric Conditions: the Case of Escherichia coli**, *en revisión PLoS one* (2015).
 7. F. J. Sierra-Valdez, P. A. Zapata-Morin & J. C. Ruiz-Suárez. **The cut-off of n-alcohols in model lipid rafts: a new clue in the anesthesia paradigm**, *en preparación* (2015).
 8. A. García-González, F. J. Sierra-Valdez, J. C. Ruiz-Suárez & J. Ruiz-García. **AFM characterization of dopamine interaction in DPPC monolayers**, *en preparación* (2015).
-

Congresos:

- CAM (2011) Washington, D.C., E.U.A. *The influence of non polar and polar molecules in motile cells membranes.* (Presentación Oral)
 - Biophysical Society Annual Meeting (2013) Filadelfia, Pensilvania, E.U.A. *Noble gases in pure lipid membranes.* (Presentación Oral)
 - CAM (2013) Waterloo, Ontario, Canadá. *Noble gases in pure lipid membranes.* (Presentación Oral)
 - Advances in Lipid-Protein Interactions (2014) Cuernavaca, Morelos, México. *Anesthetic diffusion through lipid membranes depends on the protonation rate.* (Presentación Poster)
 - Biophysical Society Annual Meeting (2015) Baltimore, Maryland, E.U.A. *Anesthetic diffusion through lipid membranes depends on the protonation rate.* (Presentación Poster)
-

Bibliografía

- [1] B. W. Urban, Markus Bleckwenn, and Martin Barann. Interactions of anesthetics with their targets: non-specific, specific or both? *Pharmacol. Ther.*, 111:729–770, 2006.
- [2] L. Brunton, B. Chabner, and B. Knollman. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill Professional, 12 edition, 2011.
- [3] Kam Yee Pang, Leon M. Braswell, Larry Chang, Toby J. Somannedr, and Keith W. Miller. The perturbation of lipid bilayers by general anesthetics: A quantitative test of the disordered lipid hypothesis. *Mol. Pharmacol.*, 18:84–90, 1980.
- [4] Pei Tang, Bin Yan, and Yan Xu. Different distribution of fluorinated anesthetics and nonanesthetics in model membrane: A 19FNMR study. *Biophys. J.*, 72:1676–1682, 1997.
- [5] J. P. Dilger. The effects of general anaesthetics on ligand-gated ion channels. *Br. J. Anaesth.*, 89:41–51, 2002.
- [6] C. Frenkel, D. S. Duch, and B. W. Urban. Molecular actions of pentobarbital isomers on sodium channels from human brain cortex. *Anesthesiology*, 72:640–649, 1990.
- [7] S. Vamparala, L. Saiz, R. G. Eckenhoff, and M. L. Klein. Partitioning of anesthetics into a lipid bilayer and their interaction with membrane-bound peptide bundles. *Biochem. J.*, 91:2815–2825, 2006.
- [8] H. H. Meyer. Zur theorie der alkoholnarkose. erste mittheilung. welche eigenschaft der anästhetica bedingt ihre narkotische wirkung? *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 425:109–118, 1899.
- [9] C. E. Overton. *Studien über die Narkose*. Verlag Gustav Fischer, Jena, Germany, English translation: *Studies of Narcosis*, Chapman and Hall, 1991, R. Lipnick, Ed. edition, 1901.
- [10] D Kharakoz. Phase-transition-driven synaptic exocytosis: a hypothesis and its physiological and evolutionary implications. *Bioscience reports*, 21:801–830, 2001.
- [11] Kent Jorgensen, John Hjort Ipsen, Ole G. Mouritsen, and Martin J. Zuckermann. The effect of anaesthetics on the dynamic heterogeneity of lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 65(3):205–216, 1993.

-
- [12] K W Miller, L L Firestone, J K Alifimoff, and P Streicher. Nonanesthetic alcohols dissolve in synaptic membranes without perturbing their lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(3):1084–1087, 1989.
- [13] S. M. Gruner and E. Shyamsunder. Is the mechanism of general anesthesia related to lipid membrane spontaneous curvature? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 625:685–697, 1991.
- [14] Katarzyna Wodzinska, Andreas Blicher, and Thomas Heimburg. The thermodynamics of lipid ion channel formation in the absence and presence of anesthetics. BLM experiments and simulations. *Soft Matter*, page 11, 2009.
- [15] J. R. Trudell, D. G. Payan, J. H. Chin, and E. N. Cohen. The antagonistic effect of an inhalation anesthetic and high pressure on the phase diagram of mixed dipalmitoyl-dimyristoylphosphatidylcholine bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72:210–213, 1975.
- [16] N P Franks and W R Lieb. Partitioning of long-chain alcohols into lipid bilayers: implications for mechanisms of general anesthesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(14):5116–5120, 1986.
- [17] N. P. Franks and W. R. Lieb. Stereospecific effects of inhalational general anesthetic optical isomers on nerve ion channels. *Science*, 254(5030):427–430, 1991.
- [18] S John Mihic, Qing Ye, Marilee J Wick, Vladimir V Koltchine, Matthew D Krasowski, Suzanne E Finn, Maria Paola Mascia, C Fernando Valenzuela, Kirsten K Hanson, and Eric P Greenblatt. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA_A and glycine receptors. *Nature*, 389(6649):385–389, 1997.
- [19] Pamela Flood, Jose Ramirez-Latorre, and Lorna Role. Alpha 4 beta 2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the central nervous system are inhibited by isoflurane and propofol, but alpha 7-type nicotinic acetylcholine receptors are unaffected. *Anesthesiology*, 86(4):859–865, 1997.
- [20] Andrew Jenkins, Eric P Greenblatt, Howard J Faulkner, Edward Bertaccini, Adam Light, Audrey Lin, Alyson Andreasen, Anna Viner, James R Trudell, and Neil L Harrison. Evidence for a common binding cavity for three general anesthetics within the GABA_A receptor. *J Neurosci*, 21(6):RC136, 2001.
- [21] N. P. Franks and W. R. Lieb. Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature*, 310:599–601, 1984.
- [22] T. Heimburg and A. D. Jackson. On soliton propagation in biomembranes and nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102:9790–9795, 2005.
-

-
- [23] S. S L Andersen, Andrew D. Jackson, and Thomas Heimburg. Towards a thermodynamic theory of nerve pulse propagation. *Progress in Neurobiology*, 88(2):104–113, 2009.
- [24] T. Heimburg and A. D. Jackson. The thermodynamics of general anesthesia. *Biophys. J.*, 92:3159–3165, 2007.
- [25] T. Heimburg and A. D. Jackson. On the action potential as a propagating density pulse and the role of anesthetics. *Biophys. Rev. Lett.*, 2:57–78, 2007.
- [26] D. A. Haydon and B. M. Hendry. Nerve impulse blockage in squid axons by n-alkanes: the effect of axon diameter. *J. Physiol.*, 333:393–403, 1982.
- [27] U. Rudolph and H. Mohler. Analysis of gaba_A receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44:475–98, 2004.
- [28] T. G. Hales and R. W. Olsen. Basic pharmacology of intravenous induction agents. *The Pharmacological Basis of Anesthesiology: Basic Science and Practical Applications*, pages 295–306, 1994.
- [29] D. E. Becker and K. L. Reed. Essentials of local anesthetic pharmacology. *Anesth. Prog.*, 53:98–109, 2006.
- [30] R. C. Terrell, L. Speers, A. J. Szur, J. Treadwell, and T. R. Ucciardi. General anesthetics: 1. halogenated methyl ethyl ethers as anesthetic agents. *J. Med. Chem.*, 14:517–519, 1971.
- [31] T. Yamakura and R. A. Harris. Effects of gaseous anesthetics nitrous oxide and xenon on ligand-gated ion channels, comparison with isoflurane and ethanol. *Anesthesiology*, 93:1095–1101, 2000.
- [32] D. M. Chernoff and G. R. Strichartz. Kinetics of local anesthetic inhibition of neuronal sodium currents ph and hydrophobicity dependence. *Biophys. J.*, 58:69–81, 1990.
- [33] G. R. Strichartz, V. Sanchez, G. R. Arthur, R. Chafetz, and D. Martin. Fundamental properties of local anesthetics ii. measured octanol:buffer partition coefficients and pka values of clinically used drugs. *Anesth. Analg.*, 71:158–70, 1990.
- [34] J. M. Vanderkooi, R. Landesberg, H. Selick li, and G. G. McDonald. Interaction of general anesthetics with phospholipid vesicles and biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 464:1–16, 1977.
- [35] F. Momo, S. Fabris, A. Bindoli, G. Scutari, and R. Stevanato. Different effects of propofol and nitrosopropofol on dmPC multilamellar liposomes. *Biophys. Chem.*, 95:145–155, 2002.
-

-
- [36] T. Hata, H. Matsuki, and S. Kaneshina. Effect of local anesthetics on the phase transition temperatures of ether- and ester-linked phospholipid bilayer membranes. *Colloids Surf. B*, 18:41–50, 2000.
- [37] Ch. Ueda, I. Tashiro and K. Arakawa. Depression of phase-transition temperature in a model cell membrane by local anesthetics. *Anesthesiology*, 46:327–332, 1977.
- [38] R. J. Davies. Buffering the pain of local anaesthetics: a systematic review. *Emerg. Med.*, 15:81–88, 2003.
- [39] G. A. Jamieson and D. M. Robinson. *Mammalian cell membranes*, volume 2. Butterworths, London, 1977.
- [40] F. Castelli, A. Raudino, and M. Fresta. A mechanistic study of the permeation kinetics through biomembrane models: gemcitabine–phospholipid bilayer interaction. *J. Colloid Interf. Sci.*, 285:110–117, 2005.
- [41] H. Matsuki, K. Shimada, S. Kaneshina, H. Kamaya, and I. Ueda. Difference in surface activities between uncharged and charged local anesthetics: correlation with their anesthetic potencies. *Colloids Surf. B*, 11:287–295, 1998.
- [42] F. J. Sierra-Valdez and J. C. Ruiz-Suárez. Noble gases in pure lipid membranes. *J. Phys. Chem. B*, 117:3167–3172, 2013.
- [43] N. P. Franks and W. R. Lieb. Molecular and cellular mechanisms of general anesthesia. *Nature*, 367:607–614, 1994.
- [44] Thomas Heimburg. *Thermal biophysics of membranes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.
- [45] T. Heimburg. Mechanical aspects of membrane thermodynamics. estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta*, 1415:147–162, 1998.
- [46] D. Needham, T. J. McIntosh, and E. Evans. Thermomechanical and transition properties of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *Biochemistry*, 27:4668–4673, 1988.
- [47] P. Méléard. Bending elasticities of model membranes: influences of temperature and sterol content. *Biophys. J.*, 72:2616–2629, 1997.
- [48] R. Koynova and M. Caffrey. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys.*, 1376:91–145, 1998.
-

-
- [49] M. S. Fernández, M. T. González-Martínez, and E. Calderón. The effect of pH on the phase transition temperature of dipalmitoylphosphatidylcholine-palmitic acid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 863:156–164, 1986.
- [50] N. J. Zuidarn and D. J. A. Cromm. Differential scanning calorimetric analysis of dipalmitoylphosphatidylcholine-liposomes upon hydrolysis. *Int. J. Pharm.*, 126:209–21, 1995.
- [51] Y. V. Il'ichev, A. B. Demyashkevich, and M. G. Kuzmin. Protolytic photodissociation of hydroxyaromatic compounds in micelles and lipid bilayer membranes of vesicles. *J. Phys. Chem.*, 95:3438–3444, 1991.
- [52] I. Presiado, Y. Erez, and D. Huppert. Excited-state intermolecular proton transfer of firefly luciferin iii. proton transfer to a mild base. *J. Phys. Chem. A*, 114:13337–13346, 2010.
- [53] M. S. Baranov. Conformationally locked chromophores as models of excited-state proton transfer in fluorescent proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 134:6025–6032, 2012.
- [54] J. H. Clark, S. L. Shapiro, A. J. Campillo, and K. R. Winn. Picosecond studies of excited-state protonation and deprotonation kinetics. the laser pH jump. *J. Am. Chem. Soc.*, 101:746–748, 1979.
- [55] C. Alice. Excited-state proton-transfer processes of dhica resolved: from sub-picoseconds to nanoseconds. *J. Phys. Chem. Lett.*, 4:1383–1388, 2013.
- [56] M. Cerminara, L. A. Campos, R. Ramanathan, and V. Muñoz. Slow proton transfer coupled to unfolding explains the puzzling results of single-molecule experiments on bbl, a paradigmatic downhill folding protein. *PLoS one*, 8:e78044, 2013.
- [57] R. Chowdhury. Excited state proton transfer in the lysosome of live lung cells: normal and cancer cells. *J. Phys. Chem. B*, 2014.
- [58] D. D. Perrin, B. Dempsey, and E. P. Serjeant. *pKa prediction for organic acids and bases*. Chapman & Hall, 1981.
- [59] I. I. El Eger. Molecular properties of the idealinhaled anesthetic: studies of fluorinated methanes, ethanes, propanes, and butanes. *Anesth. Analg.*, 79:245–251, 1994.
- [60] B. P. Schoenborn and R. M. Featherstone. *Advances in pharmacology*. Academic Press, 1967.
- [61] Y. Boulanger, S. Schreier, and I. Smith. Molecular details of the anesthetic-lipid interaction as seen by deuterium and phosphorous-31 nmr. *Biochemistry*, 20:6824–6830, 1981.
-

-
- [62] C. J. Högberg, A. Maliniak, and A. P. Lyubartsev. Dynamical and structural properties of charged and uncharged lidocaine in a lipid bilayer. *Biophys. Chem.*, 125:416–424, 2007.
- [63] R. C. Bernardi. Molecular dynamics study of biomembrane/local anesthetics interactions. *Mol. Phys.*, 107:1437–1443, 2009.
- [64] C. J. Högberg and A. P. Lyubartsev. Effect of local anesthetic lidocaine on electrostatic properties of a lipid bilayer. *Biophysical Journal*, 94:525–531, 2008.
- [65] A. Avdeef, K. J. Box, J. E. A. Comer, C. Hibbert, and K. Y. Tam. pH-metric log₁₀ determination of liposomal membrane-water partition coefficients of ionizable drugs. *Pharm. Res.*, 15:209–215, 1998.
- [66] M. Rini, B. Z. Magnes, E. Pines, and E. T. J. Nibbering. Real-time observation of bimodal proton transfer in acid-base pairs in water. *Science*, 301:349–352, 2003.
- [67] T. Loerting and R. Klaus. Liedl. toward elimination of discrepancies between theory and experiment: double proton transfer in dimers of carboxylic acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:12595–12600, 1998.
- [68] A. Shibata, K. Ikawa, and H. Terada. Site of action of the local anesthetic tetracaine in a phosphatidylcholine bilayer with incorporated cardiolipin. *Biophys. J.*, 69:470–477, 1995.
- [69] J. G. Paiva, P. Paradiso, A. P. Serro, A. Fernandes, and B. Saramago. Interaction of local and general anaesthetics with liposomal membrane models: a qcm-d and dsc study. *Colloids Surf. B*, 95:65–74, 2012.
- [70] Bryan D. Jordan and Elizabeth Laura Wright. Xenon as an anesthetic agent. *AANNA J.*, 78:387–392, 2010.
- [71] Donald D. Koblin, Zexu Fang, Edmond I Eger II, Michael J. Laster, Diane Gong, Pompiliu Ionescu, Michael J. Halsey, and James R. Trudell. Minimum alveolar concentrations of noble gases, nitrogen, and sulfur hexafluoride in rats: Helium and neon as nonimmobilizers (nonanesthetics). *Anesth. Analg.*, 87:419–424, 1998.
- [72] J. C. Rostain and N. Balon. Recent neurochemical basis of inert gas narcosis and pressure effects. *Undersea and Hyperbaric Med.*, 33:197–204, 2006.
- [73] A. R. Behnke, R. M. Thomson, and E. P. Motley. The psychologic effects from breathing air at 4 atmospheres pressure. *Am. J. Physiol.*, 112:554–558, 1935.
- [74] N. P. Franks, R. Dickinson, S. L. M. de Sousa, A. C. Hall, and W. R. Lieb. How does xenon produce anaesthesia? *Nature*, 396:324, 1998.
-

- [75] Robert Dickinson, Brian K Peterson, Paul Banks, Constantinos Simillis, Juan Carlos Sacristan Martin, Carlos a Valenzuela, Mervyn Maze, and Nicholas P Franks. Competitive inhibition at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor by the anesthetics xenon and isoflurane: evidence from molecular modeling and electrophysiology. *Anesthesiology*, 107(5):756–767, 2007.
- [76] Andrew J. R. Plested, Scott S. Wildman, William R. Lieb, and Nicholas P Franks. Determinants of the sensitivity of ampa receptors to xenon. *Anesthesiology*, 100:347–358, 2004.
- [77] Stefan K. Georgiev, Hidemasa Furue, Hiroshi Baba, and Tatsuro Kohno. Xenon inhibits excitatory but not inhibitory transmission in rat spinal cord dorsal horn neurons. *Mol. Pain*, 6:1–11, 2010.
- [78] Elina Salmi, Ruut M. Laitio, Sargo Aalto, Anu T. Maksimow, Jaakko W. Långsjö, Kaike K. Kaisti, Riku Aantaa, Vesa Oikonen, Liisa Metsähonkala, Kjell Någren, and et al. Xenon does not affect gamma-aminobutyric acid type a receptor binding in humans. *Anesth. Analg.*, 106:129–134, 2008.
- [79] James R. Trudell, D. Koblin Donald, and Edmond I Eger II. A molecular description of how noble gases and nitrogen bind to a model site of anesthetic action. *Anesth. Analg.*, 87:411–418, 1998.
- [80] M. L. Quillin, W. A. Breyer, I. J. Griswold, and B. W. Matthews. Size versus polarizability in protein-ligand interactions: binding of noble gases within engineered cavities in phage t4 lysozyme. *J. Mol. Biol.*, 302:955–977, 2000.
- [81] Agnieszka Wlodarczyk, Paul F. McMillan, and Susan A. Greenfield. High pressure effects in anaesthesia and narcosis. *Chem. Soc. Rev.*, 35:890–898, 2006.
- [82] Robert W. Potter II and Michael A. Clynne. The solubility of the noble gases he, ne, ar, kr, and xe in water up to the critical point. *J. Solution Chem.*, 2:837–844, 1978.
- [83] George S. Kell. Density, thermal expansivity, and compressibility of liquid water from 0° to 150°c. correlations and tables for atmospheric pressure and saturation reviewed and expressed on 1968 temperature scale. *J. Chem. Phys.*, 20:97–105, 1975.
- [84] T. M. Miller. *Atomic and Molecular Polarizabilities*. CRC Press, Boca Raton, FL, 2000.
- [85] J. E. Lennard-Jones. Cohesion. *Proc. Phys. Soc.*, 43(240):461–482, 1931.
- [86] J D Dunitz. Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions. *Chemistry and Biology*, 2:709–712, 1995.
- [87] B. M. Axilrod. Triple-dipole interaction. i. theory. *J. Chem. Phys.*, 19:719–724, 1951.
-

-
- [88] Gianluca Marcelli and Richard J. Sadus. Molecular simulation of the phase behaviour of noble gases using accurate two-body and three-body intermolecular potentials. *J. Chem. Phys.*, 111:1533–1540, 1999.
- [89] Eiji Yamamoto, Takuma Akimoto, Hiroyuki Shimizu, Yoshinori Hirano, Masato Yasui, and Kenji Yasuoka. Diffusive nature of xenon anesthetic changes properties of a lipid bilayer: Molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B*, 116:8989–8995, 2012.
- [90] Yan Xu and Pei Tang. Amphiphilic sites for general anesthetic action? evidence from $^{129}\text{Xe}-\{^1\text{H}\}$ intermolecular nuclear overhauser effects. *Biochim. Biophys. Acta*, 1323:154–162, 1997.
- [91] F. H. Johnson and E. A. Flagler. Hydrostatic pressure reversal of narcosis in tadpoles. *Science*, 112:91–92, 1950.
- [92] M. J. Lever, K. W. Miller, W. D. M. Paton, and E. B. Smith. Pressure reversal of anaesthesia. *Nature*, 231:368–371, 1971.
- [93] K. W. Miller, W. D. M. Paton, R. A. Smith, and E. B. Smith. The pressure reversal of general anesthesia and the critical volume hypothesis. *Mol. Pharmacol.*, 9:131–143, 1973.
- [94] M. J. Halsey and B. Wardley-Smith. Pressure reversal of narcosis produced by anaesthetics, narcotics and tranquillisers pressure reversal of narcosis produced by anaesthetics, narcotics and tranquillisers. *Nature*, 257:811–813, 1975.
- [95] K. W. Miller. The opposing physiological effects of high pressures and inert gases. *Fed. Proc.*, 36(1):1663–1667, 1977.
- [96] D. Z. H. Levett and I. L. Millar. Bubble trouble: a review of diving physiology and disease. *Postgrad. Med. J.*, 84:571–578, 2008.
- [97] Dominic P D’Agostino, Denis G. Colomb Jr., and Jay B. Dean. Effects of hyperbaric gases on membrane nanostructure and function in neurons. *J. Appl. Physiol.*, 106:996–1003, 2009.
- [98] Michael Weinrich, Hirsh Nanda, David L. Worcester, Charles F. Majkrzak, Brian B. Maranville, and Bezrukov Sergey M. Halothane changes the domain structure of a binary lipid membrane. *Langmuir*, 28:4723–4728, 2012.
- [99] Richard P. Kennan and Gerald L. Pollack. Pressure dependence of the solubility of nitrogen, argon, krypton, and xenon in water. *J. Chem. Phys.*, 93:2724–2735, 1990.
- [100] A Lenzi, M Picardo, L Gandini, and F Dondero. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update*, 2(3):246–256, 1996.
-

-
- [101] Dejian Ren, Betsy Navarro, Gloria Perez, Alexander C Jackson, Shyuefang Hsu, Qing Shi, Jonathan L Tilly, and David E Clapham. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856):603–609, 2001.
- [102] Anthony A. Fodor, Sharona E. Gordon, and William N. Zagotta. Mechanism of tetracaine block of cyclic nucleotide-gated channels. *J. Gen. Physiol.*, 109:3–14, 1997.
- [103] Barbara L. Wood, Gustavo F. Doncel, Pingili R. Reddy, and David C. Sokal. Effect of diltiazem and methyleneblue on humansperm motility, viability and cervicalmucus penetration: potential use as vasirrigants at the time of vasectomy. *Contraception*, 67:241–245, 2003.
- [104] L. Wang, X. Wang, H. Sun, and B. Xu. Effects of inhalation anaesthetics on human sperm motility and vitality in vitro. *Br. J. Anaesth.*, 101:883–884., 2008.
- [105] R. Amelar, L. Dubin, and C. Schoenfeld. Sperm motility. *Fertil Steril*, 34:197–215, 1980.
- [106] D. Hoskins, D. Stephens, and M. Hall. Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and protein kinase levels in developing bovine spermatozoa. *Reprod.*, 37:131–133, 1974.
- [107] P. K. Schoff and H. A. Lardy. Effects of fluoride and caffeine on the metabolism and motility of ejaculated bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 37:1037–1046, 1987.
- [108] Toby M. Tamblyn and Neal L. First. Caffeine-stimulated atp-reactivated motility in a detergent-treated bovine sperm model. *Arch. Biochem. Biophys.*, 181:208–215, 1977.
- [109] C. Hong, D. Chaput de Saintonge, and P Turner. The inhibitory action of procaine, (+)-propranolol and (+)-propranolol on human sperm motility: antagonism by caffeine. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 12:751–753, 1981.
- [110] J. Zhang, T. Hadlock, A. Gent, and G. R. Strichartz. Tetracaine-membrane interactions: Effects of lipid composition and phase on drug partitioning, location, and ionization. *Biophys. J.*, 92:3988–4001, 2007.
- [111] F. J. Sierra-Valdez, A. J. Cisneros-Mejorado, D. P. Sánchez Herrera, and J. C. Ruiz-Suárez. A thermal study of cellular motility by optical time-resolved correlation. *Rev. Sci. Instrum.*, 83:044302–4, 2012.
- [112] H. Hauser and R. M. C. Dawson. The displacement of calcium ions from phospholipid monolayers by pharmacologically active and other organic bases. *Biochem. J.*, 109:909–916, 1968.
- [113] RA Van Gestel, IA Brewis, PR Ashton, JB Helms, JF Brouwers, and BM Gadella. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Molecular human reproduction*, 11(8):583–590, 2005.
-

- [114] W. K. Whitten. Nutritional requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. *Adv. Biosci.*, 6:129–139, 1971.
- [115] Ralf R. Henkel and Wolf-Bernhard Schill. Sperm preparation for art. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 1, 2003.
- [116] J. Krüger and W. B. Fischer. Exploring the conformational space of vpu from hiv-1: A versatile adaptable protein. *J. Comput. Chem.*, 29:2416–2424, 2008.
- [117] Rangana Sanjeewa and Samantha Weerasinghe. Development of a molecular mechanics force field for caffeine to investigate the interactions of caffeine in different solvent media. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 944:116–123, 2010.
- [118] M J Pringle, K B Brown, and K W Miller. Can the lipid theories of anesthesia account for the cutoff in anesthetic potency in homologous series of alcohols? *Molecular pharmacology*, 19(1):49–55, 1981.
- [119] a G Lee. Interactions between anesthetics and lipid mixtures. Normal alcohols. *Biochemistry*, 15(11):2448–2454, 1976.
- [120] Jang-Shing Chiou, Shao-Mu Ma, Hiroshi Kamaya, and Issaku Ueda. Anesthesia cutoff phenomenon: interfacial hydrogen bonding. *Science*, 248(4955):583–585, 1990.
- [121] R W Peoples, C Li, and F F Weight. Lipid vs protein theories of alcohol action in the nervous system. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 36:185–201, 1996.
- [122] Yi Zuo, Gary L Aistrup, William Marszalec, Alison Gillespie, Laura E Chavez-Noriega, Jay Z Yeh, and Toshio Narahashi. Dual action of n-alcohols on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Molecular pharmacology*, 60(4):700–711, 2001.
- [123] SUSAN C Wood, STUART A Forman, and KEITH W Miller. Short chain and long chain alkanols have different sites of action on nicotinic acetylcholine receptor channels from torpedo. *Molecular pharmacology*, 39(3):332–338, 1991.
- [124] Robert W Peoples and Forrest F Weight. Cutoff in potency implicates alcohol inhibition of n-methyl-d-aspartate receptors in alcohol intoxication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7):2825–2829, 1995.
- [125] David M Fraser, Sonia RW Louro, Laszlo I Horvath, Keith W Miller, and Anthony Watts. A study of the effect of general anesthetics on lipid-protein interactions in acetylcholine receptor-enriched membranes from torpedo nobiliana [as measured by] using nitroxide spin-labels. *Biochemistry*, 29(11):2664–2669, 1990.
- [126] Christopher D Stubbs and Emanuel Rubin. *Molecular mechanisms of ethanol and anesthetic actions: lipid-and protein-based theories*, pages 1–11. Springer, 1993.
-

-
- [127] Hans Brockerhoff, Jesmael Zingoni, and Susan Brockerhoff. Mechanism of anesthesia: Anesthetics may restructure the hydrogen belts of membranes. *Neurochemistry international*, 17(1):15–19, 1990.
- [128] C.W. Cotman, Ml Blank, a. Moehl, and F. Snyder. Lipid composition of synaptic plasma membranes isolated from rat brain by zonal centrifugation. *Biochemistry*, 8(11):4606–4612, 1969.
- [129] R a Harris, D M Baxter, M a Mitchell, and R J Hitzemann. Physical properties and lipid composition of brain membranes from ethanol tolerant-dependent mice. *Molecular pharmacology*, 25(3):401–409, 1984.
- [130] Michael Edidin. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 32(1):257–283, 2003.
- [131] Linda J Pike. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of lipid research*, 47(7):1597–1598, 2006.
- [132] Ünal Coskun and Kai Simons. Cell membranes: the lipid perspective. *Structure*, 19(11):1543–1548, 2011.
- [133] J F Blazyk and J M Steim. Phase transitions in mammalian membranes. *Biochimica et biophysica acta*, 266(3):737–741, 1972.
- [134] Charles R Hackenbrock, Matthias Höchli, and Raymond M Chau. Calorimetric and freeze fracture analysis of lipid phase transitions and lateral translational motion of intramembrane particles in mitochondrial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 455(2):466–484, 1976.
- [135] John F Blazyk and Jerry L Newman. Calorimetric studies of lipid phase transitions in native and heat-denatured membranes of beef heart submitochondrial particles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 600(3):1007–1011, 1980.
- [136] Alexander Asanov, Angélica Zepeda, and Luis Vaca. A novel form of Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (LG-TIRFM) reveals different and independent lipid raft domains in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(2):147–155, 2010.
- [137] Jin-ichi Inokuchi, Masakazu Nagafuku, Isao Ohno, and Akemi Suzuki. Heterogeneity of gangliosides among T cell subsets. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(17):3067–3075, 2013.
- [138] Sung-Tae Yang, Volker Kiessling, James a Simmons, Judith M White, and Lukas K Tamm. HIV gp41-mediated membrane fusion occurs at edges of cholesterol-rich lipid domains. *Nature Chemical Biology*, 11(6):424–431, 2015.
-

-
- [139] Maria Kaparakis-Liaskos and Richard L. Ferrero. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews Immunology*, 15(6):375–387, 2015.
- [140] Ubaldo E. Martinez-Outschoorn, Federica Sotgia, and Michael P. Lisanti. Caveolae and signalling in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(4):225–237, 2015.
- [141] Gilbert Di Paolo and Tae-Wan Kim. Linking lipids to Alzheimer’s disease: cholesterol and beyond. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(5):284–296, 2011.
- [142] Ludger Johannes, Robert G Parton, Patricia Bassereau, and Satyajit Mayor. Building endocytic pits without clathrin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(5):311–321, 2015.
- [143] Jelena Dinic, Astrid Riehl, Jeremy Adler, and Ingela Parmryd. The T cell receptor resides in ordered plasma membrane nanodomains that aggregate upon patching of the receptor. *Scientific Reports*, 5(November 2014):10082, 2015.
- [144] John A Allen, Robyn A Halverson-Tamboli, and Mark M Rasenick. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(2):128–140, 2007.
- [145] Daniel Lingwood and Kai Simons. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5961):46–50, 2010.
- [146] B. W. Urban. The site of anesthetic action. In Schwilden Helmut Schüttler Jürgen, editor, *Modern Anesthetics*, volume 182, chapter 1, pages 3–29. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008.
- [147] Michael Weinrich and David L Worcester. Xenon and Other Volatile Anesthetics Change Domain Structure in Model Lipid Raft Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(50):16141–16147, 2013.
- [148] Kotoe Kamata, Sumie Manno, Makoto Ozaki, and Yuichi Takakuwa. Functional evidence for presence of lipid rafts in erythrocyte membranes: Gs α in rafts is essential for signal transduction. *American journal of hematology*, 83(5):371–375, 2008.
- [149] Shintaro Besshoh, Damanpreet Bawa, Lucy Teves, M. Christopher Wallace, and James W. Gurd. 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*, 93(1):186–194, 2005.
- [150] Xuejing Li, David R Serwanski, Celia P Miralles, Ben A Bahr, and Angel L De Blas. Two pools of Triton X-100-insoluble GABA_A receptors are present in the brain, one associated to lipid rafts and another one to the post-synaptic GABAergic complex. *Journal of neurochemistry*, 102(4):1329–1345, 2007.
-

-
- [151] R N McElhaney. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chemistry and physics of lipids*, 30(2-3):229–259, 1982.
- [152] John E. Parks and Daniel V. Lynch. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29(2):255–266, 1992.
- [153] J. F. Brandts, L. Erickson, and K. Lysko. Calorimetric studies of the structural transitions of the human erythrocyte membrane. The involvement of spectrin in the A transition. *Biochemistry*, pages 3450–3454, 1977.
- [154] Carol J Livingstone and David Schachter. Lipid dynamics and lipid-protein interactions in rat hepatocyte plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 255(22):10902–10908, 1980.
- [155] Cynthia D K Bottema, Colleen A McLean-Bowen, and Leo W Parks. Role of sterol structure in the thermotropic behavior of plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 734(2):235–248, 1983.
- [156] Ping Chen, Xuanwen Li, Yalan Sun, Zhen Liu, Rui Cao, Quanyuan He, Meichi Wang, Jixian Xiong, Jinyun Xie, Xianchun Wang, and Songping Liang. Proteomic analysis of rat hippocampal plasma membrane: Characterization of potential neuronal-specific plasma membrane proteins. *Journal of Neurochemistry*, 98(4):1126–1140, 2006.
- [157] Richard K Carlin, Dennis J Grab, Rochelle S Cohen, and Philip Siekevitz. Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *The Journal of cell biology*, 86(3):831–845, 1980.
- [158] Ilse Delint-Ramirez, Debbie Willoughby, Gerald V R Hammond, Laura J Ayling, and Dermot M F Cooper. Palmitoylation targets AKAP79 protein to lipid rafts and promotes its regulation of calcium-sensitive adenylyl cyclase type 8. *Journal of Biological Chemistry*, 286(38):32962–32975, 2011.
- [159] Geoffrey D Bothun, Barbara L Knutson, Herbert J Strobel, and Sue E Nokes. Liposome fluidization and melting point depression by pressurized CO₂ determined by fluorescence anisotropy. *Langmuir*, 21(2):530–536, 2005.
- [160] Andreas Blicher, Katarzyna Wodzinska, Matthias Fidorra, Mathias Winterhalter, and Thomas Heimburg. The temperature dependence of lipid membrane permeability, its quantized nature, and the influence of anesthetics. *Biophysical Journal*, 96(11):4581–4591, 2009.
- [161] Ilse Delint-Ramirez, Esperanza Fernández, Alex Bayés, Emese Kicsi, Noboru H Komiyama, and Seth G N Grant. In vivo composition of NMDA receptor signaling complexes
-

- differs between membrane subdomains and is modulated by PSD-95 and PSD-93. *The Journal of Neuroscience*, 30(24):8162–8170, 2010.
- [162] Ping Li and Gustav Akk. Synaptic-Type $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABA_A Receptors Produce Large Persistent Currents in the Presence of Ambient GABA and Anesthetic Drugs. *Molecular pharmacology*, 87(5):776–781, 2015.
- [163] Yuki Sato, Eiji Kobayashi, Takanori Murayama, Masayoshi Mishina, and Norimasa Seo. Effect of N-methyl-D-aspartate receptor epsilon1 subunit gene disruption of the action of general anesthetic drugs in mice. *Anesthesiology*, 102(3):557–561, 2005.
- [164] Andrey B. Petrenko, Tomohiro Yamakura, Kenji Sakimura, and Hiroshi Baba. Defining the role of nmda receptors in anesthesia: are we there yet? *European Journal of Pharmacology*, 723(1):29–37, 2014.
- [165] W D Sweet, W G Wood, and F Schroeder. Charged anesthetics selectively alter plasma membrane order. *Biochemistry*, 26(10):2828–2835, 1987.
- [166] R a Harris and F Schroeder. Ethanol and the physical properties of brain membranes: fluorescence studies. *Molecular pharmacology*, 20(1):128–137, 1981.
- [167] Franciska Könczöl, Nelli Farkas, Tímea Dergez, J. Belágyi, and D. Lőrinczy. Effect of tetracaine on model and erythrocyte membranes by DSC and EPR. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 82(1):201–206, 2005.
- [168] Christa Trandum, Peter Westh, Kent Jø rgensen, and Ole G. Mouritsen. Association of ethanol with lipid membranes containing cholesterol, sphingomyelin and ganglioside: A titration calorimetry study. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1420(1-2):179–188, 1999.
- [169] Benjamin B. Machta, Stefanos Papanikolaou, James P Sethna, and Sarah L. Veatch. Minimal model of plasma membrane heterogeneity requires coupling cortical actin to criticality. *Biophysical Journal*, 100(7):1668–1677, 2011.
- [170] Jiang Zhao, Jing Wu, and Sarah L Veatch. Adhesion stabilizes robust lipid heterogeneity in supercritical membranes at physiological temperature. *Biophysical journal*, 104(4):825–834, 2013.
- [171] Ellyn Gray, Joshua Karlake, Benjamin B. Machta, and Sarah L. Veatch. Liquid general anesthetics lower critical temperatures in plasma membrane vesicles. *Biophysical Journal*, 105(12):2751–2759, 2013.
- [172] Marianne L Renner, Laurent Cognet, Brahim Lounis, Antoine Triller, and Daniel Choquet. The excitatory postsynaptic density is a size exclusion diffusion environment. *Neuropharmacology*, 56(1):30–36, 2009.
-

-
- [173] Tatsuo Suzuki, Jin-ichi Ito, Hiroshi Takagi, Fuminori Saitoh, Hiroyuki Nawa, and Hideo Shimizu. Biochemical evidence for localization of AMPA-type glutamate receptor subunits in the dendritic raft. *Molecular brain research*, 89(1):20–28, 2001.
- [174] Shintaro Besshoh, Sheng Chen, Ian R Brown, and James W Gurd. Developmental changes in the association of NMDA receptors with lipid rafts. *Journal of neuroscience research*, 85(9):1876–1883, 2007.
- [175] Ilse Delint-Ramírez, Pamela Salcedo-Tello, and Federico Bermudez-Rattoni. Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts. *Journal of neurochemistry*, 106(4):1658–1668, 2008.
- [176] Debika Chatterjea, Edaeni Hamid, John P Leonard, and Simon Alford. Phosphorylation-state-dependent regulation of NMDA receptor short-term plasticity modifies hippocampal dendritic Ca^{+2} transients. *Journal of neurophysiology*, 104(4):2203–2213, 2010.
- [177] Carmine Guirland, Shingo Suzuki, Masami Kojima, Bai Lu, and James Q Zheng. Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron*, 42(1):51–62, 2004.
- [178] Jovita Ponce, Natalia Pérez de la Ossa, Olivia Hurtado, Mónica Millan, Juan F Arenillas, Antonio Dávalos, and Teresa Gasull. Simvastatin reduces the association of nmda receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. *Stroke*, 39(4):1269–1275, 2008.
- [179] ROBERT L MacDonald, CARL J Rogers, and R E Twyman. Barbiturate regulation of kinetic properties of the $GABA_A$ receptor channel of mouse spinal neurones in culture. *The Journal of physiology*, 417(1):483–500, 1989.
- [180] Caroline Nothdurfter, Sascha Tanasic, Barbara Di Benedetto, Manfred Uhr, Eva-Maria Wagner, Kate E Gilling, Chris G Parsons, Theo Rein, Florian Holsboer, and Rainer Rupprecht. Lipid raft integrity affects $GABA_A$ receptor, but not NMDA receptor modulation by psychopharmacological compounds. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(6):1361–1371, 2013.
- [181] Ana M Sebastião, Natália Assaife-Lopes, Maria J Diógenes, Sandra H Vaz, and Joaquim A Ribeiro. Modulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) actions in the nervous system by adenosine A_{2A} receptors and the role of lipid rafts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(5):1340–1349, 2011.
- [182] Liya Yang and James M Sonner. Anesthetic-like modulation of receptor function by surfactants: a test of the interfacial theory of anesthesia. *Anesthesia and Analgesia*, 107(3):868, 2008.
-

- [183] Ruthven N. A. H. Lewis and Ronald N. McElhaney. The physicochemical properties of cardiolipin bilayers and cardiolipin-containing lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(10):2069–2079, 2009.
- [184] C. B. Marta, C. M. Taylor, T. Coetzee, T. Kim, S. Winkler, R. Bansal, and S. E. Pfeiffer. Antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein leads to its rapid repartitioning into detergent-insoluble fractions, and altered protein phosphorylation and cell morphology. *The Journal of neuroscience*, 23(13):5461–5471, 2003.
-