



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Monterrey

**Estudio termodinámico de la combinación  
de anestésicos en membranas de lípidos**

Tesis que presenta:

**Carol Stefany Vélez Saboyá**

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias  
en Ingeniería y Física Biomédicas**

Directores de Tesis:

Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez,  
Dr. Francisco Javier Sierra Valdez

Apodaca, Nuevo León, México

Agosto, 2017

# Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para realizar mis estudios de maestría. A mis asesores, los Dres. Carlos Ruiz y Francisco Sierra por brindarme su apoyo incondicional, compartir sus experiencias profesionales y conocimientos, además, por su paciencia a lo largo del proceso. A mis sinodales, los Dres. Moisés Santillán y Daniel Sánchez por los comentarios y explicaciones. A mis amigos y compañeros de laboratorio. A mi familia, especialmente a mis amados padres por apoyarme incondicionalmente a pesar de la distancia y por ser fuente de motivación. A mi novio por llenar de felicidad todos estos momentos, por su ayuda y paciencia.

# Índice General

<b>Índice General</b>	<b>I</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>III</b>
<b>Resumen</b>	<b>VI</b>
<b>Abstract</b>	<b>VII</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Anestesia . . . . .	1
1.2. Anestesia local . . . . .	6
1.2.1. Características generales de la anestesia local . . . . .	7
1.3. Interacción anestésico-membrana . . . . .	9
1.4. Termodinámica de membranas . . . . .	11
<b>2. Antecedentes</b>	<b>17</b>
2.1. Difusión de anestésicos en membranas lipídicas . . . . .	17
<b>3. Hipótesis y Objetivos</b>	<b>21</b>
3.1. Hipótesis . . . . .	21
3.2. Objetivos . . . . .	21
3.2.1. Objetivo General . . . . .	21
3.2.2. Objetivos Particulares . . . . .	21
<b>4. Metodología</b>	<b>23</b>
4.1. Materiales y métodos . . . . .	23
4.1.1. Reactivos . . . . .	23
4.1.2. Preparación de liposomas . . . . .	25
4.1.3. Protocolo de preparación de MLVs . . . . .	26
4.1.4. Preparación de muestra y referencia . . . . .	26
4.2. Técnicas de análisis . . . . .	27
4.3. Grupos experimentales . . . . .	28
4.3.1. Efectos de anestésicos locales en membranas lipídicas . . . . .	28
4.3.2. Efecto de la combinación de anestésicos en membranas lipídicas . . . . .	29
4.3.3. Difusión de anestésicos en membranas de lípidos con calcio . . . . .	29
4.4. Análisis de datos . . . . .	30

<b>5. Resultados</b>	<b>31</b>
5.1. Efectos de anestésicos locales en membranas lipídicas . . . . .	32
5.2. Efecto de la combinación de anestésicos en membranas lipídicas . . . . .	33
5.3. Efecto de la combinación de anestésico general y local con membranas de lípidos . . . . .	42
5.4. Difusión de anestésicos en membranas de lípidos con calcio . . . . .	45
<b>6. Discusión</b>	<b>49</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>56</b>
7.1. Perspectivas . . . . .	57
<b>Bibliografía</b>	<b>58</b>

# Índice de Figuras

1.1.	Correlación de la regla de Meyer-Overton. El coeficiente de partición es inversamente proporcional a la dosis efectiva del anestésico [ED <sub>50</sub> ]. Datos adaptados de Overton [5] para anestésicos volátiles en el ser humano. . . . .	3
1.2.	Presión lateral a través de la membrana. Parte inferior, izquierda: Una proteína de membrana puede experimentar diferentes presiones laterales (indicadas con flechas) a diferentes profundidades en la membrana. Parte inferior, derecha: Presión lateral calculada en función de la posición z en la membrana. Arriba, a la izquierda: Imagen esquemática de cómo la presión lateral puede influir en el equilibrio de dos conformaciones de una proteína. Modificado de [11]. . . . .	4
1.3.	Representación de la hipótesis para la reducción de la proteína total asociada a las balsas lipídicas [20]. . . . .	5
1.4.	Diversidad de especies químicas de anestésicos [21]. . . . .	6
1.5.	Año de introducción de varios anestésicos locales en la práctica clínica. Modificado de [23]. . . . .	7
1.6.	Principales propiedades farmacológicas de los anestésicos locales. Modificado de [29]. . . . .	9
1.7.	Izquierda: Lípido monomérico que muestra el grupo de cabeza y cadenas hidrocarburo. Centro: Micelas lipídicas. Derecha: Bicapa lipídica que consta de dos monocapas opuestas [11]. . . . .	11
1.8.	Cuadro esquemático de la transición de fase de lípidos de fase sólido-ordenado a fase líquido desordenado. Arriba: Se pierde el orden de las cadenas de lípidos tras la transición de fase. Abajo: El orden cristalino de los grupos de las cabezas lipídicas también se pierde [11]. . . . .	13
1.9.	Perfil calorimétrico ideal de DMPC [11]. . . . .	14
1.10.	Perfil calorimétrico ideal de DPPC. Arriba: perfil calorimétrico de datos en crudo. Abajo: perfil calorimétrico procesado restando la línea base. El área bajo la curva (entalpía) representativa se calculada a partir de la ecuación 1.6. . . .	16
2.1.	Perfiles calorimétricos de MLVs y LUVs bajo la influencia de anestésicos generales. Perfiles calorimétricos de: a) xenón (curva roja) y óxido nitroso (curva azul) en MLV, b) propofol (curva azul) pentobarbital (curva roja) en MLV, c) xenón y óxido nitroso en LUV y d) propofol y pentobarbital en LUV [35]. . . . .	18
2.2.	Perfiles calorimétricos bajo la influencia de tetracaína 25 mM. Izquierda: control MLV; derecha: primer, quinto y décimo barrido térmico para MLV con tetracaína; y derecha: primer barrido térmico LUV con tetracaína. Modificada de [35]. . . . .	19

2.3. Cinética de difusión de tetracaína modulada por diferentes ácidos carboxílicos. a) primeros barridos térmicos para H <sub>2</sub> O (agua), A (ácido málico), B (ácido cítrico), C (ácido fórmico) y D (ácido glicólico). b) Entalpías de H <sub>1</sub> y H <sub>2</sub> como función del tiempo. c) Coeficiente de difusión obtenido a partir del mejor ajuste al modelo de difusión [35]. . . . .	20
4.1. Estructura química del DPPC. . . . .	24
4.2. Composición del grupo de cabeza de las membranas de algunas células de hígado de mamífero, eritrocitos y células nerviosas en porcentaje de peso. Adaptado de Jamieson y Robinson (1977). Abreviaturas: PC = fosfatidilcolinas, PE = fosfatidiletanolaminas, PS = fosfatidilserinas, PI = fosfatidilinositoles, SM = esfingomielina, CL = cardioplipina. [37]. . . . .	24
4.3. Estructura química de algunos anestésicos locales. . . . .	25
4.4. Perfil calorimétrico de liposomas MLVs de DDPC bajo la influencia de prilocaína hidrociorada 35mM y lidocaína hidrociorada 79mM. Curva azul: adición de prilocaína seguido de lidocaína. Curva roja: adición de lidocaína seguido de prilocaína. . . . .	27
4.5. Microcalorímetro NanoDSC, TA Instruments. Derecha. Celdas del calorímetro y principio del funcionamiento. . . . .	29
5.1. Perfil calorimétrico de liposomas MLVs de DPPC . . . . .	32
5.2. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de anestésicos locales. La concentración utilizada para todos los anestésicos fue de 50 mM. Las curvas fueron normalizadas. . . . .	34
5.3. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de mepivacaína, tetracaína y mepivacaína-tetracaína. . . . .	35
5.4. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de la combinación tetracaína-mepivacaína. La concentración de la tetracaína permanece fija (25 mM) y se realiza un barrido de concentración de mepivacaína. . . . .	36
5.5. Cinética de difusión. Cambio de entalpía en función del tiempo. Secuencia de 30 perfiles calorimétricos de la cinética de difusión de tetracaína-mepivacaína ante una concentración fija de tetracaína (25 mM) y un diferentes concentraciones de mepivacaína. Las curvas superiores corresponden a la entalpía del pico izquierdo de los perfiles calorimétricos y las curvas inferiores al pico derecho. . . . .	37
5.6. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de la combinación tetracaína-lidocaína. La concentración de la tetracaína permanece fija (25 mM) y se realizó un barrido de concentración de lidocaína. . . . .	38
5.7. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de la combinación tetracaína-lidocaína. La concentración de la lidocaína permanece fija (69 mM) y se realizó un barrido de concentración de tetracaína. . . . .	38

5.8. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de la combinación lidocaína-prilocaína. La concentración de la lidocaína permanece fija (69 mM) y se realizó un barrido de concentración de prilocaína. . . . .	39
5.9. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de la combinación lidocaína-prilocaína. La concentración de la prilocaína permanece fija (79 mM) y se realizó un barrido de concentración de lidocaína. . . . .	40
5.10. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de la combinación tetracaína-procaína. La concentración de la tetracaína permanece fija (25 mM) y se realizó un barrido de concentración de procaína. . . . .	41
5.11. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de la combinación tetracaína-procaína. La concentración de la procaína permanece fija (73 mM) y se realizó un barrido de concentraciones de prilocaína. . . . .	41
5.12. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de pentobarbital, lidocaína y pentobarbital-lidocaína. . . . .	43
5.13. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de pentobarbital, procaína y pentobarbital-procaína. . . . .	44
5.14. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de pentobarbital-lidocaína, pentobarbital-procaína y pentobarbital-tetracaína. . . .	44
5.15. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC con calcio 10 mM. . . . .	46
5.16. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC con calcio 10 mM bajo la influencia de tetracaína 25 mM en función del tiempo. La curva celeste corresponde al perfil calorimétrico obtenido al realizar un segundo barrido de medición. . . . .	47
5.17. Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC con y sin calcio 10 mM bajo la influencia de pentobarbital 5 mM más tetracaína 25 mM. . . . .	48

## **Estudio termodinámico de la combinación de anestésicos en membranas de lípidos**

La anestesia es uno de los enigmas de la farmacología actual y aunque se emplea millones de veces cada día, no se conocen los mecanismos de acción en su totalidad. Desde su descubrimiento, han surgido diversas teorías sobre el sitio de acción de los fármacos, siendo las más importantes: la teoría de lípidos, la teoría de proteínas y la teoría de lípido-proteína. En la práctica clínica es común encontrar combinaciones de anestésicos locales para mejorar los resultados de la anestesia según la finalidad clínica, estas combinaciones se basan en las características reportadas de forma empírica de cada anestésico. Debido a que la difusión de estas moléculas es una propiedad fundamental que determina en gran medida el uso clínico, se realizó un estudio termodinámico de la difusión de combinaciones de anestésicos locales en membranas modelo por medio de la técnica de 'calorimetría diferencial de barrido' (DSC, por sus siglas en inglés). Los resultados permitieron observar que los anestésicos locales al interactuar con la membrana de lípidos inducen una depresión en su temperatura de transición de fase, relacionando a su vez dicha depresión con la potencia del anestésico. Al realizar mezclas de anestésicos locales dejando la concentración de un anestésico fija y haciendo un barrido de concentraciones del segundo anestésico, se observó que el efecto total de la combinación de anestésicos así como la velocidad de difusión están reguladas por la entropía (desorden) producidas por dicha mezcla. Además, puesto que el calcio está relacionado con el proceso de inflamación en donde los anestésicos disminuyen su eficacia, se realizó un estudio de la influencia del calcio en la interacción anestésico-membrana y su difusión. Los resultados obtenidos muestran que el calcio reduce el efecto en la temperatura de transición de fase producida por los anestésicos.



# Abstract

## **Thermodynamic study of anesthetics combinations in lipid membranes**

Anesthesia is one of the enigmas of the current pharmacology and although it is used million times a day, the action mechanisms are not fully known. Since its discovery, several theories have arisen about the action mechanisms of such drugs, being the most important: the lipids theory, the proteins theory and the lipid-protein theory. In clinic practice is common to find local anesthetics combinations to improve the anesthetic effects according to the clinic purpose wanted, these combinations are based on empirically reported characteristics of each anesthetic. Due to the fact that diffusion of these molecules is a fundamental property that determines clinic use in a large degree, a thermodynamical study of the diffusion of local anesthetics combinations in model membranes through differential scanning calorimetry (DSC) was made. The results allowed us to observe that the interaction of local anesthetics with a lipid membrane, induces a decrease in its phase transition temperature, relating such decrease to the potency of the anesthetic. When local anesthetic combinations were made leaving the concentration of one anesthetic fixed and varying the concentrations of the second anesthetic, it was observed that the total effect of the anesthetics combination, as well as the diffusion rate, are regulated by the entropy (disorder) produced by such combination. Furthermore, given that calcium is related to the inflammatory process where anesthetics reduce their effectiveness, a study of calcium influence in anesthetic-membrane interaction and its diffusion was made. The obtained results show that calcium reduces the effect in the phase transition temperature produced by the anesthetics.

# 1

## Introducción

### 1.1 Anestesia

La anestesia es uno de los grandes avances de la medicina, en la actualidad se utiliza para diversos procedimientos médicos como: intervenciones quirúrgicas, tratamiento para el dolor, procedimientos médicos en el área de radiología, resonancia magnética nuclear, entre otros. Sin embargo, a pesar de usarse millones de veces cada día [1] [2], no se conoce el mecanismo de acción de la anestesia y continúa siendo uno de los enigmas de la farmacología actual [3].

El término de anestesia fue acuñado por el Dr. Wendell Holmes en 1846 y se remite a las raíces griegas *an*, que significa sin, y *estesia*, sensibilidad. La anestesia es el bloqueo temporal de la sensibilidad táctil y dolorosa de una parte del cuerpo o su totalidad, con (anestesia general) o sin (anestesia local) compromiso de conciencia, debido a la acción de un fármaco al que se denomina anestésico. Los anestésicos interactúan con la membrana

celular y esto conlleva a que se impida o propague el impulso nervioso, que es el proceso por el cual se comunican las células nerviosas y musculares, mientras que la anestesia es quien inhibe esa comunicación. La anestesia se introdujo en la práctica clínica poco después del descubrimiento de los primeros anestésicos en el siglo XIX, a partir de esto en el último siglo se han descubierto una amplia variedad de sustancias químicas que pueden producir anestesia.

Después del descubrimiento de los primeros anestésicos surgieron diversas teorías para explicar el mecanismo de acción de los mismos, las cuales se encuentran divididas en cuanto al tipo de mecanismo de acción: específico o no específico; otras por su parte, sugieren una combinación de éstos. Estas teorías proponen que los principales sitios de acción de los anestésicos son los lípidos y las proteínas, sin embargo, algunos autores consideran la intervención de estos dos componentes. Las principales teorías son:

**Teoría de lípidos.** Los trabajos de Meyer [4] y Overton [5] concluyeron con la regla de Meyer-Overton en 1901. Esta regla propone como blanco de acción a los lípidos y sugiere que la potencia de la anestesia es independiente de la naturaleza molecular de los anestésicos sino directamente proporcional al coeficiente de partición (parámetro relacionado con la liposolubilidad) del anestésico, donde la dosis efectiva  $50$  multiplicada por el coeficiente de partición es constante [6]; esto se puede observar en la figura 1.1. Esta teoría atribuye la acción anestésica a la afinidad de los anestésicos por los lípidos, ya que los anestésicos se disuelven en los lípidos de la membrana y afectan la expansión del volumen y la fluidización de la membrana, basado en el principio de acción termodinámica de Ferguson [7]. El modelo sugiere que la acción de los anestésicos es de carácter inespecífico.

Recientemente Heimburg y Jackson [8] [9] propusieron la relación del efecto anestésico con la modificación del equilibrio de la energía libre. La modificación de la energía libre puede ocurrir cuando varía la temperatura, la presión, el pH y las concentraciones de soluto y sales. Además los autores proponen que al recuperar el equilibrio de la energía libre se

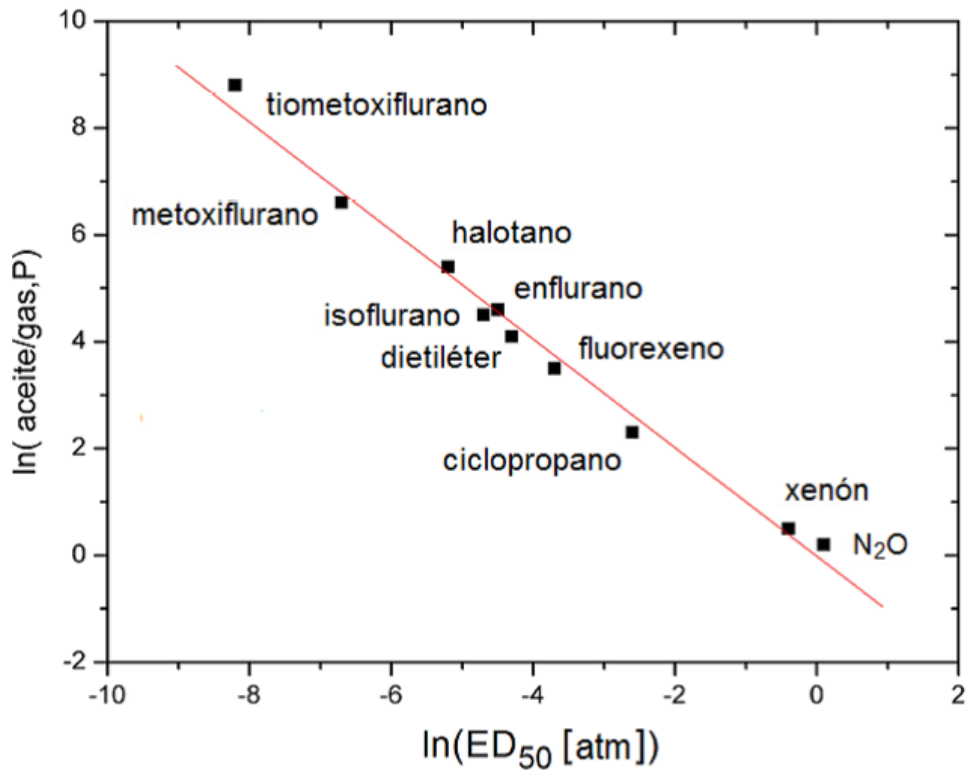


Figura 1.1: Correlación de la regla de Meyer-Overton. El coeficiente de partición es inversamente proporcional a la dosis efectiva del anestésico  $[ED_{50}]$ . Datos adaptados de Overton [5] para anestésicos volátiles en el ser humano.

puede revertir el efecto anestésico.

**Teoría de proteínas.** Es el modelo aceptado actualmente sobre la acción de anestésicos, se basa en el principio ligando-receptor o llave-cerradura en el cual los anestésicos (ligando) interactúan de forma específica con un receptor acoplado a una proteína. Esto conlleva a la apertura o cierre de canales iónicos que posteriormente inhiben la generación del impulso nervioso al promover la hiperpolarización de la célula. Surgió por estudios que demuestran que los anestésicos pueden actuar uniéndose a los dominios hidrófobos de proteínas de la membrana, pero todavía no se ha identificado la naturaleza de las proteínas blanco. Los receptores asociados con la anestesia son el receptor de glicina, 5-hidroxitriptamina, receptores nicotínicos, receptor N-metil-D-aspartato y el receptor GABA [10].

**Lípido-proteína.** Se basa en las características liposolubles de los anestésicos, estos permean la membrana e interactúan con las colas hidrofóbicas de los lípidos. Esto produce cambios estructurales y de presión lateral de la membrana, desplazando el equilibrio conformacional de algunas proteínas e impidiendo que estas funcionen adecuadamente [11]. En la figura 1.2 podemos observar el cambio en la estructura de una proteína.

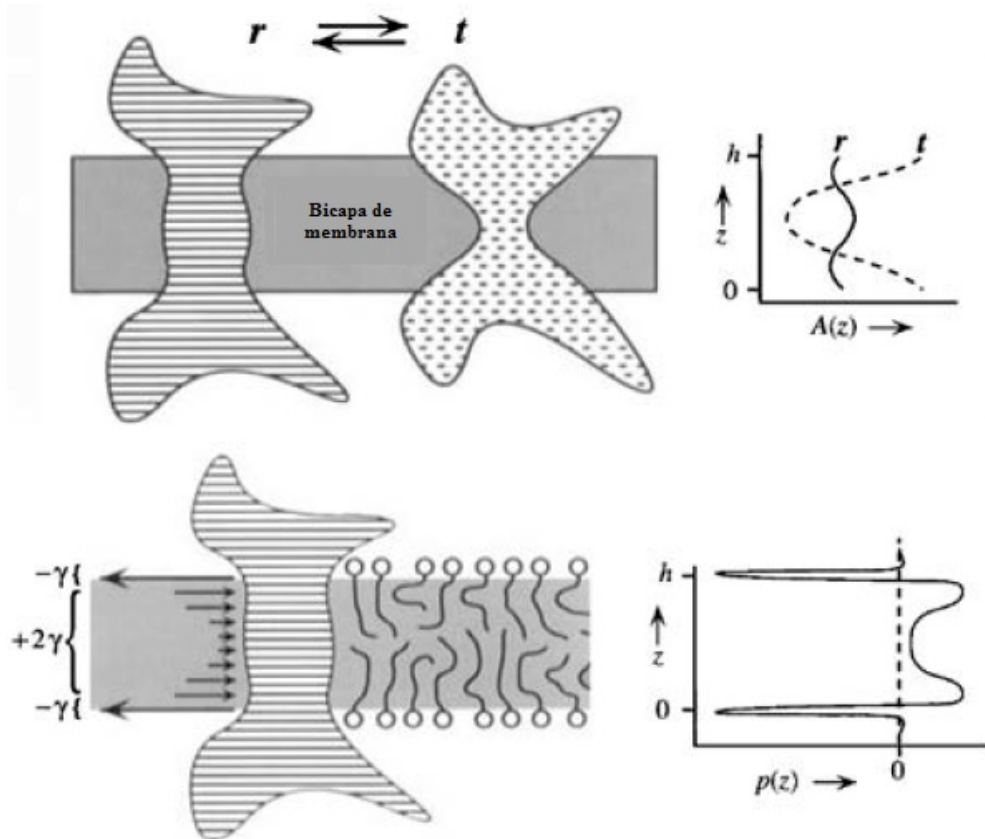


Figura 1.2: Presión lateral a través de la membrana. Parte inferior, izquierda: Una proteína de membrana puede experimentar diferentes presiones laterales (indicadas con flechas) a diferentes profundidades en la membrana. Parte inferior, derecha: Presión lateral calculada en función de la posición  $z$  en la membrana. Arriba, a la izquierda: Imagen esquemática de cómo la presión lateral puede influir en el equilibrio de dos conformaciones de una proteína. Modificado de [11].

Otro modelo, en el cual se ha inclinado nuestro laboratorio, se enfoca en las balsas lipídicas como sitios mediadores de la acción anestésica en proteínas. Las balsas de lípidos

son pequeños dominios de membrana (10-200 nm), heterogéneos, y altamente dinámicos, enriquecidos con esteroides y esfingolípidos capaces de compartimentalizar la distribución espacial de los receptores y sus efectores próximos en la membrana. Están asociadas a un gran número de funciones celulares [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18], debido a la gran afinidad de algunas proteínas a estos microdominios, facilitando la activación de vías de señalización [19]. Los anestésicos permean la membrana e interactúan con las colas de los fosfolípidos cambiando las propiedades estructurales de la membrana y esto a su vez altera la asociación natural de las proteínas involucradas en el impulso nervioso a estos dominios lipídicos. Trabajo previo en nuestro laboratorio demostró que durante la anestesia con pentobarbital, la cantidad total de proteína asociada a balsa de lípidos es reducida significativamente. Particularmente, se demostró que hay una reducción significativa en la asociación de los receptores NMDA y GABAA, considerados los principales sitios de acción del pentobarbital [20]. La ilustración de la figura 1.3 muestra el efecto sugerido por este modelo.

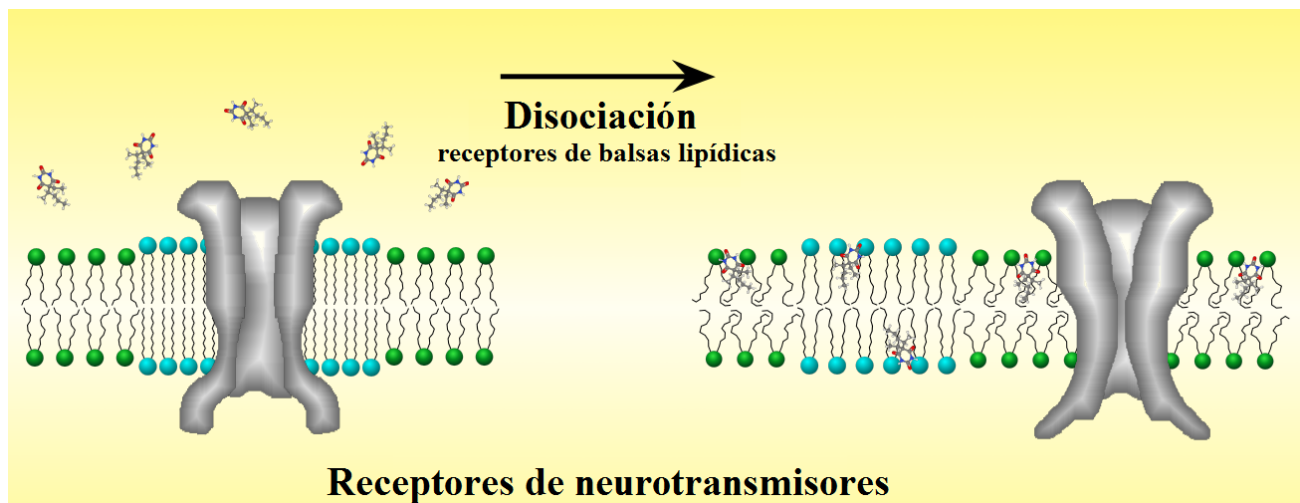


Figura 1.3: Representación de la hipótesis para la reducción de la proteína total asociada a las balsas lipídicas [20].

A pesar de la gran variedad de teorías que han surgido para explicar el mecanismo de acción de la anestesia, esto continúa siendo un misterio. La dificultad en encontrar un meca-

nismo de acción de la anestesia radica en que los anestésicos no comparten características comunes a nivel químico (no hay un patrón molecular), físico o farmacológico. Existen anestésicos de tipo alcanos, alcoholes, benzodiazepinas, ésteres, amidas, fenoles, éteres y hasta gases nobles. Un ejemplo de la variedad estructural de los anestésicos se puede observar en la figura 1.4. Debido a la diversidad en las características de los anestésicos es muy poco probable que exista un único receptor, sin embargo, se sabe que el sitio de acción de los anestésicos es hidrófobo.

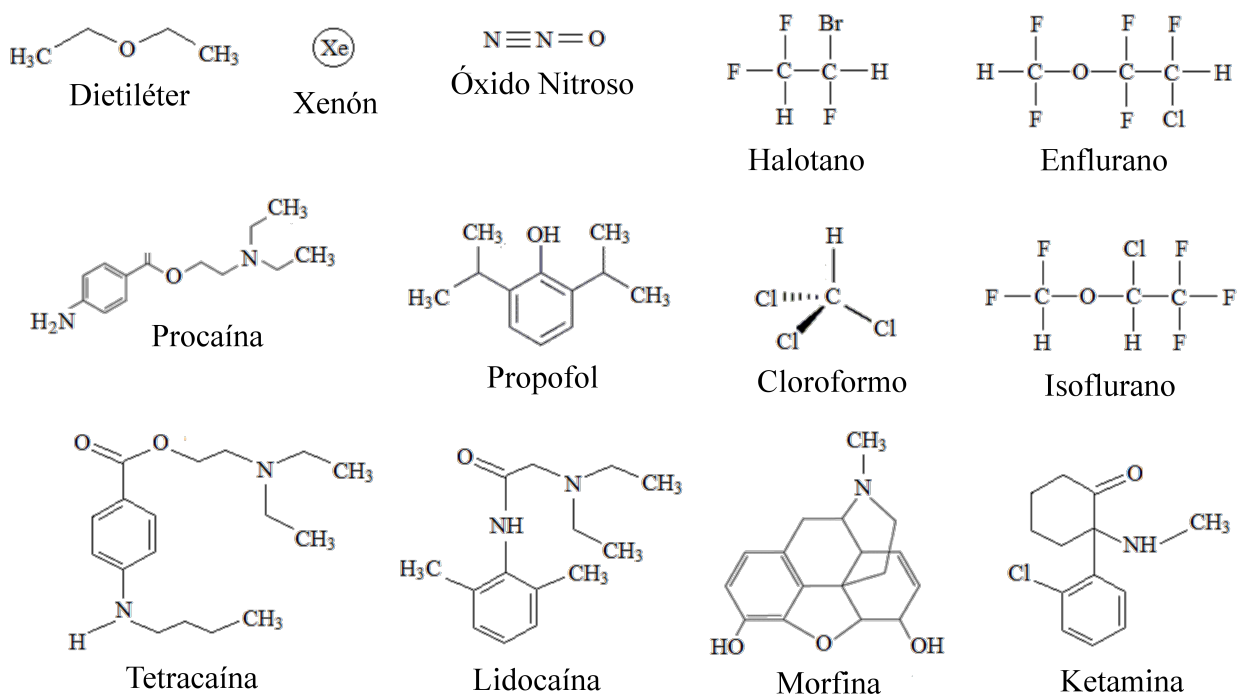


Figura 1.4: Diversidad de especies químicas de anestésicos [21].

## 1.2 Anestesia local

Es el bloqueo temporal a la sensibilidad táctil y dolorosa de una zona del cuerpo sin alterar el estado de consciencia. A finales del siglo XIX se descubrieron las propiedades

anestésicas de la cocaína, pero debido a su toxicidad y propiedades adictivas se buscaron sustitutos sintéticos [22]. Esto concluyó en la síntesis de la procaína y posteriormente de los demás anestésicos locales; en la figura 1.5 se puede observar el orden cronológico en el que fueron sintetizados. Los anestésicos locales son bases débiles que contienen en su estructura: un anillo aromático, que corresponde a la parte hidrofóbica; un enlace éster o amida; y una terminal amino, que corresponde a la parte hidrofílica. Los compuestos que posean estos aspectos estructurales mínimos pueden satisfacer los requisitos para la acción como anestésico local [3].

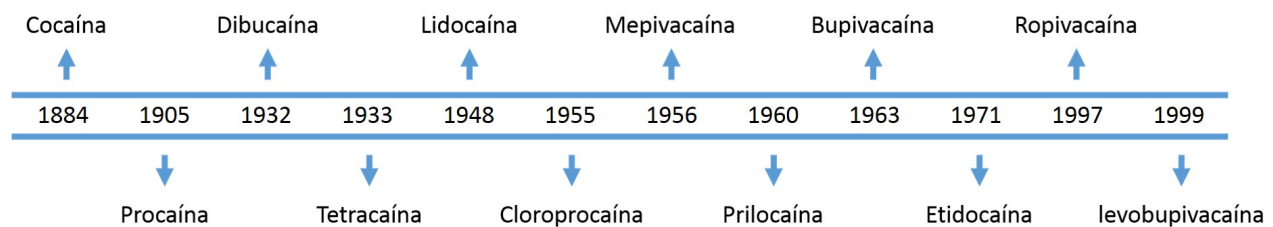


Figura 1.5: Año de introducción de varios anestésicos locales en la práctica clínica. Modificado de [23].

El modelo tradicional de interacción de anestésicos locales se basa en el bloqueo del impulso nervioso al inhibir los canales de sodio, impidiendo la depolarización del potencial de membrana celular. Sin embargo, no se conocen los sitios de acción específicos en las proteínas.

### 1.2.1 Características generales de la anestesia local

La obtención de la anestesia local adecuada se fundamenta clásicamente en las siguientes características:

**Potencia:** se relaciona principalmente con la liposolubilidad del anestésico (coeficiente de partición). Una mayor potencia se relaciona con una mejor difusión de los anestésicos en la membrana celular y esto permite obtener efecto anestésico con menores dosis.



**Inicio de acción:** está relacionado con el pKa, la dosis y la concentración de cada anestésico. Para valores de pKa (en los que la molécula es neutra) cercanos al pH fisiológico, el tiempo de inicio de acción del anestésico es menor que para pKa lejanos al pH fisiológico. Para una dosis o concentración mayor de anestésico local administrado, se obtendrá más rápido la aparición del efecto anestésico [24] [25] [26] [27].

**Duración de la acción:** depende de las características individuales de los anestésicos, está relacionado con la afinidad de los anestésicos con el sitio de acción asociado a los canales de sodio.

La hidrofobicidad parece ser el determinante primario de la potencia anestésica, así como la velocidad de inicio y la duración de la acción [28]. En la actualidad se utiliza la combinación de anestésicos locales con el fin de mejorar la anestesia, combinando las propiedades de los anestésicos. Estas propiedades se obtuvieron de forma empírica y podemos observar en la figura 1.6 las principales características de los anestésicos locales.

Un ejemplo de una combinación utilizada clínicamente es la cloroprocaina con la bupivacaína. Esta combinación tiene la ventaja de tener un tiempo de inicio de acción menor debido a la cloroprocaina y una duración mayor debido a la bupivacaína. Los estudios muestran que la combinación de anestésicos son menos tóxicas que el uso de anestésicos individualmente [30]. Esto contribuye a la solución de uno de los mayores problemas de la anestesia en la práctica clínica.

Por otro lado estudios recientes muestran que los resultados no siempre son los esperados [31]. Al realizar la combinación de lidocaína con bupivacaína no obtienen un tiempo de inicio de acción menor debido a la lidocaína y tampoco una mayor duración a la de la lidocaína debido a la acción de la bupivacaína. Por lo anterior se infiere que las características de la combinación de anestésicos no siempre es la esperada debido a que la combinación misma implica la interacción entre anestésicos, así como diferentes interacciones con la membrana.

Clásicamente, el mecanismo de acción de los anestésicos locales se atribuye a su in-

Anestésicos	Peso molecular	pKa	Unión a proteínas (%)	Tiempo de inicio	Duración de acción (h)	Potencia
<b>Estéres</b>						
Procaína	236	8,9	6	largo	1,0-1,5	0,5
Cloroprocaína	271	8,7		corto	0,5-1,0	1
Tetracaína	264	8,5	80	largo	3,0-4,0	4
<b>Amidas</b>						
Lidocaína	234	7,9	65	corto	1,5-2,0	1
Prilocáína	220	7,6	55	corto	1,5-2,0	1
Mepivacaína	246	7,6	75	corto	2,0-3,0	1
Bupivacaína	288	8,1	95	intermedio	3,0-3,5	4
Levobupivacaína	288	8,1	95	intermedio	3,0-3,5	4
Etidocaína	276	7,7	95	corto	3,0-4,0	4
Ropivacaína	274	8,1	94	intermedio	2,5-3,0	3,3

Figura 1.6: Principales propiedades farmacológicas de los anestésicos locales. Modificado de [29].

teracción directa con canales de Na<sup>+</sup> voltaje dependientes [32]. A pesar de esto, la liposolubilidad del fármaco permite que el anestésico atraviese los tejidos perineurales y las membranas neuronales. La relación entre coeficiente de partición y potencia no es lineal como en el caso de anestésicos inhalatorios [6] y es por esto que se requieren más estudios sobre la difusión de anestésicos en lípidos.

### 1.3 Interacción anestésico-membrana

Las membranas biológicas están constituidas por una o más bicapas lipídicas y sus propiedades mecánicas están estrechamente relacionadas con la función y estabilidad de las mismas. Esto es de vital importancia para el funcionamiento de la célula, ya que su principal característica es regular el paso de moléculas desde o hacia su interior. Cualquier modificación en las propiedades mecánicas podría impedir el funcionamiento adecuado de

la membrana.

El principal enfoque que se le da al estudio de anestésicos, es la interacción del anestésico con sus receptores proteicos, restándole importancia al resto de componentes de la membrana como son los fosfolípidos (uno de los componentes más abundantes de la membrana), el colesterol, la esfingomielina, entre otros. Esto deja fuera del estudio a una de las principales características de los anestésicos que es la liposolubilidad y su relación con la potencia anestésica. La importancia que tienen los lípidos de la membrana en la difusión del anestésico es vital para que se produzca anestesia, estos al interactuar con la membrana pueden: permitir la difusión al sitio de acción, acumularse en la membrana, modificar su estructura conformacional y modificar la propiedades termodinámicas de la membrana [33]. Por lo anterior es importante el estudio de la interacción de anestésicos con lípidos de membrana.

Los lípidos son moléculas anfipáticas y existe una gran diversidad de ellos. Al entrar en contacto con un medio acuoso forman estructuras lipídicas como liposomas, micelas y bicapas lipídicas. Debido a la gran similitud en la estructura esférica y núcleo de solución acuosa, los liposomas representan uno de los mejores modelos de membrana para estudiar la interacción de anestésicos con lípidos. Los liposomas son vesículas compuestas de una o varias bicapas de fosfolípidos. En la figura 1.7 se observa la estructura química de un lípido, así como las estructuras que puede formar.

Los anestésicos son moléculas liposolubles que, cuando interactúan con las bicapas de fosfolípidos de los liposomas, pueden interactuar con la región hidrofóbica de los fosfolípidos (colas) y debilitar la interacción fosfolípido-fosfolípido, causando un desorden estructural de la membrana.

Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran cómo las moléculas de tetracaína, procaína y lidocaína interactúan con una bicapa de fosfolípidos. Estos estudios se realizaron por medio de simulaciones computacionales de dinámica molecular [34]. Un ejemplo de los

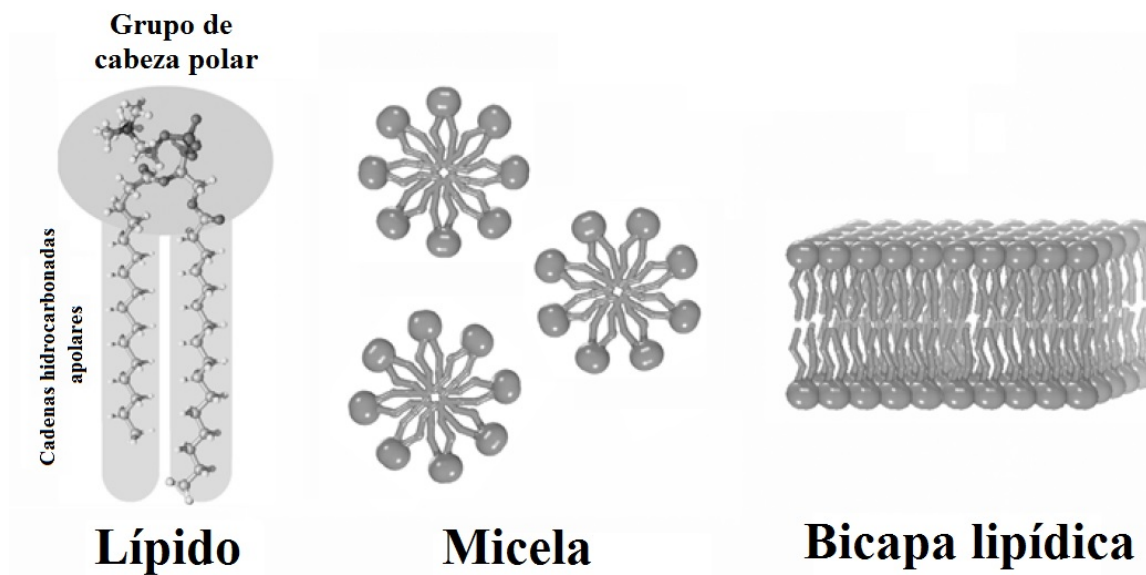


Figura 1.7: Izquierda: Lípido monomérico que muestra el grupo de cabeza y cadenas hidrocarburo. Centro: Micelas lipídicas. Derecha: Bicapa lipídica que consta de dos monocapas opuestas [11].

resultados es que la tetracaína interactúa con parte de la región hidrofóbica de la bicapa. Esto conlleva a que se desordene la membrana arrojando información cuantitativa importante de la interacción anestésico-membrana. Para los estudios experimentales de interacción de fármacos con membrana se utilizan principalmente las técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés), fluorescencia, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés), modelado molecular, resonancia magnética nuclear (RMN por sus siglas en inglés), entre otras.

## 1.4 Termodinámica de membranas

Las membranas biológicas experimentan un gran número de fenómenos físicos como: las transiciones de fase, permeabilidad variable (endocitosis y exocitosis), formación de balsas, entre otros. La termodinámica es una disciplina fundamental de la física que describe

el comportamiento de conjuntos de moléculas y se basa en dos leyes fundamentales: la conservación de la energía, que estudia la transformación de distintas formas de energía (ecuación 1.1); y el principio de máxima entropía, en el que existe mayor probabilidad de encontrar al sistema en un estado determinado (ecuación 1.2). La termodinámica es aplicable a todas las escalas de longitud, desde la física de partículas hasta la cosmología.

$$\Delta U = Q - W, \quad (1.1)$$

donde  $U$  es la energía interna,  $Q$  es el calor y  $W$  el trabajo.

$$dS = \frac{dQ}{T}, \quad (1.2)$$

donde  $S$  es la entropía y  $T$  es la temperatura.

El estudio termodinámico de las membranas biológicas busca obtener información de los diagramas de fase, elasticidad y cambios en la forma vesicular, propagación del impulso, permeabilidad, electrostática, entre otros. Las membranas lipídicas pueden tener transiciones de fase en el rango de  $-20$  a  $+60$  °C, las cuales se pueden medir por medio de DSC o espectroscopía, con la ventaja de obtener directamente información importante como la entalpía y entropía.

A pesar de que la física ha intentado estudiar las moléculas de forma independiente, también existen fenómenos cooperativos como la fusión de membranas lipídicas que están más allá del estudio de una sola molécula. Por medio del estudio de estos sistemas (p. ej. proteínas, membrana lipídica, balsas) es posible enlazar procesos de membrana aparentemente no relacionados entre sí, para obtener una visión unificada del comportamiento de la membrana en su conjunto.

Debido a la complejidad del estudio de la membrana biológica surgen modelos de membrana para el estudio de las principales características de la misma, es de gran interés el

estudio de interacción de membranas lipídicas con fármacos, en especial los anestésicos.

El análisis termodinámico de las fases de la membrana lipídica está relacionado con la temperatura, presión, pH y concentraciones de solutos y sales. Los cambios entre fases (transición de fase) se pueden observar en los perfiles calorimétricos y dependen de los tipos de lípidos que contiene la membrana.

Las membranas lipídicas presentan al menos dos fases: la fase sólida (ordenada) también llamada fase gel, que ocurre a bajas temperaturas en donde los lípidos se organizan en forma de red triangular y las colas tienen la misma configuración (trans); fase líquida (desordenada) también llamada fase fluida, que ocurre a temperaturas superiores a la temperatura de transición de fase, en donde los lípidos no muestran orden lateral y el orden de las cadenas de las colas es aleatorio. Podemos observar una ilustración del cambio en la estructura de los lípidos en la figura 1.8.

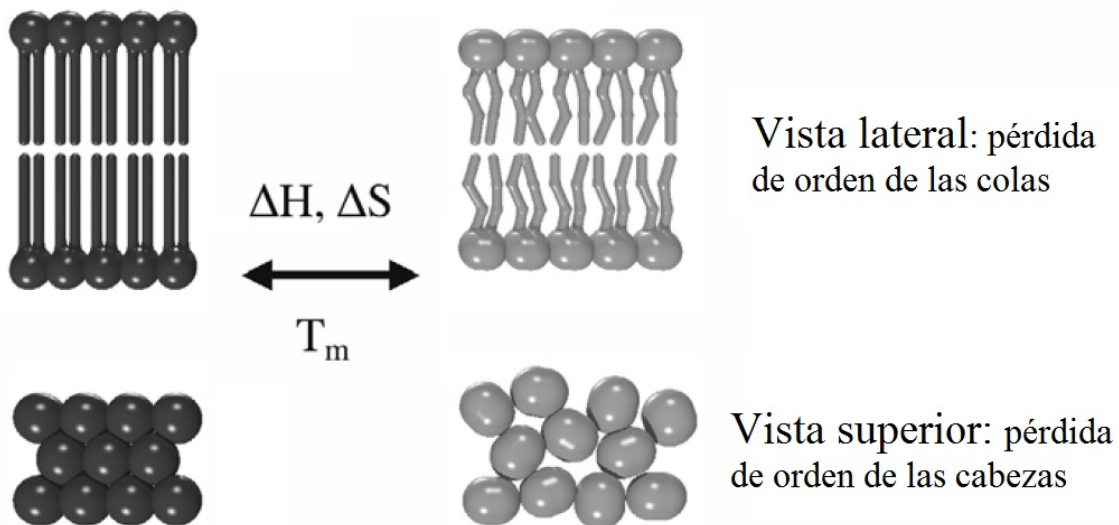


Figura 1.8: Cuadro esquemático de la transición de fase de lípidos de fase sólido-ordenado a fase líquido desordenado. Arriba: Se pierde el orden de las cadenas de lípidos tras la transición de fase. Abajo: El orden cristalino de los grupos de las cabezas lipídicas también se pierde [11].

En la figura 1.9 se muestra un perfil calorimétrico para liposomas de DMPC (dimiristoil-

sn-glicero-3-fosfolina), donde se puede observar un pico a la izquierda que corresponde a una pretransición, la membrana pasa de fase gel ordenada a fase gel ondeante; el pico de la derecha corresponde a la transición principal, que es el cambio de fase gel a fase fluida.

La capacidad calorífica por definición es la energía necesaria para elevar 1°C la temperatura de una sustancia, se relaciona con la transferencia de energía de un proceso en función de la temperatura, o bien, con la absorción de calor al incrementar la temperatura. Dada la primera ley de la termodinámica (ecuación 1.1) se puede obtener la expresión de capacidad calorífica (ecuaciones 1.3 y 1.4) a presión constante como se muestra en la ecuación 1.5.

$$c_p = \left(\frac{dQ}{dT}\right)_p, \quad (1.3)$$

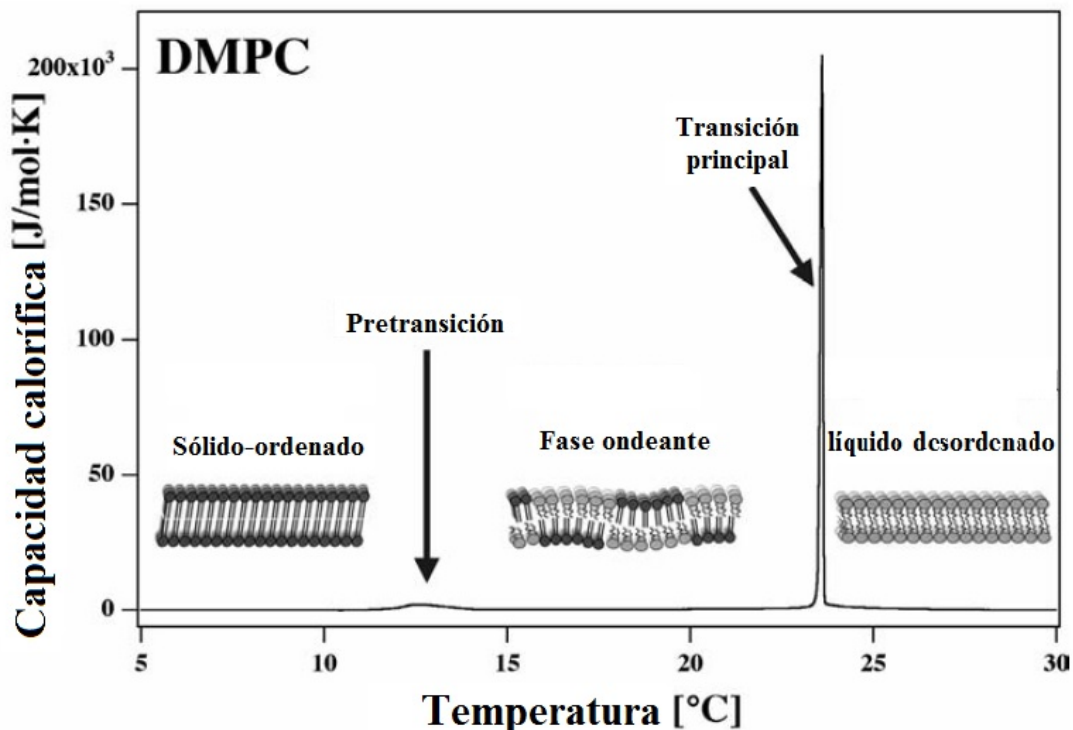


Figura 1.9: Perfil calorimétrico ideal de DMPC [11].

Ya que  $dH = dQ + Vdp$ , obtenemos a presión constante,

$$c_p = \left(\frac{dH}{dT}\right)_p, \quad (1.4)$$

dado que  $dQ = TdS$ , la capacidad calorífica a presión constante está dada por:

$$c_p = T\left(\frac{dS}{dT}\right)_p. \quad (1.5)$$

Así mismo la entalpía y entropía están relacionadas con la capacidad calorífica de acuerdo a las ecuaciones 1.6 y 1.7. Conociendo estas variables se obtiene información de toda la energía del sistema.

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} c_p dT \quad (1.6)$$

$$\Delta S = \int_{T_0}^{T_1} \frac{c_p}{T} dT \quad (1.7)$$

Por medio de la ecuación 1.6, se sabe que el área bajo la curva de un perfil calorimétrico es el cambio de entalpía durante el proceso, podemos observar esto en la figura 1.10.



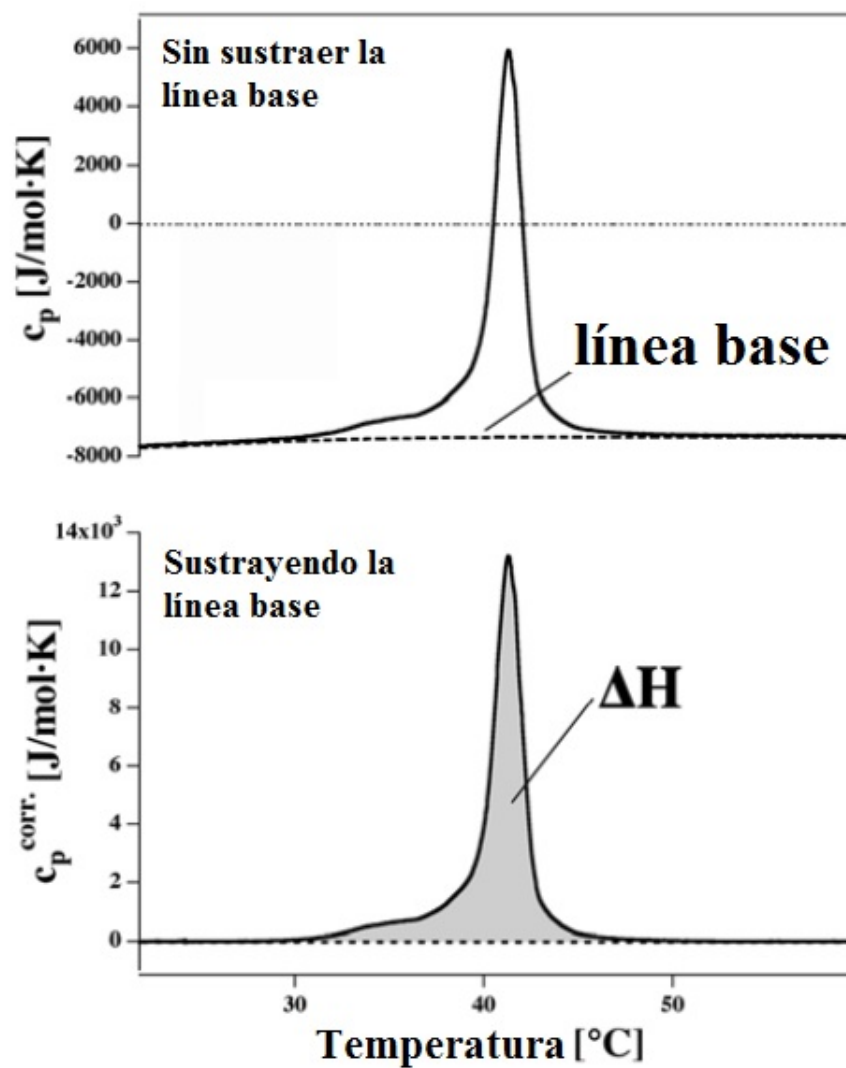


Figura 1.10: Perfil calorimétrico ideal de DPPC. Arriba: perfil calorimétrico de datos en crudo. Abajo: perfil calorimétrico procesado restando la línea base. El área bajo la curva (entalpía) representativa se calculada a partir de la ecuación 1.6.

# 2

## Antecedentes

### 2.1 Difusión de anestésicos en membranas lipídicas

Estudios previos en nuestro grupo sobre la interacción de anestésicos con membranas de lípidos, han demostrado un fenómeno que podría explicar la difusión de anestésicos en membranas celulares [35]. Los estudios se realizaron con liposomas unilaminares y multilaminares. En la figura 2.1 podemos observar los perfiles calorimétricos del efecto de anestésicos generales en liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). El corrimiento de la temperatura de transición en todos los casos es hacia la izquierda, es decir, a temperaturas más bajas que la temperatura control, esto es consistente con resultados de diversos autores en que los anestésicos inducen depresión del punto de fusión de las membranas [36]. También podemos observar que los perfiles correspondientes a la interacción con liposomas unilaminares (LUVs) y liposomas multilaminares (MLVs) es similar, los anestésicos generales es el mismo sin importar el número de capas que tengan los liposomas.

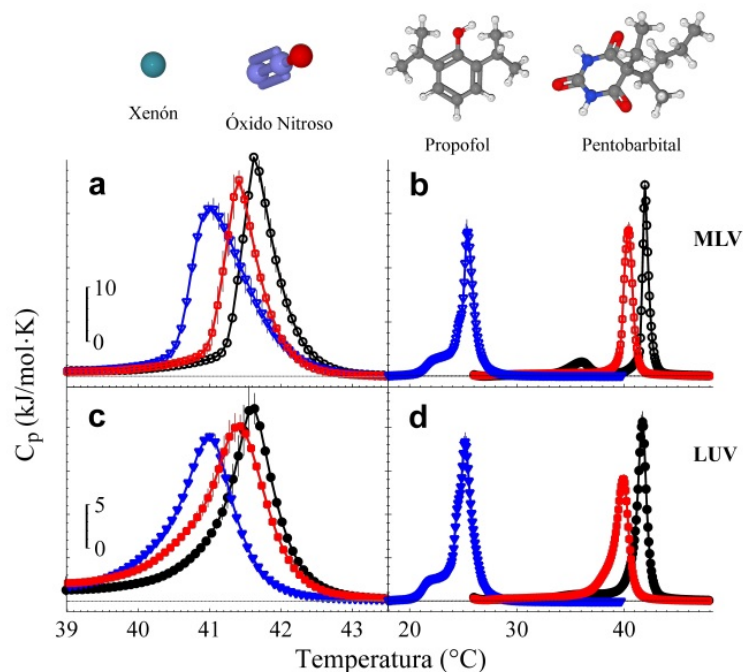


Figura 2.1: Perfiles calorimétricos de MLVs y LUVs bajo la influencia de anestésicos generales. Perfiles calorimétricos de: a) xenón (curva roja) y óxido nitroso (curva azul) en MLV, b) propofol (curva azul) pentobarbital (curva roja) en MLV, c) xenón y óxido nitroso en LUV y d) propofol y pentobarbital en LUV [35].

El caso de los anestésicos locales es distinto: en el caso de MLVs se obtienen dos picos calorimétricos. La hipótesis propuesta para explicar este fenómeno térmico, fue que el pico cercano a 42°C corresponde a bicapas internas del liposoma que aún no están interactuando con el anestésico y el pico cercano a 37°C corresponde a bicapas externas que ya están interactuando con el anestésico. Para un número posterior de barridos el pico de la izquierda aumenta y el de la derecha disminuye, esto se podría explicar como un cambio de estado en las bicapas.

El seguimiento de la cinética de difusión de los anestésicos a través de las diferentes membranas de lípidos, mostrado en la figura 2.2, se realizó calculando la entalpía de cada pico en el transcurso de los barridos. Para los barridos iniciales el anestésico se ha difundido por las bicapas externas y al aumentar el tiempo (número de barrido) el anestésico

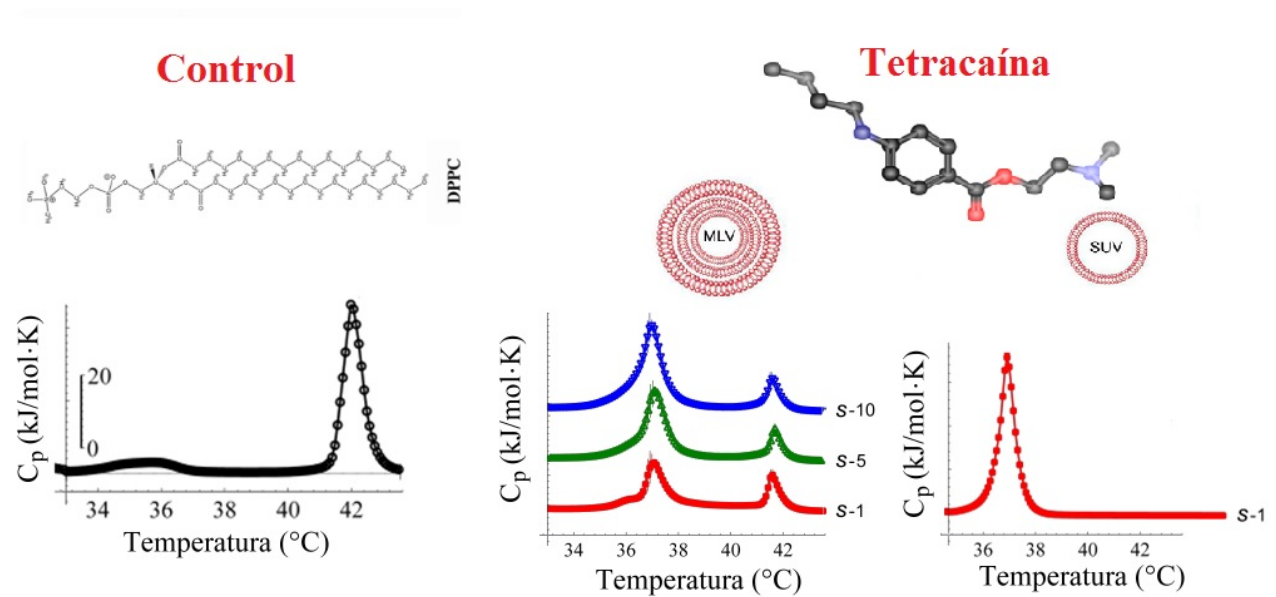


Figura 2.2: Perfiles calorimétricos bajo la influencia de tetracaína 25 mM. Izquierda: control MLV; derecha: primer, quinto y décimo barrido térmico para MLV con tetracaína; y derecha: primer barrido térmico LUV con tetracaína. Modificada de [35].

finalmente produce un efecto en las bicapas internas. Para el momento en que el anestésico ha difundido por todas las bicapas el pico de la derecha desaparece, esto sería similar al perfil calorimétrico para LUVs.

Cuando se agrega un tercer agente al experimento, en este caso un ácido débil, se observa que éste modifica la difusión del anestésico. Se puede observar en la figura 2.3 que cuando no se agrega un ácido (sólo  $H_2O$ ) el pico de la izquierda es más bajo comparado con los resultados cuando se agrega un ácido. Para el caso del ácido glicólico podemos observar que el pico de la derecha casi desaparece. Por tanto, los autores concluyeron que el efecto se debe a la tasa de protonación del sistema, la cual era afectada por la tasa de protonación de cada integrante en la reacción de equilibrio ( $H_2O$ , anestésico, ácido débil), y esto permitía que el anestésico permaneciera más o menos tiempo de forma protonada o no protonada (recordemos que los anestésicos en su forma neutra son más liposolubles) permitiendo alterar la difusión de los anestésicos.

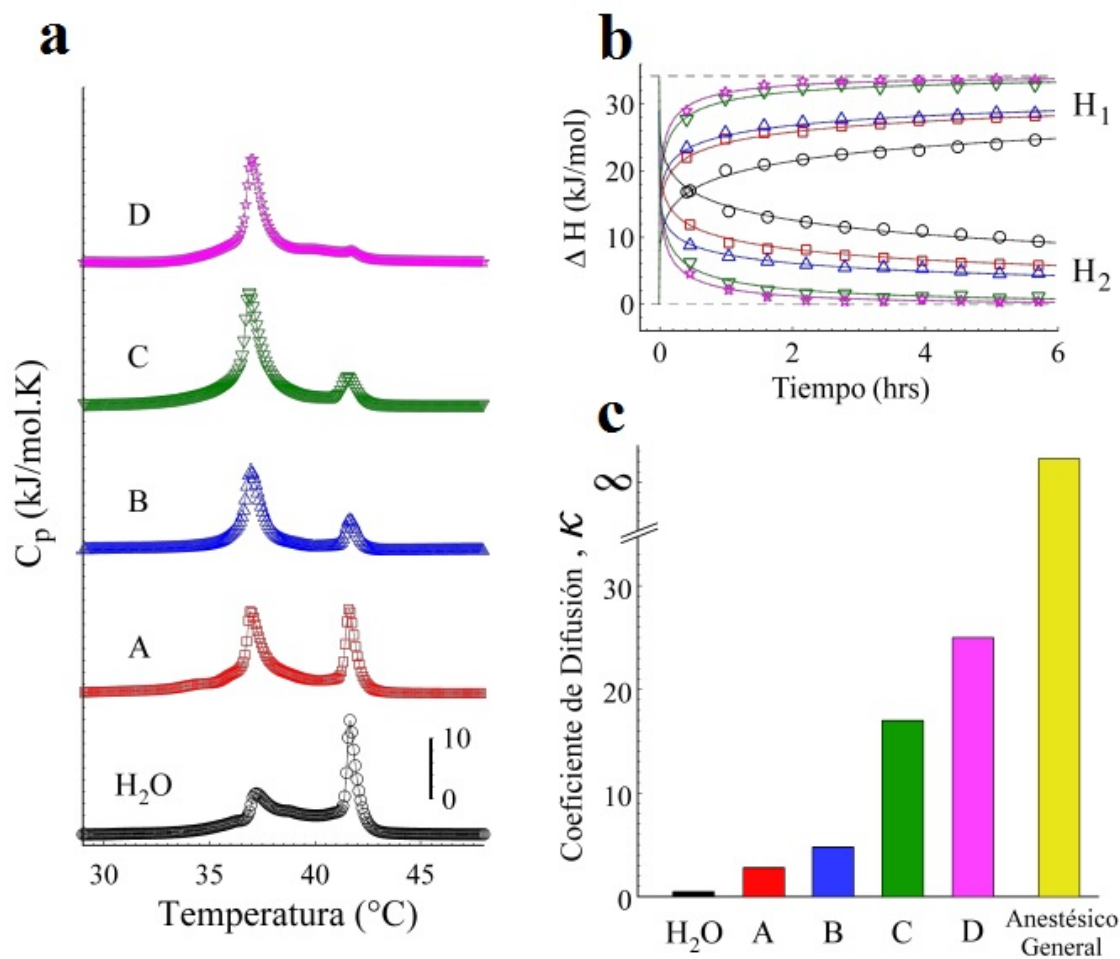


Figura 2.3: Cinética de difusión de tetracaína modulada por diferentes ácidos carboxílicos. a) primeros barridos térmicos para H<sub>2</sub>O (agua), A (ácido málico), B (ácido cítrico), C (ácido fórmico) y D (ácido glicólico). b) Entalpías de H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> como función del tiempo. c) Coeficiente de difusión obtenido a partir del mejor ajuste al modelo de difusión [35].

# 3

## Hipótesis y Objetivos

### 3.1 Hipótesis

La difusión de una mezcla de anestésicos en MLVs está regulada por el cambio de entropía (desorden en la membrana) y los valores de pKa de los mismos.

### 3.2 Objetivos

#### 3.2.1 Objetivo General

Estudiar la difusión de mezclas de anestésicos locales a través de membranas de MLVs.

#### 3.2.2 Objetivos Particulares

- Estudiar la transición de fase de cada anestésico local a una concentración fija.

- Estudiar la transición de fase de la mezcla de anestésicos locales en función de las concentraciones.
- Estudiar la cinética de la transición de fase para diferentes mezclas.

# 4

## Metodología

### 4.1 Materiales y métodos

#### 4.1.1 Reactivos

**Lípidos:** Para la elaboración de las membranas se utilizó uno de los fosfolípidos del grupo colina, especie más abundante en la membrana plasmática [37] . El fosfolípido utilizado fue dipalmitoilfosfatidilcolina DPPC. La estructura del DPPC se observa en la figura 4.1, fue adquirido de Avanti Polard Lipids y utilizado sin purificación posterior.



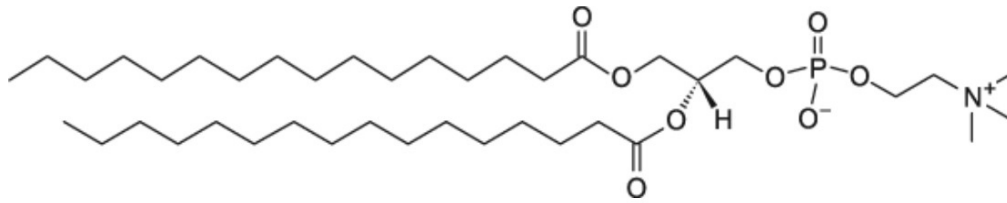


Figura 4.1: Estructura química del DPPC.

En la figura 4.2 podemos ver los porcentajes de los lípidos presentes en diferentes membranas biológicas, resaltando que el grupo de la cabeza PC (fosfatidilcolinas) es uno de los lípidos que tiene mayores porcentajes.

Membrana	PC	PE	PS	PI	SM	CL	Glicolípidos	Colesterol	Otros
Eritrocitos (humano)	20	18	7	3	18	-	3	20	11
Plasma (rata)	18	12	7	3	12	-	8	19	21
RE	48	19	4	8	5	-	tr	6	10
Golgi	25	9	3	5	7	-	0	8	43
Lisosoma	23	13	-	6	23	5	-	14	16
Membrana nuclear	44	17	4	6	3	1	tr	10	15
Mitocondria	38	29	0	3	0	14	tr	3	13
Neuronas	48	21	5	7	4	-	3	11	1
Mielina	11	17	9	1	8	-	20	28	6

Figura 4.2: Composición del grupo de cabeza de las membranas de algunas células de hígado de mamífero, eritrocitos y células nerviosas en porcentaje de peso. Adaptado de Jamieson y Robinson (1977). Abreviaturas: PC = fosfatidilcolinas, PE = fosfatidiletanolaminas, PS = fosfatidilserinas, PI = fosfatidilinositoles, SM = esfingomielina, CL = cardiopina. [37].

**Anestésicos:** Los anestésicos utilizados son anestésicos locales de tipo éster y amida.

**Aminoésteres.** Se utilizaron dos anestésicos: la tetracaína y la procaína, cuya estructura química se puede observar en la figura 4.3 (izquierda).

**Aminoamidas.** Se utilizaron: Lidocaína, mepivacaína, prilocaína, bupivacaína y ropivacaína. Se puede observar en la figura 4.3 (derecha) sus estructuras químicas.

Todos los anestésicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich en su forma hidrocloorada.

### 4.1.2 Preparación de liposomas

El modelo utilizado en este trabajo es el de MLVs, el cual nos permite estudiar la difusión de anestésicos locales en membranas de lípidos [35].

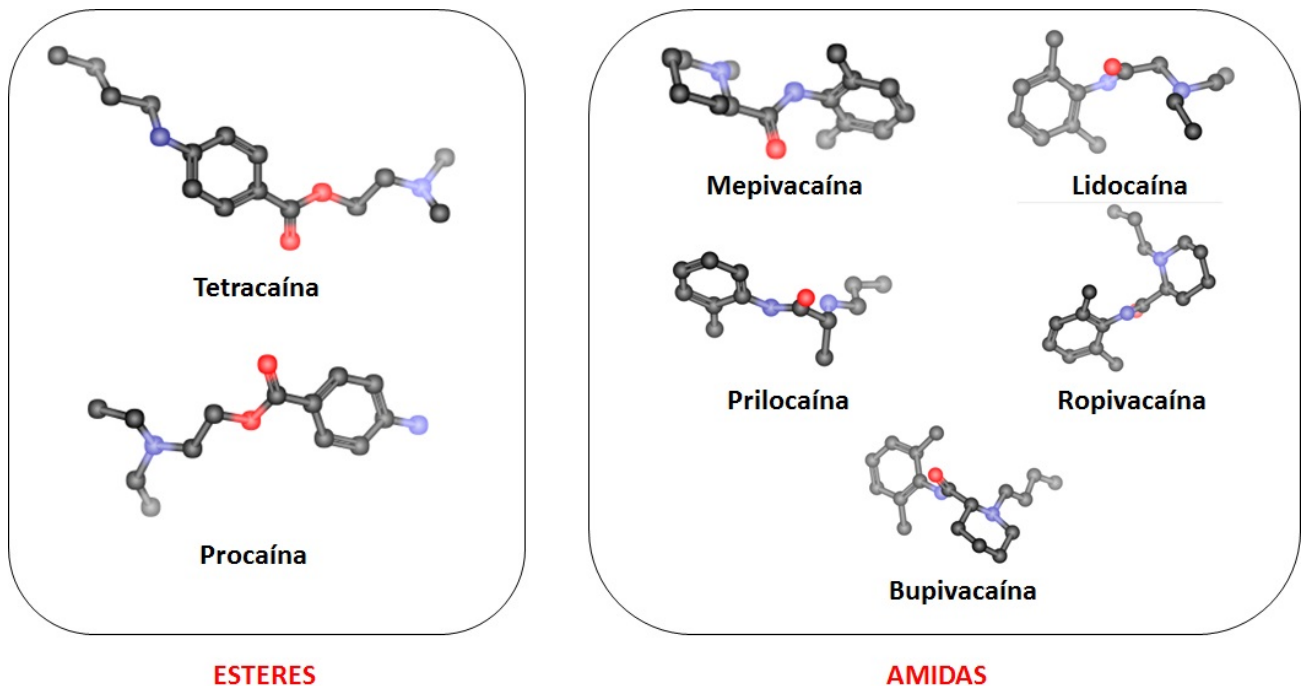


Figura 4.3: Estructura química de algunos anestésicos locales.

### **4.1.3 Protocolo de preparación de MLVs**

Para la preparación de MLVs se pesa la cantidad de DPPC en polvo y se agrega la cantidad requerida de agua mili-Q a 60°C. Por ejemplo, para una concentración de 4mM el peso de DPPC es 3 mg y el volumen de agua es 1 ml. La temperatura de la solución (en este caso agua mili-Q) con la que se hidrata el DPPC debe estar por encima de la temperatura de transición de éste (aproximadamente 42°C) para formar liposomas MLV. Posteriormente se agita a 600 rpm a una temperatura de 60°C durante 45 minutos, este proceso se realizó en una estación de degasificación (TA Instruments). Posteriormente los liposomas se termalizan a 25°C y se degasifican a 600 rpm a 25°C durante quince minutos para retirar burbujas de aire.

### **4.1.4 Preparación de muestra y referencia**

Cuando los liposomas se han preparado y degasificado se toma la cantidad necesaria para el análisis (aproximadamente 800  $\mu$ L) y se agrega el anestésico o la mezcla de anestésicos. La concentración de los anestésicos utilizada en los experimentos, corresponde a la concentración utilizada en la práctica clínica (concentración de la solución a la que se inyecta a un paciente), la concentración utilizada es: tetracaína 25mM, procaína 73mM, lidocaína 69mM, mepivacaína 106mM, prilocaína 73mM, bupivacaína 15mM y ropivacaína 16 mM.

El protocolo para agregar los anestésicos es el siguiente: los anestésicos se encuentran en solución y se agrega la cantidad necesaria para obtener la concentración arriba mencionada. En el caso de una mezcla de anestésicos, el segundo anestésico se agrega inmediatamente después del primero. Después de adicionar el anestésico o la mezcla se agita a 500 rpm por 10 segundos y se carga en el calorímetro para su análisis. Cabe mencionar que el orden en el que se agregan los anestésicos no produce cambios significativos en el efecto, esto se observa en la figura 4.4. La muestra de referencia se prepara con todos

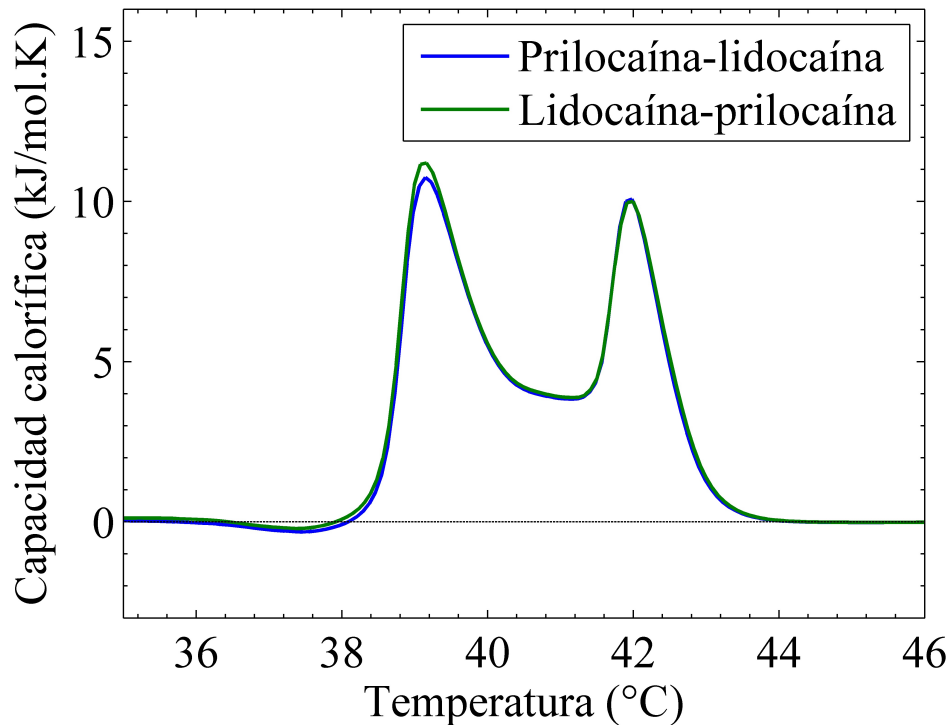


Figura 4.4: Perfil calorimétrico de liposomas MLVs de DDPC bajo la influencia de prilocaína hidrociorada 35mM y lidocaína hidrociorada 79mM. Curva azul: adición de prilocaína seguido de lidocaína. Curva roja: adición de lidocaína seguido de prilocaína.

los componentes de la muestra excepto los liposomas, es decir, agua y anestésicos.

## 4.2 Técnicas de análisis

La técnica de calorimetría diferencial de barrido es una técnica termoanalítica que permite medir la capacidad calorífica de un sistema. Durante el funcionamiento del calorímetro las celdas (capilares que se llenan con la muestra y la referencia) se calientan simultáneamente a una velocidad determinada, la muestra en nuestro caso son los liposomas con o sin anestésicos y la referencia contiene únicamente agua con o sin anestésicos.

Cuando se calientan las celdas y se produce la transición fase, la muestra absorbe una

mayor cantidad de calor respecto a la celda de referencia, así que para mantener la misma temperatura en las dos celdas, el calorímetro suministra una mayor potencia calorífica a la celda de la muestra. La potencia suministrada es proporcional a la diferencia de capacidades caloríficas entre las dos celdas. Podemos observar en la figura 4.5 (derecha) las celdas del calorímetro.

Para los experimentos se utilizó un Microcalorímetro NanoDSC, (TA Instruments) (figura 4.5), este tiene una interface con la computadora llamada DSCrun que permite controlar la presión del dispositivo, la velocidad con la que aumenta la temperatura, la temperatura inicial y final del barrido (barrido de temperatura), el tiempo de termalización, entre otros.

Un Nano DSC es un calorímetro ultrasensible que permite la caracterización de la estructura y estabilidad molecular. El equipo realiza mediciones utilizando pequeñas cantidades de muestra (300  $\mu$ L). Además el orden de detección es de  $\mu$ J, la generación de ruido que produce es de  $\pm 15$  nW y la reproducibilidad es del orden de 28 nW.

Estas características hacen de la DSC una técnica que permite un amplio uso en el estudio de biomoléculas. Para los experimentos se ajustó una presión constante dentro del dispositivo de 3 atm y se configuró una velocidad de barrido constante de 1°C por minuto. Antes de iniciar cada barrido térmico las muestras fueron equilibradas térmicamente a 25°C por un tiempo de 5 minutos. Los barridos se realizaron en modo calentamiento de 25 a 50°C.

## **4.3 Grupos experimentales**

### **4.3.1 Efectos de anestésicos locales en membranas lipídicas**

Para comparar el efecto que produce cada anestésico en la membrana de lípidos se tomó una concentración fija de 50mM y se hidrataron los fosfolípidos con el anestésico, esto aseguraba que el anestésico estuviera interactuando con todas las bicapas del liposoma. Es

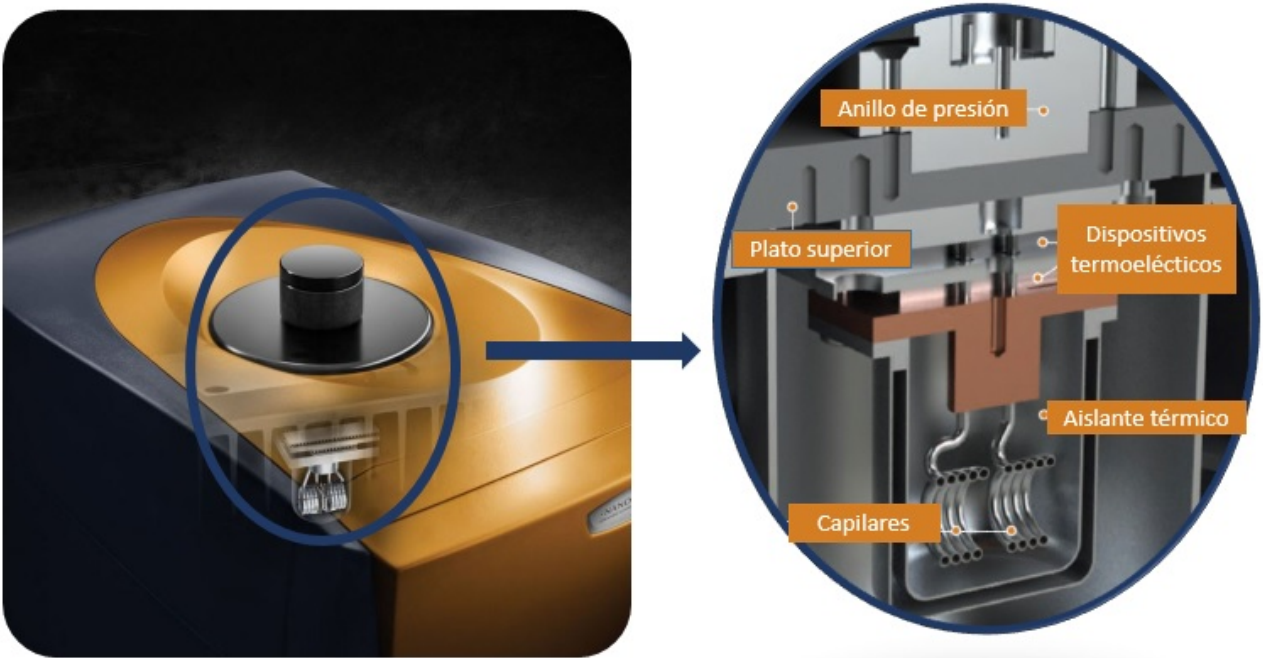


Figura 4.5: Microcalorímetro NanoDSC, TA Instruments. Derecha. Celdas del calorímetro y principio del funcionamiento.

realizado de esta manera con la finalidad de obtener el efecto final que se tendría al agregar el anestésico en liposomas y realizar un número elevado de barridos.

### 4.3.2 Efecto de la combinación de anestésicos en membranas lipídicas

Para el estudio de la difusión de la combinación de anestésicos en membranas de lípidos se agregó el anestésico o la mezcla a los liposomas degasificados y se estudió tanto el corrimiento de la temperatura de transición de fase como la entalpia del sistema.

### 4.3.3 Difusión de anestésicos en membranas de lípidos con calcio

Para el estudio de la difusión de anestésicos en membranas de lípidos se agregó el cloruro de calcio a una concentración de 10 mM en la hidratación de los lípidos. Se estudió

tanto el corrimiento de la temperatura de transición de fase como la entalpía del sistema.

El análisis de DSC para todos los experimentos se inició 10 minutos después de que los liposomas y el anestésico o mezcla de anestésicos entraran en contacto, incluyendo los 5 minutos de termalización previa al barrido.

## **4.4 Análisis de datos**

Los datos se adquieren en tiempo real y se guardan por medio de la interfaz DSCrun que proporciona TA Instruments. DSCrun permite que se ingresen datos de concentración, masa y volumen para realizar conversiones de unidades. Posteriormente los datos obtenidos son analizados con el software Launch nanoAnalyze y guardados en un archivo con extensión .tex para ser procesados con el software Matlab.

# 5

## Resultados

El estudio termodinámico de la interacción de anestésicos con membranas de lípidos se realizó por medio de la técnica DSC, el modelo de membrana más estudiado con esta técnica es el de liposomas de fosfolípidos. Los principales efectos estudiados en este trabajo son el corrimiento de la temperatura de transición de fase y el cambio en la entalpía. En la figura 5.1 podemos observar el perfil calorimétrico control (MLVs hidratados con agua ultrapura mili-Q) de DPPC que tiene una temperatura de transición principal ( $T_m$ ) cercana a 42 °C; la cual divide los estados de fase gel y la fase fluida de la membrana. También hay un pico cercano a 36 °C y corresponde a la pretransición; cambio de fase gel ordenada a fase gel ondeante. Se observa un punto máximo de capacidad calorífica debido a la absorción de energía que el sistema necesita para la transición de fase, la medición se realiza en capilares herméticos por lo cual la entalpía no cambia (el sistema es cerrado).



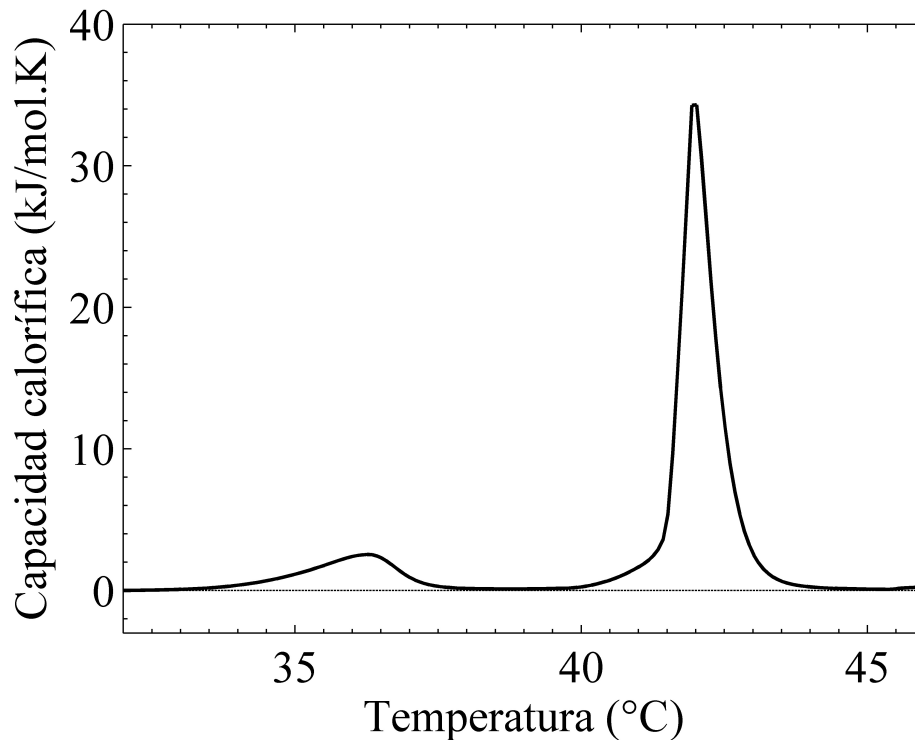


Figura 5.1: Perfil calorimétrico de liposomas MLVs de DPPC

## 5.1 Efectos de anestésicos locales en membranas lipídicas

Para evaluar y comparar el efecto que produce cada anestésico, se tomó una única concentración para todos los anestésicos. Esto es importante ya que en la práctica clínica se implementan distintas concentraciones. La concentración más baja usada es de 14.5 mM correspondiente al anestésico local ropivacaína y la máxima concentración usada es 106 mM, correspondiente a mepivacaína. Se eligió 50 mM como la concentración media para observar el efecto de todos los anestésicos en membranas de DPPC. Cuando se agrega anestésico local a los MLVs preparados, el perfil calorimétrico resultante muestra dos picos para el primer barrido térmico, este resultado es consistente con lo reportado [35]. Al au-

mentar el número de barridos térmicos el pico de la izquierda aumenta mientras que el de la derecha disminuye, sin embargo, para observar el efecto con mejor detalle es necesario realizar un número de barridos elevado. Cuando esto ocurre el pico correspondiente al pico control prácticamente desaparece y se observa un único pico, este pico correspondería al efecto máximo producido por el anestésico ya que la entalpía del pico es máxima y el corrimiento de  $T_m$  no varía. Para observar el efecto final que producen los anestésicos en nuestro sistema de estudio se requieren 10 horas o más en la mayoría de los casos. Cuando se agrega el anestésico local en la hidratación del DPPC se asegura su distribución por todas las bicapas de los liposomas, esto es análogo a la difusión de anestésicos locales después de un número elevado de barridos, en los cuales los anestésicos ya se encuentran interactuando con los fosfolípidos de todas las bicapas del liposoma. De esta forma se puede obtener el efecto final con tan solo un barrido térmico. En la figura 5.2 se pueden observar los perfiles calorimétricos para la interacción de MLVs de DPPC con cada uno de los anestésicos locales. La tetracaína (pico de la izquierda) es el anestésico local que produce un mayor corrimiento en la temperatura de transición, como se mencionó la transición de fase control es de aproximadamente 42 °C, si observamos el pico de la tetracaína vemos que se encuentra a una temperatura de transición de aproximadamente 35 °C, es decir, el corrimiento en la temperatura de transición de fase  $\Delta T_m$  es de 7 °C. La procaína es el anestésico local que produce un menor  $\Delta T_m$ , aproximadamente 0.6 °C.

## **5.2 Efecto de la combinación de anestésicos en membranas lipídicas**

Para estudiar el efecto de la combinación de anestésicos locales y la relación con la concentración de la mezcla, se realizaron barridos de las concentraciones de los anestésicos involucrados, las combinaciones que se realizaron fueron las siguientes:

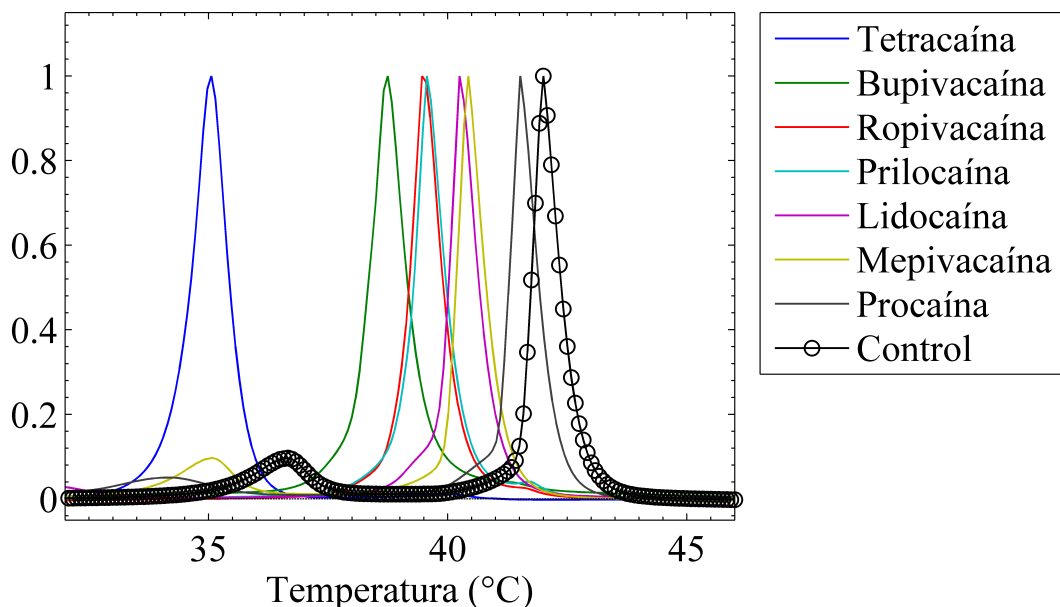


Figura 5.2: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de anestésicos locales. La concentración utilizada para todos los anestésicos fue de 50 mM. Las curvas fueron normalizadas.

### Tetracaína-mepivacaína

Inicialmente se realizó el experimento de la interacción de cada anestésico individualmente con MLVs, la concentración de los anestésicos locales fue de 25mM para la tetracaína y 106mM para la mepivacaína. En la figura 5.3 se observa el perfil calorimétrico para cada uno de los experimentos mencionados, también se puede observar el efecto de la combinación de los dos anestésicos locales. El efecto  $\Delta T_m$  de la combinación es mayor al  $\Delta T_m$  producido por cada anestésico en forma individual, es decir, no es un efecto totalmente aditivo; el  $\Delta T_m$  que produce la tetracaína sola es de aproximadamente 5 °C y el  $\Delta T_m$  que produce la mepivacaína sola es de aproximadamente 3 °C, el  $\Delta T_m$  producido por la combinación es de aproximadamente 6 °C pero el efecto aditivo máximo sería de 8 °C.

Para estudiar el comportamiento de la difusión de la combinación se realizó un barrido

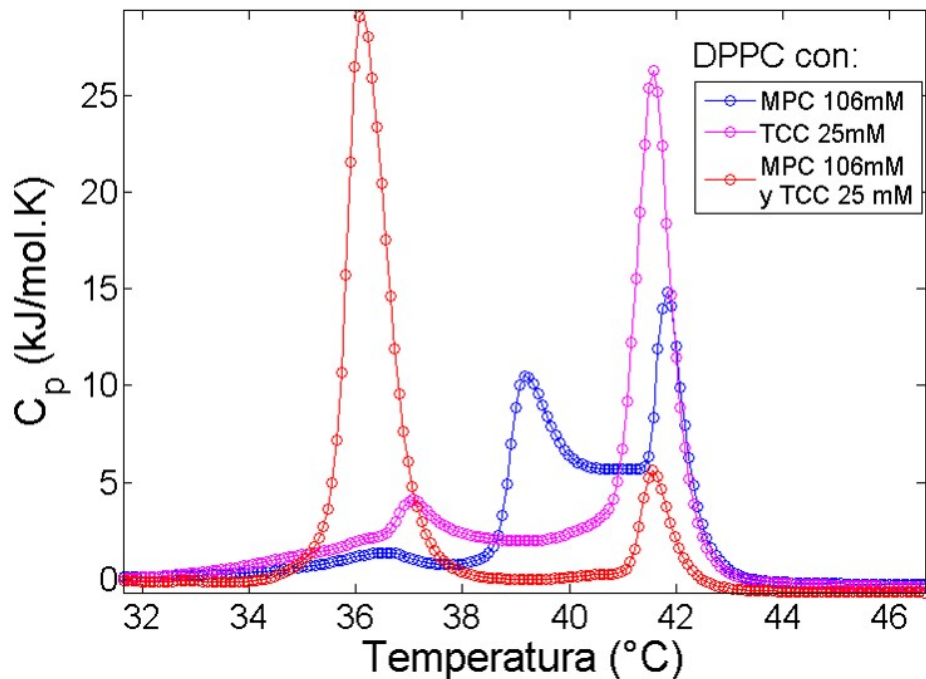


Figura 5.3: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de mepivacaína, tetracaína y mepivacaína-tetracaína.

de concentraciones, para este caso se dejó la concentración de la tetracaína fija (25mM) y se modificó la concentración de la mepivacaína, las concentraciones utilizadas fueron: 106 mM (concentración utilizada en la práctica clínica), 50 mM, 10 mM, 0.1 mM y 0 mM. Los perfiles calorimétricos del barrido de concentración se pueden observar en la figura 5.4, a mayor concentración de mepivacaína hay un mayor  $\Delta T_m$ . También es importante resaltar que el área bajo la curva del pico izquierdo aumenta, es decir, aumenta el cambio de entalpía; anteriormente se mencionó que este aumento se relaciona con la difusión de los anestésicos, esto es consistente también con la reducción de la entalpía del pico de la derecha (pico control). A mayor concentración de mepivacaína se obtiene un mayor  $\Delta T_m$  así como una difusión más rápida.

Para un análisis más completo de la difusión de la combinación se utilizó el método de

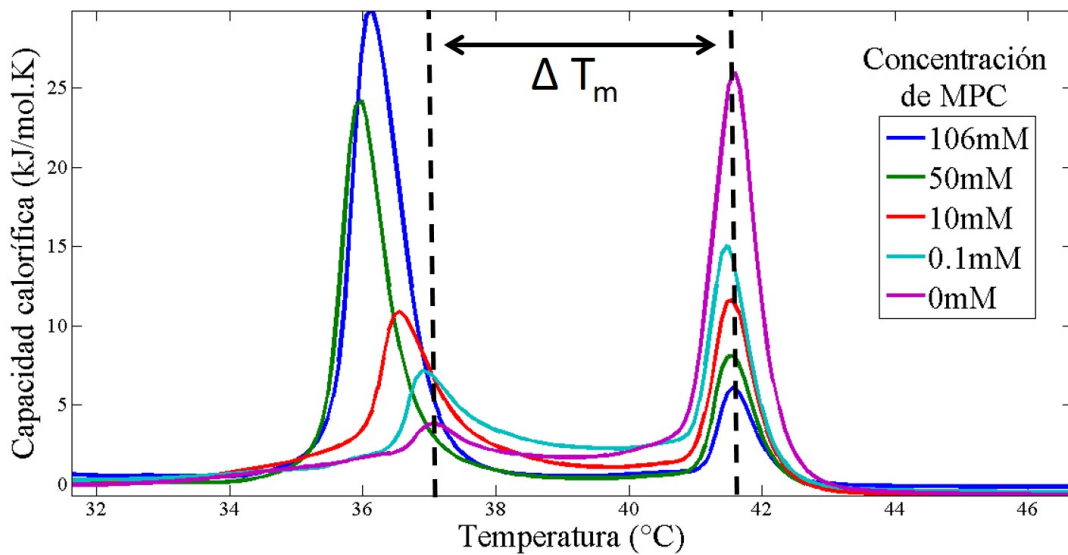


Figura 5.4: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de la combinación tetracaína-mepivacaína. La concentración de la tetracaína permanece fija (25 mM) y se realiza un barrido de concentración de mepivacaína.

cinética de difusión propuesto en trabajos previos de nuestro laboratorio [35]. Se realizaron 30 barridos de calentamiento de 25 a 50 °C, se calculó la entalpía de los dos picos para cada scan, esto corresponde a cada uno de los puntos de la figura 5.5. Los puntos se ajustaron con una función exponencial y se obtuvo el coeficiente de difusión. En las curvas se puede observar que a mayor concentración de mepivacaína hay un mayor coeficiente de difusión, esto es consistente con los resultados de la figura 5.4; una mayor entalpía del pico izquierdo para el primer barrido térmico, se relaciona con una mayor velocidad de difusión. Por este motivo no se realizaron las cinéticas del resto de combinaciones, ya que la duración de cada experimento es de aproximadamente 15 horas y se puede obtener un acercamiento de este resultado con solo un barrido térmico que tarda 30 minutos.

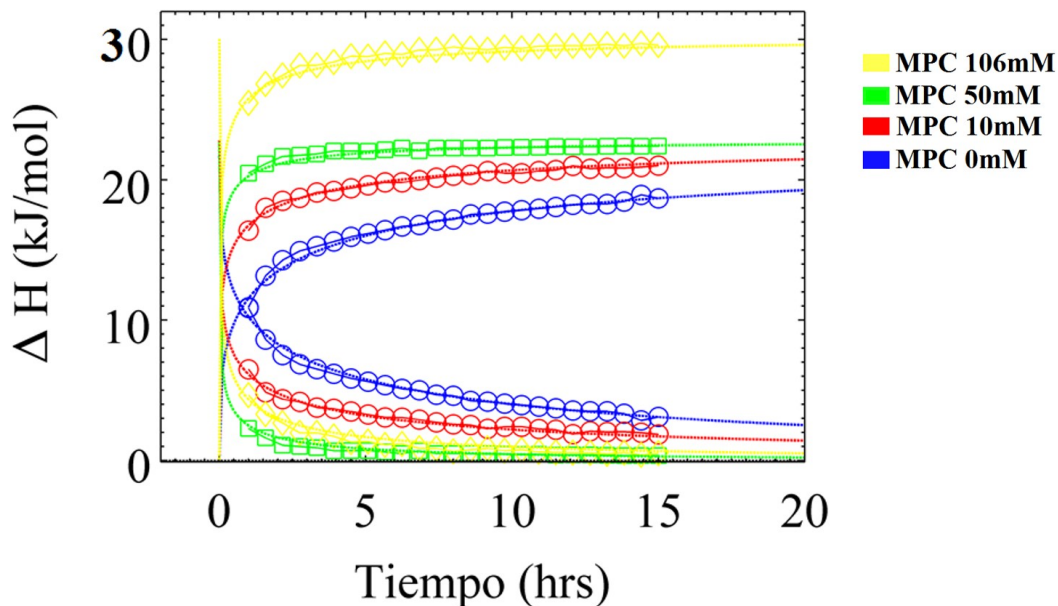


Figura 5.5: Cinética de difusión. Cambio de entalpía en función del tiempo. Secuencia de 30 perfiles calorimétricos de la cinética de difusión de tetracaína-mepivacaína ante una concentración fija de tetracaína (25 mM) y un diferentes concentraciones de mepivacaína. Las curvas superiores corresponden a la entalpía del pico izquierdo de los perfiles calorimétricos y las curvas inferiores al pico derecho.

### Tetracaína-lidocaína

Para el estudio de esta combinación inicialmente se dejó la concentración de la tetracaína fija y se modificó la concentración de la lidocaína, las concentraciones usadas de lidocaína fueron: 69 mM (concentración clínica), 35 mM, 25 mM, 17 mM, 8 mM y 0 mM. Se puede observar en la figura 5.6 los perfiles calorimétricos. A mayor concentración de lidocaína se obtiene un mayor  $\Delta T_m$  así como una mayor entalpía para el pico de la izquierda. Estos resultados sugieren que si bien la lidocaína contribuye a una mayor difusión y a un mayor  $\Delta T_m$ , este  $\Delta T_m$  es de tan solo 1 °C.

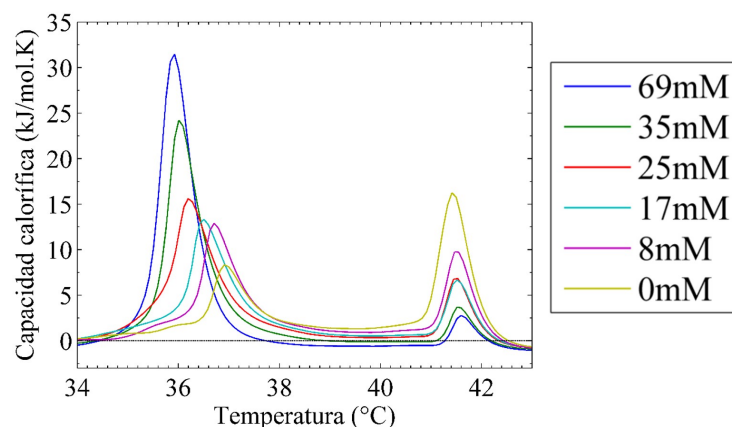


Figura 5.6: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de la combinación tetracaína-lidocaína. La concentración de la tetracaína permanece fija (25 mM) y se realizó un barrido de concentración de lidocaína.

Al dejar fija la concentración de la lidocaína (69 mM) y variar la concentración de la tetracaína; 25 mM (concentración clínica), 12 mM, 6 mM, 3 mM y 0 mM, se observa en la figura 5.7 una variación  $\Delta T_m$  mayor que en el caso anterior, es decir, la tetracaína produce un mayor  $\Delta T_m$  de la combinación. A mayor concentración de tetracaína también se observa una mayor entalpía.

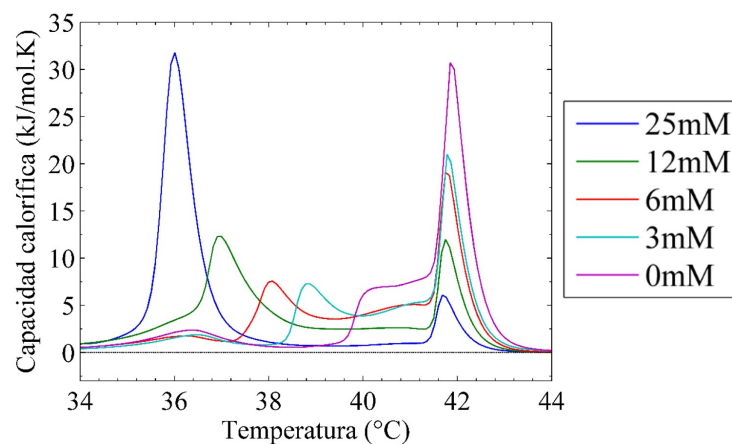


Figura 5.7: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de la combinación tetracaína-lidocaína. La concentración de la lidocaína permanece fija (69 mM) y se realizó un barrido de concentración de tetracaína.

## Lidocaína-prilocaina

Esta combinación es ampliamente usada en la práctica clínica [38]. En la figura 5.8 se puede observar que el efecto de estos dos anestésicos es similar. Al dejar la lidocaína fija a 69 mM (concentración clínica) y variar la prilocaína; 79 mM (concentración clínica), 40 mM, 20 mM, 10 mM, 5mM y 0 mM). Observamos que a mayor concentración hay un mayor  $\Delta T_m$  y una mayor entalpía del pico de la izquierda. Esto es consistente con los resultados de las combinaciones anteriores.

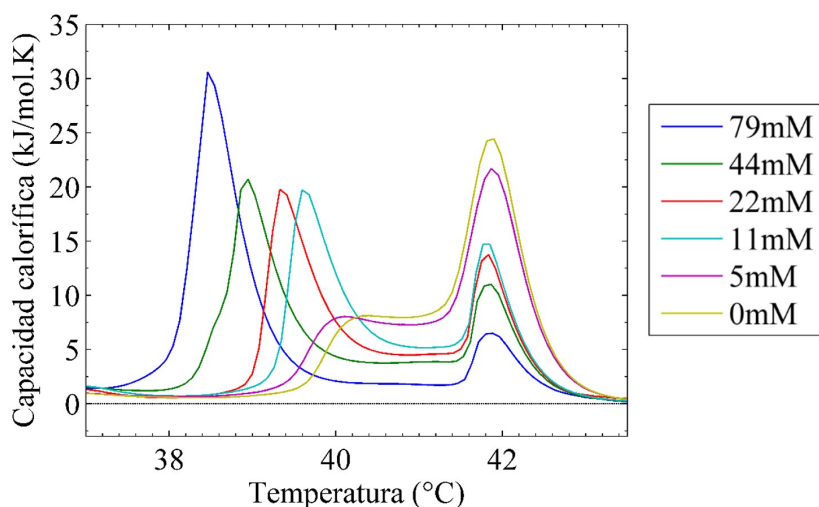


Figura 5.8: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de la combinación lidocaína-prilocaína. La concentración de la lidocaína permanece fija (69 mM) y se realizó un barrido de concentración de prilocaína.

Al dejar fija la concentración de la prilocaína y modificar la concentración de la lidocaína; 69 mM, 35 mM, 17 mM y 8 mM, observamos en la figura 5.9 que el aumento de la concentración de lidocaína no contribuye tanto en el  $\Delta T_m$  de la combinación como la prilocaína del resultado anterior.



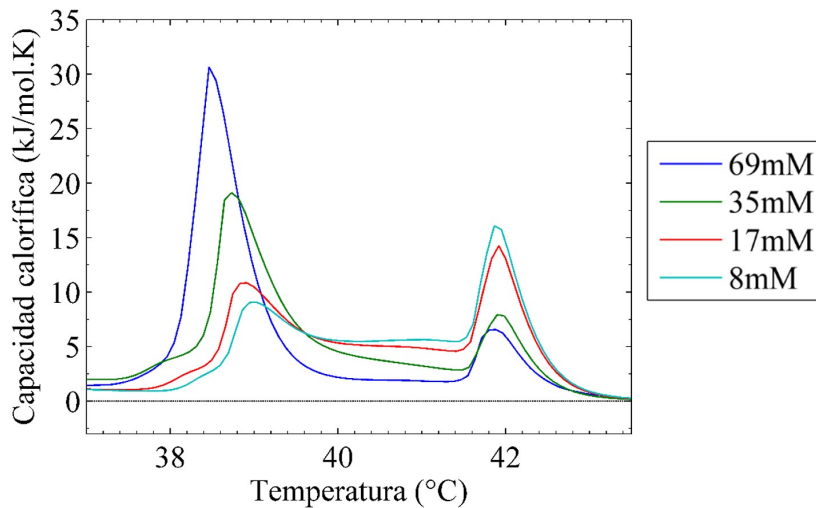


Figura 5.9: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de la combinación lidocaína-prilocaína. La concentración de la prilocaína permanece fija (79 mM) y se realizó un barrido de concentración de lidocaína.

### Tetracaína-procaína

La tetracaína es el anestésico que mayor  $\Delta T_m$  produce y la procaína es el que menor  $\Delta T_m$  produce. Al realizar esta combinación se dejó la concentración de la tetracaína fija y se modificó la concentración de la procaína; 79 mM, 40 mM, 20 mM y 10 mM. Los perfiles calorimétricos se pueden observar en la figura 5.10. Una vez más se observa que para una mayor concentración de procaína el  $\Delta T_m$  aumenta y la entalpía del pico izquierdo también aumenta, sin embargo el corrimiento  $\Delta T_m$  es inferior a 1 °C.

Cuando se dejó la concentración de la procaína fija y se modificó la concentración de la tetracaína; 25 mM, 12 mM, 6 mM, 3 mM y 0 mM. Se observa en la figura 5.11 que el  $\Delta T_m$  es mucho mayor que en el caso anterior, es decir, el anestésico que está regulando en mayor medida el efecto final de la combinación es la tetracaína.

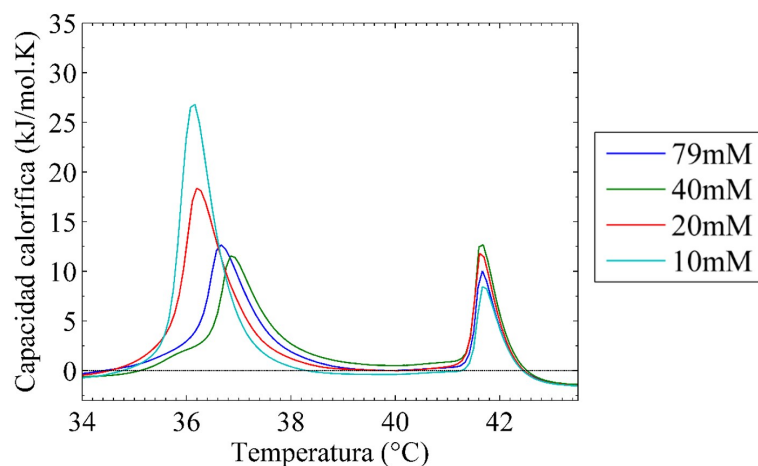


Figura 5.10: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de la combinación tetracaína-procaína. La concentración de la tetracaína permanece fija (25 mM) y se realizó un barrido de concentración de procaína.

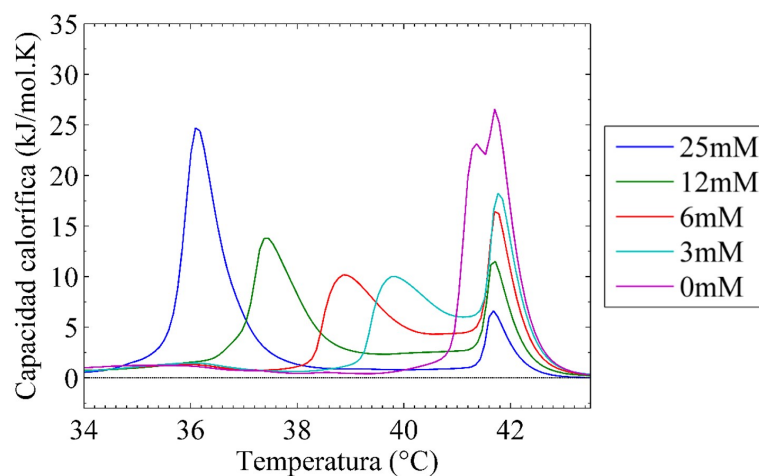


Figura 5.11: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de la combinación tetracaína-procaína. La concentración de la procaína permanece fija (73 mM) y se realizó un barrido de concentraciones de prilocaína.

Todos los resultados de las combinaciones de anestésicos locales son consistentes con los primeros resultados, a mayor corrimiento  $\Delta T_m$  del anestésico en forma individual, mayor contribución en la combinación. Esto a su vez está relacionado como lo mencionamos an-

tes con la potencia del anestésico que a su vez está relacionada con la liposolubilidad de cada anestésico. Por esta razón se decidió realizar una combinación con una molécula más liposoluble: como un anestésico general, por ejemplo. Éstos tienen un mayor coeficiente de partición que los anestésicos locales. El siguiente estudio se basa en la combinación de un anestésico general con un anestésico local.

### **5.3 Efecto de la combinación de anestésico general y local con membranas de lípidos**

#### **Pentobarbital-lidocaína**

Para el estudio de esta combinación la concentración de pentobarbital es de 5mM. En la figura 5.12 se observa el perfil calorimétrico para la interacción de pentobarbital con MLVs, el  $\Delta T_m$  obtenido es de aproximadamente 0.5 °C. El efecto de la lidocaína a una concentración de 69 mM también se puede observar en la misma figura, el  $\Delta T_m$  es aproximadamente de 1.5 °C. Cuando los anestésicos se combinan se obtiene un único pico para el primer barrido de mediciones, esto es interesante debido a que las combinaciones de anestésicos locales siempre generaban dos picos, es decir, los anestésicos locales se difundían por las bicapas externas hacia las bicapas internas de los liposomas. Para el primer barrido de mediciones aun no habían interactuado con todas las bicapas del liposomas y por ello aún se observaba el pico cercano a 42 °C (pico control). El efecto producido por la combinación de estos anestésicos es sinérgico debido a que el  $\Delta T_m$  del pentobarbital es 0.5 °C y el de la lidocaína es 1.5 °C. Se esperaba que si es aditivo el efecto sea menor o igual a 2 °C, sin embargo el  $\Delta T_m$  producido de la combinación de anestésicos al interactuar con las membranas de fosfolípidos es mucho mayor; de aproximadamente 7 °C.

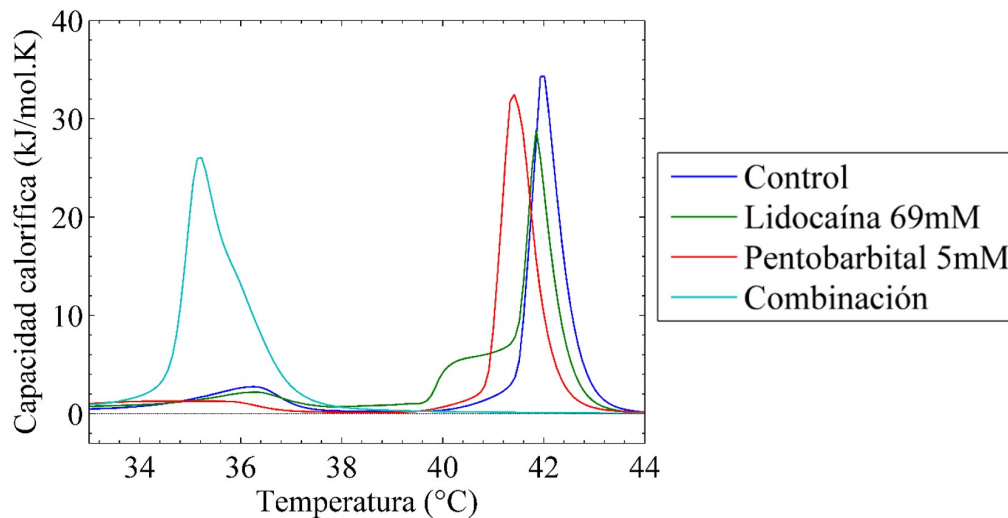


Figura 5.12: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de pentobarbital, lidocaína y pentobarbital-lidocaína.

### Pentobarbital-procaína

Cuando se realizó esta combinación se observó un resultado similar al anterior; el efecto de la combinación es mucho mayor ( $\Delta T_m$  aproximadamente de 7 °C) a la adición de los efectos individuales de la interacción de anestésicos con MLVs. Esto se puede observar en la figura 5.13.

### Pentobarbital-Anestésico local

En la figura 5.14 se puede observar el efecto de la combinación de pentobarbital 5 mM con: tetracaína 25 mM, lidocaína 69 mM y procaína 73 mM. El mayor  $\Delta T_m$  se obtiene al combinar pentobarbital con la tetracaína, seguido de la combinación de lidocaína y por último con la procaína. Para todos los casos el efecto  $\Delta T_m$  es mucho mayor a la adición de los  $\Delta T_m$  individuales y para todos los casos se obtiene un único pico para el primer barrido térmico.

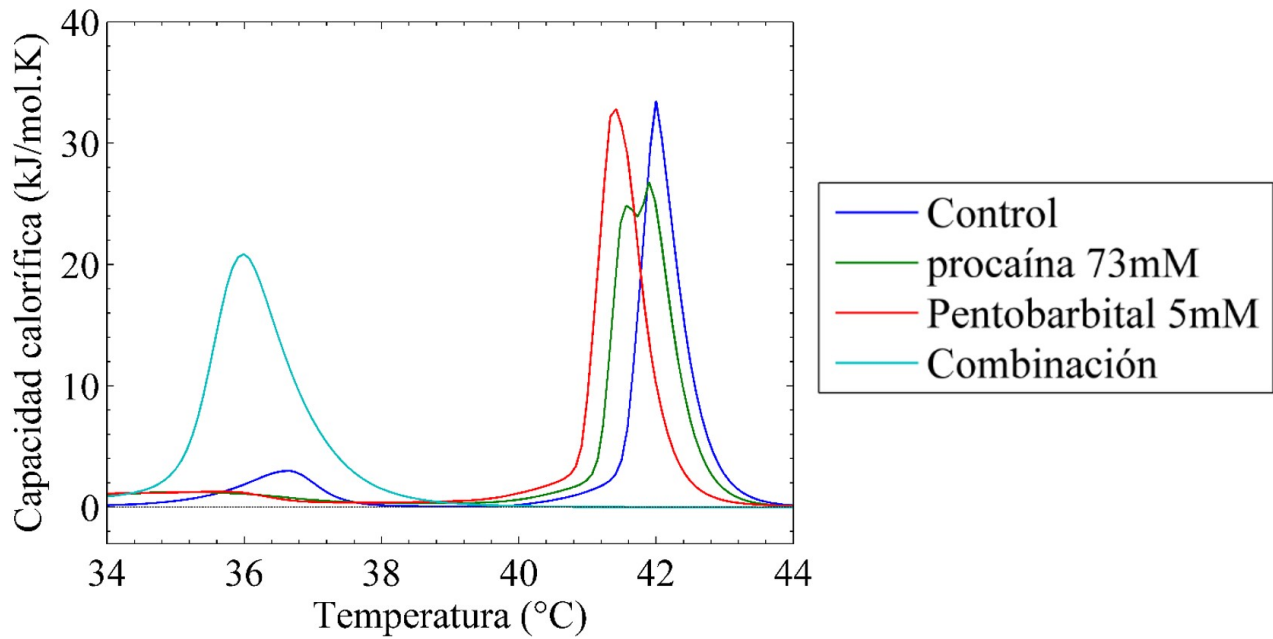


Figura 5.13: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de pentobarbital, procaína y pentobarbital-procaína.

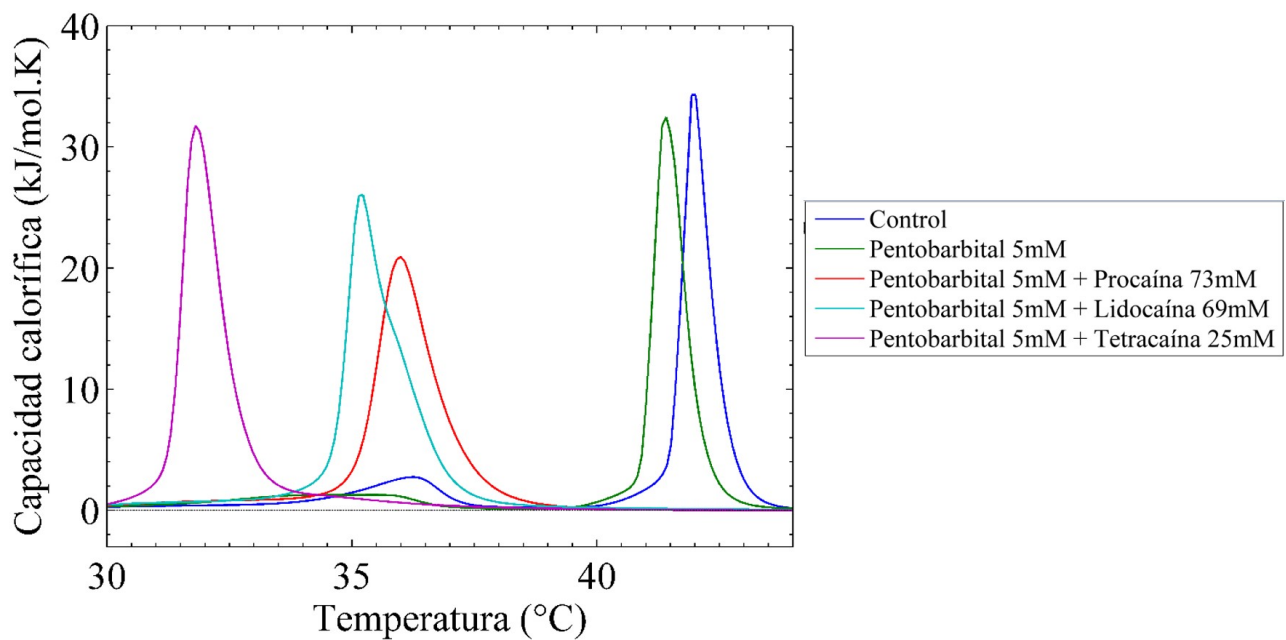


Figura 5.14: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC bajo la influencia de pentobarbital-lidocaína, pentobarbital-procaína y pentobarbital-tetracaína.

## 5.4 Difusión de anestésicos en membranas de lípidos con calcio

El calcio es un ion divalente asociado con procesos inflamatorios, los tejidos inflamados presentan una mayor concentración de calcio [39]. Cuando hay inflamación no se puede anestésiar el tejido [40], estudios en el laboratorio [41] reportan un  $\Delta T_m$  hacia temperaturas mayores, es decir, hacia la derecha; esto se asocia a interacciones que producen rigidización de la membrana. Para este estudio se adicionó el cloruro de calcio 200 mM en el proceso de hidratación de los liposomas de DPPC, esto asegura que el calcio pueda interactuar en todas las bicapas de los liposomas con los fosfolípidos. Los iones divalentes pueden interactuar con las cabezas de los lípidos, de manera que la interacción de coulomb entre el calcio positivo y los fosfatos negativos de las cabezas de los lípidos aumenta la cohesión de la membrana, reflejado en un corrimiento de la transición hacia altas temperaturas. Esta interacción explica la rigidización de las membranas. Los estudios reportados también muestran que la presencia de calcio reduce el efecto ( $\Delta T_m$ ) producido por los anestésicos. La figura 5.15 muestra el perfil calorimétrico de los liposomas con calcio a una concentración de 10 mM, se observa un corrimiento en aproximadamente 0.5 °C hacia la derecha. Esto es consistente con lo mencionado, el calcio está asociado con la rigidización de las membranas de fosfolípidos.

En los estudios anteriores adicionaron el anestésico en el proceso de hidratación de los fosfolípidos y esto permitía observar el efecto final que producía el anestésico en membranas de fosfolípidos con calcio, sin embargo, en este estudio se busca observar la difusión del anestésico. El anestésico se adicionó a los liposomas preparados con calcio, en la figura 5.16 se puede observar el perfil calorimétrico. El efecto de la interacción de tetracaína 25 mM con liposomas con calcio muestra la aparición de un tercer pico, el pico de la izquierda

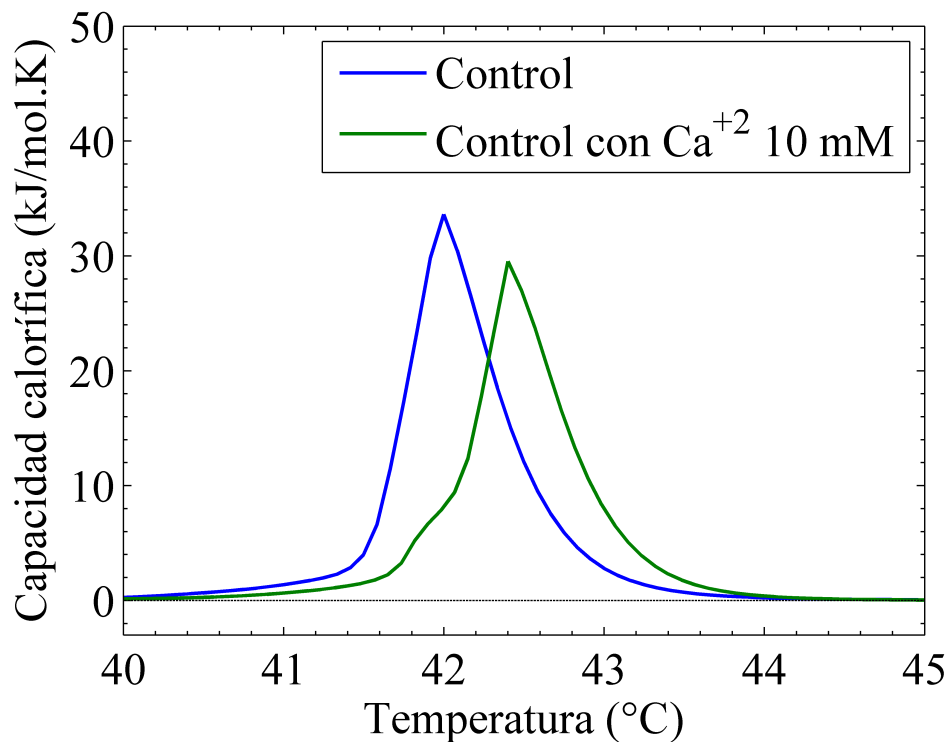


Figura 5.15: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC con calcio 10 mM.

se encuentra aproximadamente a 37 °C, el pico del medio a 39 °C y el pico de la derecha a 42.5 °C, el pico de la izquierda se encuentra aproximadamente a la misma  $T_m$  producto de la interacción de tetracaína con liposomas de DPPC. El pico de la derecha corresponde al pico control de los liposomas de DPPC con calcio 10 mM (aproximadamente a 42.5 °C).

Después de la adición del anestésico los liposomas se incubaron a una temperatura de 25 °C con agitación. Se realizó una segunda medición tres horas después de la adición del anestésico y se puede observar en la figura 5.16 que aunque el pico de la izquierda tiene un pequeño aumento, no hay cambios considerables. Se realizó una tercera medición 24 horas después y se puede observar que aunque el pico de la izquierda aumenta no cambian las características principales del perfil calorimétrico; siguen estando presentes los tres picos. Al realizar un segundo barrido para los casos anteriores se obtienen perfiles calorimétricos

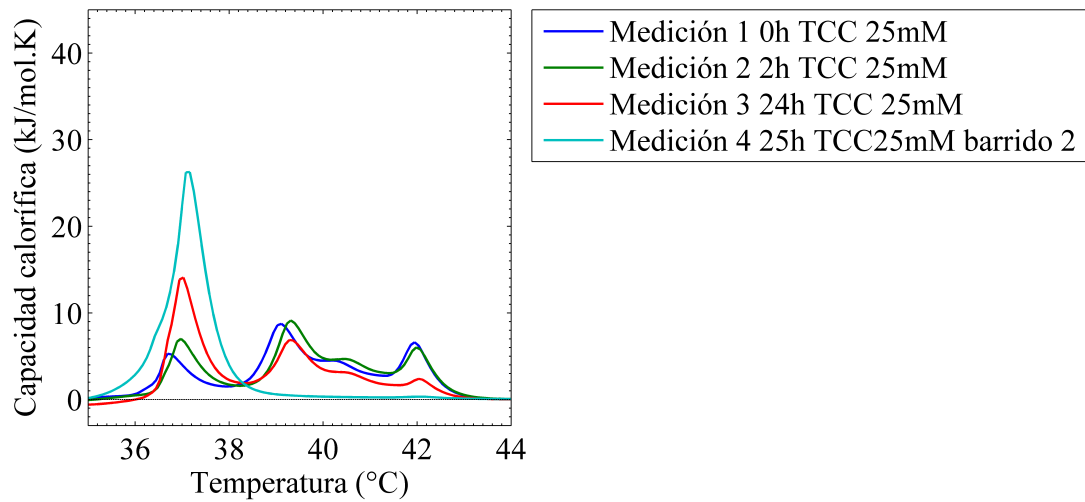


Figura 5.16: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC con calcio 10 mM bajo la influencia de tetracaína 25 mM en función del tiempo. La curva celeste corresponde al perfil calorimétrico obtenido al realizar un segundo barrido de medición.

similares al que se observa en la figura 5.16, los tres picos desaparecen y solo permanece el pico de la izquierda.

En la figura 5.17 se observa la comparación del perfil calorimétrico obtenido de la difusión de la combinación pentobarbital 5 mM y tetracaína 25 mM en MLVs de DPPC con y sin calcio, el efecto es similar para estos casos.



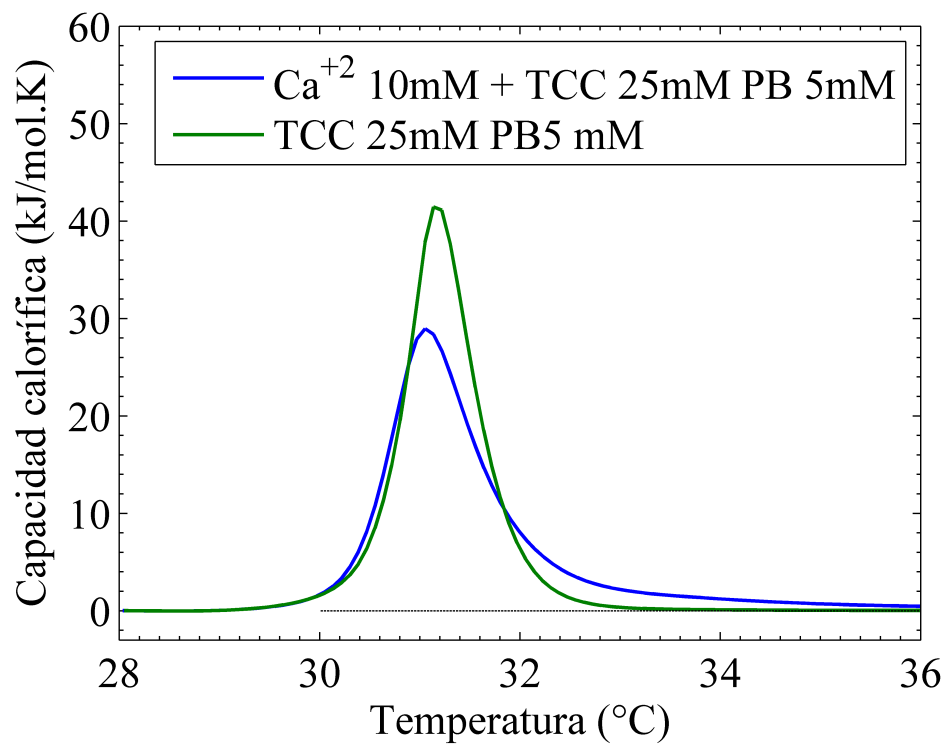


Figura 5.17: Perfiles calorimétricos de liposomas MLVs de DPPC con y sin calcio 10 mM bajo la influencia de pentobarbital 5 mM más tetracaína 25 mM.

# 6

## Discusión

La hipótesis propuesta plantea que la difusión de una mezcla de anestésicos en MLVs está regulada por el cambio de entropía (desorden en la membrana) y los valores de pKa de los mismos. Por medio del estudio termodinámico fue posible obtener información de la energía del sistema y relacionar las características macroscópicas (por ejemplo el  $\Delta T_m$ ) del sistema con las características microscópicas (por ejemplo las interacciones electrodinámicas del anestésico con los lípidos) para una visión global del sistema.

A partir de los resultados de la figura 5.5 se relacionó la cinética de difusión (evolución temporal de la entalpía) con el cambio de entalpía obtenido en el primer barrido térmico (5.4); se relaciona un cambio de entalpía alto para el pico de la izquierda (membranas interactuando con los anestésicos) con una mayor velocidad de difusión de anestésico o combinación de anestésicos. Esto se basa en que la difusión de anestésicos es completamente dependiente de la interacción de los mismos con los lípidos de la membrana plasmática y esto depende de su liposolubilidad. Los anestésicos pueden interactuar con los lípidos y

modificar las propiedades termodinámicas, electroestáticas y mecánicas de la membrana [21].

La liposolubilidad además depende del pH, se ha demostrado que aún con la dependencia del pH los anestésicos deprimen la  $T_m$  [42] [43] [44]. En solución el amino terminal del anestésico local puede estar protonado o neutro, dependiendo del pH de la solución la molécula se puede encontrar en una forma terciaria (no protonada) soluble en lípidos y en una forma cuaternaria (protonada) soluble en agua. Cuando la amina está protonada puede interactuar de forma coulombica con los grupos fosfato de los lípidos que tienen una carga negativa [45] [46] [47]. A pesar de que las diferentes especies tienen un papel crucial en la difusión, nuestros experimentos se realizaron a un pH 4-6 para el cual todos los anestésicos locales utilizados se encuentran protonados, de esta forma se evita tener más de una especie del anestésico local. También es importante resaltar que el pH de la solución al cual se inyectan los anestésicos en su uso clínico (que es el mismo al pH del agua Mili-Q) se encuentra en el rango de pH 4-6.

El corrimiento en la temperatura de transición de un perfil calorimétrico hacia la izquierda está relacionado con un cambio en la membrana que provoca mayor desorden estructural y un cambio hacia la derecha se relaciona con interacciones en la membrana que producen rigidización (orden). Se ha demostrado que algunas moléculas como gramicidina, neurotransmisores y alcoholes producen una depresión en la temperatura de transición de fase, es decir, fluidizan la membrana [40]. También se ha reportado la depresión de la temperatura de transición de fase para los anestésicos generales y para algunos anestésicos locales [36]. Nuestro trabajo permitió observar el corrimiento de  $T_m$  para cada anestésico local, en donde todos los anestésicos locales estudiados produjeron una depresión en la temperatura de transición de fase para MLVs de DPPC. Aunque existen reportes del corrimiento en la  $T_m$  debido a anestésicos locales en membranas de lípidos, no se había realizado un estudio termodinámico de la interacción de la mayoría de anestésicos locales utilizados en la práctica

clínica.

Es importante resaltar la relación de la potencia del anestésico con el corrimiento que éste produce. El efecto en  $\Delta T_m$  se relaciona con la potencia de los anestésicos locales reportada. En la figura 5.2 el orden de mayor a menor  $\Delta T_m$  corresponde con una mayor a menor potencia de los anestésicos locales. Siendo más potente la tetracaína seguida de: bupivacaína, ropivacaína, prilocaína, lidocaína, mepivacaína y finalmente procaína. Estudios previos habían reportado la relación del corrimiento en la temperatura de transición de fase en presencia de anestésicos locales [48]. Sin embargo, no se había comparado el efecto de los principales anestésicos locales que se usan actualmente en la práctica clínica ni la relación del efecto en  $\Delta T_m$  con la potencia del anestésico local. Es importante aclarar que la relación de potencia y efecto no es lineal como en el caso de los anestésicos generales volátiles, esto debido a su dependencia con el pH.

También se estudió la temperatura de transición de fase y entalpía de combinaciones de anestésicos locales, en la actualidad se realizan estas combinaciones con el fin de obtener mejores resultados en la anestesia. Se basan en las características reportadas de forma empírica, sin embargo, no es clara la interacción de combinación de anestésicos locales con membranas. Observamos que al combinar anestésicos locales se obtiene un mayor corrimiento  $\Delta T_m$  final y una mayor entalpía del pico de la izquierda para el primer scan, que en los casos en que estos anestésicos actúan en forma individual. Como mencionamos anteriormente, la potencia de los anestésicos está relacionada con el  $\Delta T_m$  producido, podemos inferir que la combinación de anestésicos podría tener una mayor potencia que los anestésicos de forma individual. También observamos una mayor entalpía del pico izquierdo, esto se encuentra relacionado con las membranas por las que ya se ha difundido el anestésico, es decir, la combinación se difundió más rápidamente que los anestésicos de forma individual. Es interesante resaltar que al dejar la concentración fija de alguno de los anestésicos y hacer un barrido de concentraciones del segundo anestésico, el efecto se ve regulado en

mayor medida por el anestésico que individualmente inducía un mayor  $\Delta T_m$  (desorden), la difusión parece estar regulada por el anestésico más potente.

Las combinaciones realizadas muestran que en todos los casos el  $\Delta T_m$  es mayor comparado con los  $\Delta T_m$  individuales, se puede inferir que las combinaciones realizadas pueden tener una mayor potencia, también se obtuvo una mayor difusión de la mezcla en la combinación. Esto nos lleva a pensar que la difusión y efecto ( $\Delta T_m$ ) está regulada por la entropía o desorden de los anestésicos involucrados. Por ejemplo para el caso de la combinación de la tetracaína con procaína (casos extremos en la escala de potencia, figura 1.6 ), cuando se modifica la concentración de procaína hay un cambio  $\Delta T_m$  de aproximadamente 1 °C. Cuando es modificada la tetracaína el  $\Delta T_m$  es de aproximadamente 7 °C, comparado este efecto con el anterior es evidente que la tetracaína en este caso es el anestésico que regula mayormente el efecto de la combinación. El intercambio de entalpías (áreas bajo la curva) entre los picos H1 (pico de la izquierda) y H2 (pico de la derecha) se encuentra relacionada con la difusión de los anestésicos, la entalpía H1 incrementa al aumentar la concentración de los anestésicos. Se puede observar en la figura 5.10 que al aumentar la concentración de procaína, la entalpía del pico izquierdo aumenta rápidamente. Cuando se modifica la concentración de la tetracaína se observa en la figura 5.11 que el aumento de la entalpía se produce más lentamente, esto puede deberse a que la concentración es baja mientras que cuando se modifica la concentración de la procaína la concentración es más alta. Podemos inferir de estos resultados que la entalpía es modificada mayormente por la concentración de la mezcla de anestésicos.

Por los resultados anteriores surgió la idea de estudiar el efecto de una molécula más liposoluble que los anestésicos locales utilizados. Se observó que el  $\Delta T_m$  se relaciona con la potencia y a su vez la potencia está relacionada con la liposolubilidad del anestésico. Todos los experimentos realizados se realizaron con agua mili-Q como agente hidratante y debido a que es importante mantener los protocolos de preparación para poder comparar

los efectos fue necesario hacer uso de una molécula que se pudiera agregar en solución a los liposomas. Las moléculas que cumplen con la característica de ser más liposolubles son los anestésicos generales, el pentobarbital se encuentra en solución y es posible adicionarlo a los liposomas sin alterar el protocolo de preparación mencionado.

Se realizaron experimentos con anestésicos que producen un corrimiento  $\Delta T_m$  alto, medio y bajo combinados con el anestésico general pentobarbital, los resultados son sorprendentes en cuanto al efecto  $\Delta T_m$  y la entalpía del pico correspondiente a membranas interactuando con los anestésicos (pico izquierdo). Para el caso del pentobarbital- lidocaína se observa que además de producir un mayor corrimiento  $\Delta T_m$ , este corrimiento es muy superior a la adición de sus  $\Delta T_m$  individuales. La combinación pentobarbital-lidocaína, pentobarbital-procaína y pentobarbital-tetracaína, produce en todos los casos un corrimiento  $\Delta T_m$  muy superior a la suma de sus efectos individualmente.

Podemos pensar que hay un efecto sinérgico en la combinación de anestésicos locales con pentobarbital, proponemos que debido a que el pentobarbital tiene un alto coeficiente de partición, éste se difunde rápidamente por las bicapas de lípidos del liposoma y desordena las mismas, por lo cual el segundo anestésico: tetracaína, lidocaína o procaína; puede difundirse más fácilmente por las capas de membrana. El  $\Delta T_m$  producido por la interacción de la combinación de anestésicos con MLVs de DPPC puede deberse a las interacciones de la mezcla con las colas de los fosfolípidos. Cuando los anestésicos interactúan con las membranas en los dominios hidrófobos (corresponden a las colas de los fosfolípidos), las fuerzas Van Der Waals pueden verse disminuidas debido a la interacción con el anestésico y esto puede producir la reducción en la temperatura de transición de fase (se desordena la membrana). También se puede observar un único pico de la combinación, el pico control desaparece, esto indica que la combinación se difundió por todas las bicapas del liposoma para el primer barrido térmico y que ni siquiera las bicapas internas de los liposomas se encuentran libres de la interacción con anestésicos, este efecto es similar al obtenido con

anestésicos generales.

Aunque en la práctica clínica no se obtenga anestesia local con un anestésico general, este efecto podría ser utilizado para regular la difusión de anestésicos locales o mezclas de anestésicos locales.

En la práctica clínica no se pueden anestesiar los tejidos inflamados y debido a que los tejidos inflamados se encuentran relacionados con una elevación en el calcio [49] [50] [40], realizamos un estudio de liposomas con 10mM de calcio . La interacción de iones divalentes con la membrana lipídica neutra es de tipo dipolo monopolo. Esto se debe a la densidad de carga negativa asociada a la cabeza de los fosfolípidos permite la interacción con los iones de calcio. Esta interacción produce un apantallamiento de la membrana suficientemente fuerte como para modificar la estructura y estabilidad de la bicapa lipídica. Además vence la estabilidad que proporcionan las cadenas acilicas (colas) de los fosfolípidos, esto se ve reflejado en el corrimiento hacia la derecha de la  $T_m$ .

Cuando se agrega el anestésico local tetracaína 25 mM a los liposomas con calcio se obtuvo un resultado muy interesante, aparece un tercer pico. Para explicar este fenómeno proponemos que el tercer pico se debe a que el calcio interactúa con las cabezas de los fosfolípidos y esto a su vez rigidiza la membrana. Cuando se adiciona la tetracaína y debido a la rigidización por el calcio, le cuesta más trabajo difundirse por las bicapas de los liposomas. Al interactuar con las bicapas de fosfolípidos externas, se modifica la interacción fosfolípido-calcio y ésta permite que los enlaces calcio con las cabezas de los fosfolípidos se debiliten y el calcio sea expulsado de la membrana. Lo que es consistente con estudios previos de desplazamiento de calcio por anestésicos [51]. Esto sólo ocurriría con las bicapas externas, donde el pico de la izquierda representaría este caso en el que el corrimiento  $\Delta T_m$  es similar al corrimiento cuando no hay presencia de calcio.

Teniendo en cuenta que la interacción de la tetracaína con los fosfolípidos se ve afectada por el calcio puede existir una competencia en la que la tetracaína fluidiza la membrana y el

calcio la rigidiza, este caso correspondería al pico del medio. Las bicapas de la parte media del liposoma podrían estar en este estado, en el cual coexisten e interactúan la tetracaína, el calcio y los fosfolípidos, el corrimiento  $\Delta T_m$  de la tetracaína es inferior que cuando no hay calcio presente. El pico de la derecha corresponde a membranas que no se encuentran interactuando con el anestésico, se puede observar que el pico derecho se encuentra aproximadamente a 42.5 °C, 0.5 °C por encima de la  $T_m$  de los MLVs de DPPC sin calcio. Esto se debe al efecto rigidizante antes mencionado, donde las bicapas internas del liposoma corresponderían al estado mencionado. Estos resultados son consistentes con los estudios reportados, el anestésico no produce el  $\Delta T_m$  esperado debido a la presencia del calcio esto podría indicar que la potencia disminuye, el calcio se convierte en una barrera para el efecto de los anestésicos y esto podría explicar porque los tejidos inflamados no pueden ser anestesiados.



# 7

## Conclusiones

En este trabajo se realizó un estudio termodinámico de la difusión de anestésicos y combinación de anestésicos en membranas de lípidos, el modelo de membrana utilizado fue MLVs de DPPC. También se estudió el efecto de la difusión de anestésicos en liposomas con calcio, donde un aumento de éste en la membrana está relacionado con procesos inflamatorios. Los resultados de estos estudios permiten concluir que:

- a) La interacción de anestésicos locales con membranas de fosfolípidos induce depresión en la temperatura de transición. El efecto en el corrimiento de la temperatura de transición de fase  $\Delta T_m$  está relacionado con la potencia reportada de los anestésicos locales; a mayor  $\Delta T_m$  mayor potencia del anestésico. Esto es consistente con los estudios reportados.
- b) La difusión de la combinación de anestésicos locales está regulada por la entropía (desorden) de los anestésicos de la mezcla misma, el anestésico al que se le asocia un mayor efecto  $\Delta T_m$  individual es quien regula en mayor medida la difusión de la combinación.

- c) La presencia de calcio impide que se presente depresión en la temperatura de transición de fase producida por los anestésicos, es decir, impide el efecto en el corrimiento de la temperatura de transición producida por anestésicos, esto es consistente con los procesos biológicos mencionados.

## **7.1 Perspectivas**

Los resultados obtenidos sobre las combinaciones de anestésicos exploradas en este trabajo ofrecen un acercamiento para comprender la difusión de anestésicos en membranas. Es necesario realizar estudios en membranas que contengan proteínas y lípidos para un mayor acercamiento a las membranas biológicas. Un paso natural sería probar los resultados de este trabajo en modelos de sistemas vivos y en sistemas animales. Esto permitiría estudiar la potencia, duración y tiempo de inicio producidos por la combinación de anestésicos para compararlos con los resultados obtenidos. Además, se podría estudiar el efecto de la combinación de anestésicos en tejidos inflamados de sistemas animales. Esto arrojaría información de la reversión de la anestesia en tejidos inflamados para su uso en la práctica clínica.

# Bibliografía

- [1] Jesús Méndez. SINC La ciencia es noticia. 06 julio 2015, *El funcionamiento de la anestesia continua siendo un misterio*. Disponible en: <http://www.agenciasinc.es/Reportajes/El-funcionamiento-de-la-anestesia-continua-siendo-un-misterio>. 20/06/2017.
- [2] 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.
- [3] L. Brunton, B. Chabner, and B. Knollman, *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill Professional, 12 edition, 2011.
- [4] H. Meyer, *On the theory of alcohol narcosis: first communication. Which property of anesthetics determines its narcotic effect?*. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 1899, 425:109–118. 1986.
- [5] R. Lipnick, editor. Verlag Gustav Fischer, [*Overton, C. E. 1901. Studies of Narcosis*. Chapman and Hall. Jena, Germany, 1991.
- [6] Lipnick R.L. Charles Ernest Overton, *narcosis studies and a contribution to general pharmacology*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 7:161-164. 1986.
- [7] 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.
- [8] T. Heimburg & A. D. Jackson, *On soliton propagation in biomembranes and nerves*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102:9790–9795, 2005.

- [9] 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.
- [10] Cameron J Weir, *The molecular mechanisms of general anaesthesia: dissecting the gaba receptor*. Continuing Education in anaesthesia, Critical care & Pain, 6(2):49-53,2006.
- [11] Thomas Heimburg. *Thermal biophysics of membranes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.
- [12] 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.
- [13] Maria Kaparakis-Liaskos and Richard L. Ferrero. *Thermal biophysics of membranes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.
- [14] Ubaldo E. Martinez-Outschoorn, Federica Sotgia, and Michael P. Lisanti. *Caveolae and signalling in cancer*, Nature Reviews Cancer, 15(4):225–237, 2015.
- [15] Gilbert Di Paolo and Tae-Wan Kim. *Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond*, Nature reviews. Neuroscience, 12(5):284–296, 2011.
- [16] 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.
- [17] 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.

- [18] 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.
- [19] Daniel Lingwood and Kai Simons, *Lipid rafts as a membrane-organizing principle*, Science (New York, N.Y.), 327(5961):46–50, 2010.
- [20] Francisco Javier Sierra-Valdez, J.C. Ruiz-Suárez, Ilse Delint-Ramirez. *Pentobarbital modifies the lipid raft-protein interaction: a first clue about the anesthesia mechanism on NMDA and GABAA receptors*. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA), Biomembranes, Volume 1858, Issue 11, Pages 2603–2610, 2016.
- [21] Sierra-Valdez FJ. *Interacción de anestésicos con membranas artificiales y biológicas (tesis de doctorado)*. Cinvestav, Monterrey, México. 2015.
- [22] Ruetsch, Y. A., T. Boñi, and A. Borgeat. *From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs*. Curr. Top. Med. Chem. 1:175–182, 2001.
- [23] James E. Heavner. *Local anesthetics*. Cortesía de David A. Scott, Melbourne, Australia, 2000.
- [24] Heavner, J.E. *Pharmacology of local anesthetics*. In D.E. Longnecker et al (eds) Anesthesiology New York: McGraw-Hill Medical, 2008.
- [25] Morgan, G.E., Mikhail, M.S., Murray, M.J. *Local Anesthetics*. In G.E. Morgan et al Clinical Anesthesiology, 4th edition. New York: Lange Medical Books. 2006.
- [26] Stoelting, R.K. & Hillier, S.C. *Pharmacology and pharmacodynamics of injected and inhaled drugs*. In R.K. Stoelting & S.C. Hillier (eds) Pharmacology & Physiology in Anesthetic Practice, 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2006.

- [27] Strichartz, G.R. & Berde, C.B. *Local Anesthetics*. In R.D. Miller Miller's Anesthesia, 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. 2005.
- [28] Berde CB, Strichartz GR. *Local anesthetics*. Miller R, ed. Miller's Anesthesia. 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone: pp. 933–939 2010.
- [29] David Lussier, Pierre Beaulieu. Adjuvant Analgesics. *Adjuvant analgesics*, Oxford American Pain Library, 2015.
- [30] Rudolph H. de Jong, M.D.; John D. Bonin. *Mixtures of local anesthetics are no more toxic than the parent drugs*, Anesthesiology 3, Vol.54, 177-181. 1981.
- [31] Ribotsky BM1, Berkowitz KD, Montague JR. *Local anesthetics. Is there an advantage to mixing solutions?*, 2011.
- [32] Golman, Fozzard, H. A., M. F. Sheets, and D. A. Hanck. *The sodium channel as a target for local anesthetic drugs*. Front. Pharmacol. 2:68, 2011.
- [33] Seydel, J. K., Coats, E. A., Cordes, H. P. and Wiese, M. *Drug Membrane Interaction and the Importance for Drug Transport, Distribution, Accumulation, Efficacy and Resistance*, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem., 327: 601–610. doi:10.1002/ardp.19943271002. 1994.
- [34] 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.
- [35] 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.

- [36] Graesboll, K, Sasse-Middelhoff, H & Heimburg. *The Thermodynamics of General and Local Anesthesia*. Biophysical Journal, vol 106, no. 10, pp. 2143-2156. DOI: 10.1016/j.bpj.2014.04.014. 2014.
- [37] G. A. Jamieson & D. M. Robinson. *Mammalian cell membranes*. volume 2. Butterworths, London, 1977.
- [38] Anna Taddio, M.Sc., Bonnie Stevens, Ph.D., Kenneth Craig, Ph.D., Pratap Rastogi, M.D., Shlomit Ben-David, M.D., Andrew Shennan, M.D., Peggy Mulligan, R.N., and Gideon Koren, M.D. *Efficacy and Safety of Lidocaine–Prilocaine Cream for Pain during Circumcision*. N Engl J Med; 336:1197-1201 April 24, DOI: 10.1056/NEJM199704243361701. 1997.
- [39] Terez Shea-Donohue, Luigi Notari, Rex Sun, Aiping Zhao. *Mechansims of smooth muscle repsonses to inflammation*. Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society 24.9: 802-811. PMC. Web. 10 July 2017. 2012.
- [40] Heimburg, Thomas, and Andrew D. Jackson. *The Thermodynamics of General Anesthesia*. Biophysical Journal 92.9 (2007): 3159–3165. PMC. Web. 18 July 2017.
- [41] Sierra-Valdez FJ, Forero-Quintero LS, Zapata-Morin PA, Costas M, Chavez-Reyes A, Ruiz-Suárez JC. *The Influence of Non Polar and Polar Molecules in Mouse Motile Cells Membranes and Pure Lipid Bilayers*. Lorenz C, ed. PLoS ONE. 8(4):e59364. doi:10.1371/journal.pone.0059364. 2013.
- [42] D. E. Becker and K. L. Reed. *Essentials of local anesthetic pharmacology*. Anesth. Prog., 53:98–109, 2006.

- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] R. C. Bernardi. *Molecular dynamics study of biomembrane/local anesthetics interactions*. Mol. Phys., 107:1437–1443, 2009.
- [48] Seeger HM, Aldrovandi L, Alessandrini A, Facci P. *Changes in Single K<sup>+</sup> Channel Behavior Induced by a Lipid Phase Transition*. Biophysical Journal. 99(11):3675-3683. doi:10.1016/j.bpj.2010.10.042. 2010.
- [49] Ru-Rong Ji, Zhen-Zhong X & Yong-Jing Gao *Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain*. Nature Reviews Drug Discovery 13, 533–548 (2014) doi:10.1038/nrd4334
- [50] Diego Brancaccio, Ciro Tetta, Maurizio Gallieni & Vincenzo Panichi *Inflammation, CRP, calcium overload and a high calcium–phosphate product: a ‘liaison dangereuse’*. Nephrol Dial Transplant (2002) 17 (2): 201-203. DOI: <https://doi.org/10.1093/ndt/17.2.201>, Published: 01 February 2002



[51] Low, PS, Lloyd, DH, Stein, TM & Rogers, JA *Calcium displacement by local anesthetics. Dependence on pH and anesthetic charge.* Journal of Biological Chemistry, vol 254, no. 10, pp. 4119-4125. 1979.