



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Unidad Monterrey**

**LA TERMODINÁMICA DE MEMBRANAS  
ARTIFICIALES BAJO LA INFLUENCIA DE  
MOLÉCULAS POLARES Y NO POLARES**

Tesis que presenta

**Linda Stephanie Forero Quintero**

Para obtener el grado de

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

Director de la Tesis

Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez

Apodaca, Nuevo León

Agosto, 2012

## Agradecimientos

Quiero agradecer a mi asesor el Dr. Carlos Ruiz, por su guía y paciencia durante todo este proceso, por embarcarme en el camino de la investigación, por enseñarme a preguntar más allá de lo obvio, por hacerme entender que los experimentos casi nunca salen a la primera, por su apoyo, por su calidad humana, por esto, por tantas otras cosas más y sobretodo por su amistad y afecto gracias Doc.

Quiero agradecer de modo especial a los doctores: Miguel Costas, Rubén Cadena, Arturo Chávez, Daniel Sánchez y Moisés Santillán, por todo el apoyo brindado en cuanto al aprendizaje de técnicas y protocolos de laboratorio, por sus sugerencias y críticas para el enriquecimiento mi proyecto.

A CONACyT por brindarme una beca para realizar mis estudios de maestría.

También quisiera agradecer a mis compañeros de laboratorio por acompañarme en esta travesía, a Fabiola Guitiérrez, Felipe Pacheco, Juan Manuel Solano, Francisco Sierra, Iván Cipriano y Patricio Zapata, gracias por su compañía, por su amistad, por sus consejos, por sus críticas, por sus ideas y sus locuras. Agradezco enormemente a mis amigos incondicionales durante mi estancia en México, Joel Sánchez, Luis Aguilera y Pamela Vásquez, gracias por brindarme su amistad y cariño, gracias por hacerme sentir parte de su familia y no sólo como la colombiana.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia (Tita, Mami, Mile y Pipe), quienes son mi motor, la razón por la que despierto cada mañana, gracias por siempre confiar en mi y apoyarme incondicionalmente en todas y cada una de mis decisiones, gracias por estar siempre presentes y por demostrarme siempre su amor, este nuevo logro es dedicado a ustedes.

**Linda**

**Agosto 2012, Monterrey-México.**

# Índice general

Índice de Figuras	IV
Índice de Tablas	VI
Abreviaturas	VIII
Resumen	IX
Abstract	X
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Biomembranas . . . . .	2
1.2. Permeabilidad en la Membrana: Canales Iónicos vs Poros Lipídicos . . . . .	6
1.2.1. Canales Iónicos . . . . .	7
1.2.2. Poros Lipídicos . . . . .	10
1.2.3. Transición de Fase Lipídica . . . . .	14
1.3. Moléculas polares y no polares en la interacción con las membranas . . . . .	17
<b>2. Objetivos</b>	<b>25</b>
2.1. General . . . . .	25
2.2. Particulares . . . . .	25
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>26</b>
3.1. Materiales . . . . .	26
3.2. Métodos . . . . .	27
3.2.1. Preparación de Liposomas . . . . .	27

3.2.2. Microcalorimetría Diferencial de Barrido . . . . .	30
3.2.3. Análisis de las Curvas Calorimétricas . . . . .	32
<b>4. Resultados</b>	<b>37</b>
4.1. Análisis del Efecto producido por la Tetracaína . . . . .	38
4.2. Análisis del Efecto producido por la Cafeína . . . . .	42
4.3. Análisis del Efecto producido por la Combinación de Tetracaína y Cafeína	43
4.4. Comparación de una membrana lipídica artificial con la membrana plasmática de una célula motil . . . . .	46
<b>5. Discusión</b>	<b>53</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>61</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>63</b>

# Índice de figuras

1.1. Modelo de Membrana celular propuesto por Singer y Nicholson . . . . .	4
1.2. Composición Lipídica de la membrana Plasmática . . . . .	4
1.3. Esquema de la estructura química de dos Fosfolípidos. . . . .	5
1.4. Receptor de Acetilcolina regulado por ligando (AChR). . . . .	9
1.5. Canal iónico de sodio regulado por voltaje. . . . .	9
1.6. Permeabilidad de las bicapas lipídicas. . . . .	11
1.7. Esquema de una transición de fase lipídica. . . . .	15
1.8. Configuraciones de las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos en una transición de fase. . . . .	16
1.9. Regla de Meyer-Overton. . . . .	20
1.10. Estructura química de las moléculas de Tetracaína y Cafeína. . . . .	22
3.1. Esquema del proceso de preparación de Liposomas . . . . .	29
3.2. Esquema de un Calorímetro DSC . . . . .	31
3.3. Curva Calorimétrica Típica para un Arreglo de Lípidos . . . . .	34
4.1. Curvas calorimétricas de liposomas control bajo diferentes dosis de tetracaína	39
4.2. Capacidad Calorífica máxima Vs Dosis de tetracaína . . . . .	40
4.3. Curva Dosis-Respuesta (Control + Tetracaína) . . . . .	40
4.4. Curvas calorimétricas de liposomas control bajo diferentes dosis de cafeína	42
4.5. Capacidad Calorífica máxima Vs Dosis de cafeína . . . . .	43
4.6. Curvas calorimétricas de liposomas control bajo diferentes dosis de tetracaína y 111mM cafeína . . . . .	44

4.7. Comparación de los perfiles calorimétricos para los experimentos realizados con Tetracaína y la combinación Tetracaína-Cafeína. . . . .	45
4.8. Comparación de las curvas de dosis-respuesta para los experimentos realizados con tetracaína y la combinación tetracaína-cafeína. . . . .	46
4.9. Resultados de los experimentos de motilidad obtenidos por Sierra F. . . . .	48
4.10. Resultados Experimento 1-Modelo con liposomas. . . . .	50
4.11. Resultados Experimento 2-Modelo con liposomas. . . . .	50
5.1. Representación esquemática del sistema membrana lipídica-Anestésico. . .	56
5.2. Representación esquemática del sistema membrana lipídica-Anestésico-Estimulante. . . . .	59

# Índice de tablas

1. Lista de Abreviaturas. . . . .	VIII
3.1. Concentraciones de los Fosfolípidos en Almacenamiento. . . . .	27
3.2. Cantidades de Fosfolípidos requeridas en la preparación de Liposomas. . .	27
3.3. Cantidades físicas mantenidas como constantes en el DSCRun y el NanoAnalyze. . . . .	36
4.1. Dosis de tetracaína y las respectivas temperaturas de transición exhibidas por la muestra con cada una de ellas. . . . .	38
4.2. Dosis de cafeína y las respectivas temperaturas de transición exhibidas por la muestra con cada una de ellas. . . . .	42
4.3. Conjunto de dosis usadas en los modelos liposomales y sus respectivas temperaturas de transición. . . . .	49
4.4. Dosis de la combinación tetracaína + 111mM cafeína y las respectivas temperaturas de transición exhibidas por la muestra con cada una de ellas.	52

# Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Nombre completo
BLM	Black Lipid Membrane
$C_p$	Capacidad Calorífica a presión constante
DMPC	1,2-Dimiristoil-sn-Glicerol-3-Fosfocolina
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPPA	Dipalmitoil Ácido Fosfatídico
DPPC	1,2-Dipalmitoil-sn-Glicerol-3-Fosfocolina
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
FL	Fosfolípido
LUVs	Vesículas Unilamelares grandes
mMC	Concentración en mM de Cafeína
mMT	Concentración en mM de Tetracaína
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
SAXS	Dispersión de Rayos X de Ángulo Bajo
SNC	Sistema Nervioso Central
$T_m$	Temperatura de transición de Fase (de la fase gel a la fase fluida)

Cuadro 1: Lista de Abreviaturas.



# Resumen

En el presente proyecto se investigó el mecanismo de interacción de la tetracaína (anestésico local), la cafeína (molécula estimulante del sistema nervioso central “SNC”), el calcio (catión divalente) y combinaciones de ellos con una bicapa lipídica compuesta por 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (DPPC) y dipalmitoil ácido fosfatídico (DPPA) en una proporción 95:5 relación mol/mol. A través de la técnica de Microcalorimetría se estudiaron los perfiles calorimétricos exhibidos por las bicapas lipídicas bajo su interacción con diferentes dosis de las moléculas mencionadas anteriormente.

En nuestra investigación se encontró que la tetracaína y la cafeína actuando independientemente, eran capaces de disminuir la temperatura de transición de la fase gel a la fase fluida en la bicapa lipídica estudiada (incremento en su fluidez y compresibilidad). Mientras que, el calcio generó un incremento de la temperatura de transición de la bicapa lipídica (disminución de su fluidez y compresibilidad). Por otro lado, se obtuvo que tanto la cafeína como el calcio lograban actuar sobre la bicapa lipídica revirtiendo el efecto producido por la tetracaína, lo que se evidenció en el aumento de la temperatura de transición (rigidizan el sistema).

Adicionalmente, se compararon los resultados obtenidos por Sierra F. [1] en el estudio de la motilidad del espermatozoide bajo su interacción con agentes inhibitorios y excitatorios. Se encontró que a las dosis estudiadas, la cafeína y el calcio actuando independientemente sobre la motilidad espermática, poseen comportamientos opuestos a los que se obtuvieron en nuestros modelos con liposomas. Sin embargo, ambos desempeñaron un papel antagónico sobre el efecto producido por la tetracaína.

Nuestros resultados demostraron que la tetracaína produce un efecto de fluidización sobre membranas libres de proteínas, y además su efecto puede ser revertido por acción de iones divalentes como el calcio y por moléculas estimulantes como la cafeína.

# Abstract

In this project we studied the mechanism of interaction of tetracaine (local anesthetic), caffeine (stimulant of central nervous system “CNS”), calcium (cation divalent) and mixtures between them, with a lipid bilayer made of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and dipalmitoyl phosphatidic acid in a molar relation of 95:5. Through Microcalorimetry technique we studied the calorimetric behaviour exhibited by lipid bilayers under interaction with different doses of the molecules described above.

In our inquiry we found that tetracaine and caffeine, acting independently were able of decrease the melting point from gel phase to fluid phase in the studied bilayers (increase fluidity and compressibility). Instead, the calcium generated an increase in the melting point (decrease fluidity and compressibility). On the other hand, we obtained that as caffeine as calcium achieved to act over lipid bilayer reversing the tetracaine effect, it was evident in the increase of melting point (rigidify the system).

In addition, we compared the results obtained by Sierra F. [1] in his study of sperm motility under their interaction with inhibitory and excitatory agents. We found that at the defined doses of caffeine and calcium, when they acted independently in the sperm motility, they had opposite behaviours in contrast with our results in liposome models. Nevertheless, both played an antagonist role under the effect produced by tetracaine.

Our results demonstrated that tetracaine produces a increase in the fluidity of protein-free membranes, as well as, its effect can be reversed by the action of divalent ions as the calcium and stimulant molecules as caffeine.

# 1

## Introducción

*“La célula es la unidad básica estructural y funcional de todos los organismos vivos conocidos”*. Gracias a ella y a su complejo funcionamiento un organismo logra mantenerse en equilibrio y sobrevivir. Una de las tareas más importantes de la célula es la comunicación intra y extra celular, trabajo que se realiza mediante el transporte de iones y moléculas a través de las membranas de ésta. El mecanismo a través del cual se realiza ese transporte ha sido estudiado desde mediados del siglo XIX, destacando dos fuertes teorías desde entonces, una en torno a la acción de proteínas apoyada por los fisiólogos y la otra en torno a la acción de los lípidos.

Las membranas biológicas están constituidas por lípidos y proteínas en una proporción de 50:50, razón molar. La bicapa lipídica permite el paso libre de moléculas pequeñas no cargadas, pero es el mayor obstáculo a la difusión de iones cargados y macromoléculas, por lo que hasta hoy ha sido muy estudiado el paso de este tipo de moléculas a través de proteínas [2] tales como los canales iónicos.

Por ejemplo, uno de los fenómenos que se ha intentando explicar desde este punto de vista es el de la excitabilidad y señalización eléctrica del sistema nervioso [3], donde se ha descrito que los iones de  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$  son los responsables de todo el proceso, y que existe un canal propio que actúa en respuesta específica a algún estímulo que puede ser un cambio de potencial en la membrana, un neurotransmisor o un estímulo químico, estimulación mecánica, entre otros.

Sin embargo, desde los 70s se ha fijado la atención en la bicapa lipídica como uno de los mecanismos de permeación de la membrana sin presencia de proteínas [4], por medio de la formación de poros lipídicos, los cuales podrían ser uno de los mecanismos que contribuye a la efectividad del transporte a través de la membrana.

## 1.1. Biomembranas

Pfeffer (1877), fué uno de los primeros científicos que postuló la existencia de las membranas celulares. Mientras estudiaba la presión osmótica en la célula observó la presencia de una delgada capa que rodeaba el protoplasma celular, además concluyó que esta capa no sólo rodeaba la célula sino que también aislaba los ambientes acuosos [5].

Después del postulado de Pfeffer, se desarrollaron diversas teorías para comprender cuál era la naturaleza de esas membranas:

Overton (1895), estudiando las propiedades osmóticas de las células, encontró que “la permeabilidad de las moléculas a través de la membrana estaba relacionada con el coeficiente de partición entre el agua y el aceite”.

Lagmuir (1917), construyó un instrumento en el que dispersaba una monocapa de lípidos en una interfaz aire-agua, con el objetivo de medir la presión lateral de la monocapa, con lo que concluyó que los grupos de las cabezas lipídicas se dirigían hacia el agua y las colas hidrocarbonadas hacia el aire.

Usando la invención de Lagmuir, Gortel y Grendel (1925), determinaron el área ocupada por lípidos extraídos de globulos rojos, estimando que la cantidad de lípidos por célula era equivalente a formar una doble capa de moléculas alrededor de toda la célula, naciendo de esta forma el concepto de bicapa lipídica como estructura fundamental de las células.

Luego, Danielli y Davson (1935), describieron la membrana celular como un sandwich,

compuesta por una capa de proteínas-lípidos-proteínas, arguyendo que las permeabilidades de las membranas por solutos era explicable dentro de los conceptos de hidrofobicidad e hidrofiliidad.

Posteriormente, Robertson (1958), generalizó el modelo para todas las membranas celulares, suponiendo una bicapa lipídica rodeada de dos capas de proteínas.

Finalmente, se llegó a uno de los modelos de membrana celular más aceptados actualmente, el Modelo del Mosaico Fluido de Singer y Nicholson (1972), esquematizado en la figura 1.1. Este modelo señala que la membrana se compone de lípidos, proteínas y oligosacáridos. Las proteínas son de dos clases, periféricas (quienes se asocian a las membranas mediante interacciones proteína-proteína) e integrales (quienes se insertan dentro de la bicapa lipídica y forman la mayor parte de la fracción protéica de la membrana. Poseen regiones expuestas con proteínas periféricas o glúcidos enlazados en los extremos intra y extracelularmente).

La membrana es vista como una matriz formada por una bicapa lipídica, dentro de los lípidos que la componen se encuentran principalmente: fosfatidilcolina(PC), fosfatidiletanolamina(PE), fosfatidilserina(PS), fosfatidilinositol(PI), esfingiomielina(SM), colesterol(Col) y glicolípidos (figura 1.2). En el modelo de Singer y Nicholson, se propone que las proteínas están rodeadas por una capa de lípidos interactuando fuertemente entre ellos, mientras permanecen altamente influenciados por la presencia de las proteínas. Finalmente, se considera que las membranas biológicas se encuentran en un estado lipídico fluido, en el cual las proteínas pueden difundir [5],[7].

El presente proyecto se centró en el estudio de membranas sintéticas compuestas únicamente por fosfolípidos. Una característica interesante de los organismos vivos es que cada célula e incluso cada organelo posee una composición diferente de lípidos, y se cree que éstos pueden cambiar su configuración en respuesta a cambios en cantidades intensivas como la temperatura, el pH, la presión y la concentración de solvente [5].

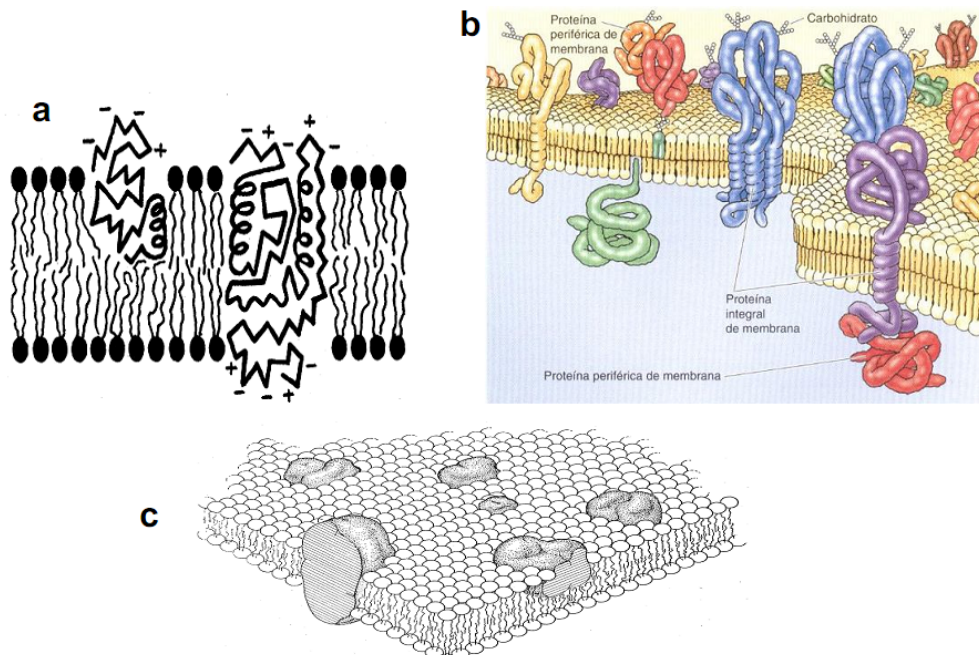


Figura 1.1: **Modelo de Membrana celular propuesto por Singer y Nicholson.** (a) Esquema de una sección transversal de la membrana plasmática con proteínas globulares intercaladas con fosfolípidos. (b) Esquema de una membrana plasmática con sus principales componentes. (c) Esquema tridimensional del modelo de Mosaico Fluido [6], [2].

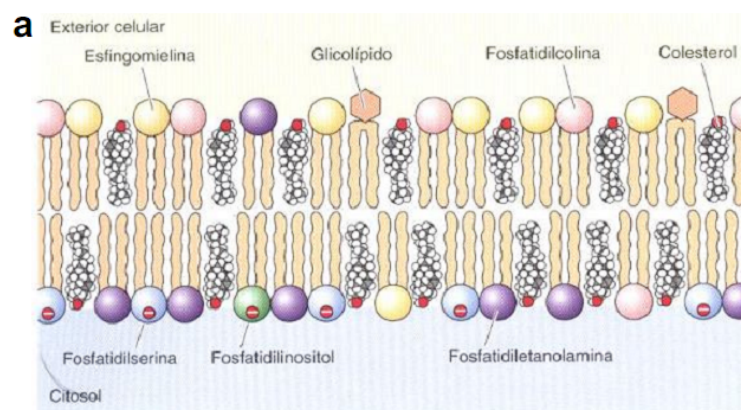


Figura 1.2: **Composición Lipídica de la membrana Plasmática.** (a) Principales lípidos que componen la membrana intra y extracelularmente [2].

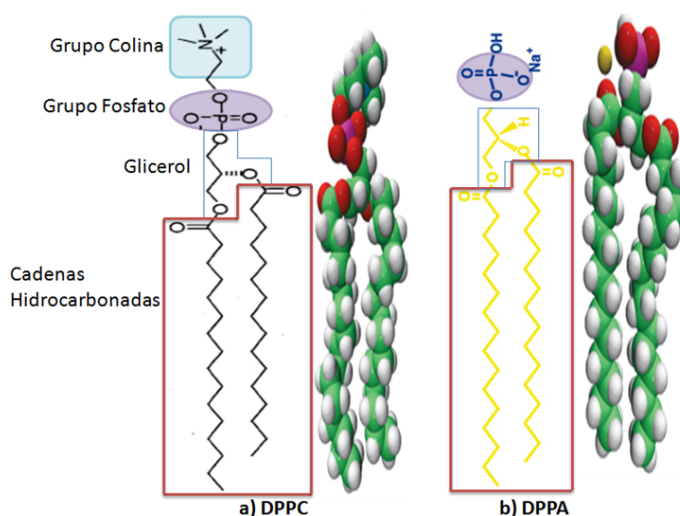


Figura 1.3: **Esquema de la estructura química de dos Fosfolípidos.** (a) Estructura del DPPC, (b) Estructura del DPPA.

En este trabajo se decidió fabricar liposomas en una combinación 95:5  $\frac{mol}{mol}$  de DPPC:DPPA. Se escogió DPPC porque es el fosfolípido que se encuentra en mayor proporción en la mayoría de las células y organelos, además de ser uno de los fosfolípidos más estudiados en trabajos relacionados con arreglos lipídicos como modelos de membranas.

Los fosfolípidos se componen de una cabeza polar y una cola apolar. Por lo general, la cola apolar la forman dos ácidos grasos enlazados a la primera y segunda posición de una molécula de glicerol, mientras que la cabeza polar contiene un grupo fosfato que está enlazado a la tercera posición. Su esquema gráfico se observa en la figura 1.3.

En un arreglo de lípidos: *“las cadenas no polares de los ácidos grasos en los fosfolípidos son secuestradas en el centro lejos del contacto con el agua, maximizando las interacciones hidrofóbicas. Además, los grupos iónicos y Zwitterionicos se encuentran en contacto directo con el agua en la superficie externa de la bicapa, maximizando las interacciones hidrofílicas. En el caso de los fosfolípidos Zwitterionicos como fosfatidilcolina (PC), las interacciones dipolo-dipolo en la superficie de la bicapa podrían contribuir a la estabilización de la estructura de la bicapa. Si la maximización de las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas se logra y el estado de mínima energía libre es alcanzado por*

*una membrana intacta en un ambiente acuoso, las regiones no polares de las proteínas se acomodan a lo largo de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, mientras que las regiones iónicas y los grupos polares de las proteínas, los lípidos y los oligosacáridos deben estar en contacto con el solvente acuoso*". De este modo se concluyó que el modelo de membrana de Singer y Nicholson en comparación con sus predecesores era el más consistente con las restricciones termodinámicas y con los datos experimentales disponibles por esa época [6].

## 1.2. Permeabilidad en la Membrana: Canales Iónicos vs Poros Lipídicos

*La estructura básica de la membrana plasmática es la bicapa lipídica, que es impermeable a la mayoría de las moléculas hidrosolubles. Por lo tanto, el paso de iones y de la mayor parte de las moléculas biológicas a través de la membrana plasmática es mediado por proteínas, que son las responsables del tráfico selectivo de las moléculas tanto al interior como al exterior celular* [2].

La idea de que el transporte de moléculas y el efecto de algunas de ellas sobre la membrana plasmática y el comportamiento celular se realiza principalmente por medio de proteínas transmembranales, es una creencia que se ha tenido desde los inicios del estudio del transporte intramembranal. Esta idea tomó fuerza con los experimentos de Hodgking & Huxley sobre el impulso nervioso en el axón gigante de calamar [3], y los de Neher y Sakmann [8], quienes usando la técnica de patch clamp estudiaron la actividad de canales individuales en las membranas de fibras musculares de rana. De allí en adelante se inició un incremento en el estudio de las proteínas como mediadores del tráfico selectivo de sustancias intra y extracelularmente. Tanto así que actualmente existen muchos tipos de canales iónicos [9], los hay de enlace-ligando [10], mecanosensitivos [11], regulados por segundos mensajeros [12], o regulados por voltaje [13]. Además, fallos en algunos de ellos han sido asociados a diferentes patologías [14], [15], [16], y a otros tantos se les han asignado regiones específicas como sitios de acción de anestésicos [17], [18], [19],[20], [21], [22], [23]. El trabajo de Neher y Sakmann, fue de mucha relevancia en el campo de la medicina



y la fisiología, de allí que les valiera el premio nobel en 1991.

Sin embargo, podría pensarse que por aquellos tiempos se dió una bifurcación entre la teoría de proteínas y la teoría de lípidos, dejando en desventaja a la segunda, cuya investigación también había sido de gran importancia.

Dos años antes del trabajo de Neher y Sakmann, Yafuso *et al* [24], habían estudiado membranas de lípidos puros en condiciones de “voltage clamp”, técnica usada para medir corrientes iónicas a través de membranas, mientras se mantiene el voltaje de la membrana a un nivel dado. Ellos reportaron cambios espontáneos y de múltiples niveles en la conductancia, lo que atribuyeron a canales que se formaban en la película de lípidos.

Aún no se ha encontrado una conexión entre estas dos teorías para tener un pleno entendimiento del transporte de moléculas cargadas y macromoléculas a través de la membrana plasmática, como también permanece oscuro el mecanismo bajo el cual interactúan moléculas anestésicas con la membrana.

A continuación nos permitiremos una breve descripción de la permeabilidad en la membrana a través de proteínas y a través de lípidos.

### 1.2.1. Canales Iónicos

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que forman poros en la membrana plasmática, pueden ser interpretados como una compuerta “gate” que abre o cierra, permitiendo o impidiendo la permeación de iones o moléculas a través de la membrana. Poseen tres características principales: el transporte es sumamente rápido, son altamente selectivos, dado que el paso se restringe a moléculas de tamaño y carga apropiada para el canal y su apertura no es permanente, existen diferentes tipos y actúan de acuerdo al estímulo que se le da a la célula [2].

El papel fundamental de los canales iónicos se le asigna por su acción en la transmisión del impulso nervioso, cuya interpretación fue dada de acuerdo a los experimentos de

Hodking y Huxley (1952), quienes en su trabajo reportaron un cambio en el voltaje en la membrana, debido a la propagación de dicho impulso, que atribuyeron a la apertura o cierre de canales iónicos de  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$ .

En un libro de bioquímica actual se describe el funcionamiento de los canales iónicos regulados por voltaje y por ligando en la transmisión del impulso nervioso como sigue: *“Inicialmente, la membrana plasmática de la neurona presináptica está polarizada por acción de la bomba de  $Na^+-K^+$  ATPase, que bombea fuera de la célula 3 iones de  $Na^+$  por cada 2 iones de  $K^+$  que ingresan. Un estímulo en la neurona causa un potencial de acción que se mueve a lo largo del axón lejos del cuerpo celular. La apertura de un canal de  $Na^+$  regulado por voltaje permite la entrada de  $Na^+$  resultando una depolarización local que causa la apertura del siguiente canal de  $Na^+$  y así sucesivamente. La direccionalidad del movimiento del potencial de acción es asegurada por el periodo refractario, que sigue la apertura de cada canal de  $Na^+$  regulado por voltaje. Cuando la onda alcanza el extremo del axón los canales de  $Ca^{2+}$  regulados por voltaje se abren permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$  a la neurona presináptica. El incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular regula la liberación exocitótica del neurotransmisor acetilcolina en la hendidura sináptica. La acetilcolina se enlaza a un receptor en la neurona postsináptica causando que los canales iónicos regulados por ligando se abran. El  $Na^+$  y el  $Ca^{2+}$  extracelular entran a través de éste canal despolarizando la célula postsináptica.”*[25].

En resumen, para que se transmita una señal eléctrica en la neurona, es necesario el paso de iones de  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$  a través de la membrana, lo que se produce por medio de la activación de canales receptores de ligando (figura 1.4.) o activados por voltaje (figura 1.5.). En ambos casos existe una región especial en la proteína que interactúa con el estímulo, que en el primer caso es de carácter químico y en el segundo se trata de sensibilidad al voltaje debida a un campo eléctrico a través de la membrana. Dichas interacciones producen cambios en la conformación del complejo proteico activando los canales [9].

En la actualidad existe una fuerte escuela dedicada al estudio de los canales iónicos;

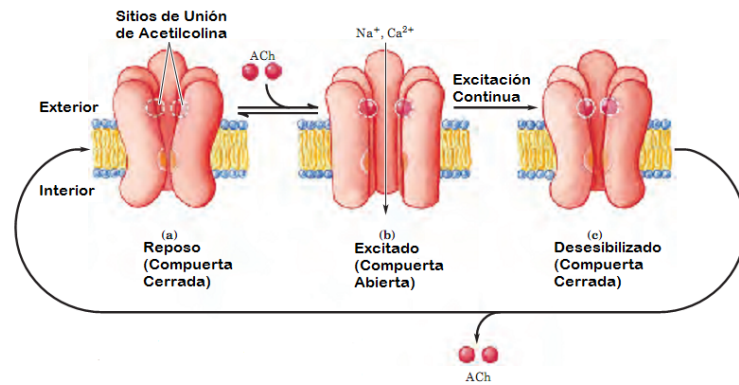


Figura 1.4: **Receptor de Acetilcolina regulado por ligando (AChR)**. (a) AChR en reposo. (b) AChR en estado excitado. (c) AChR desensibilizado.

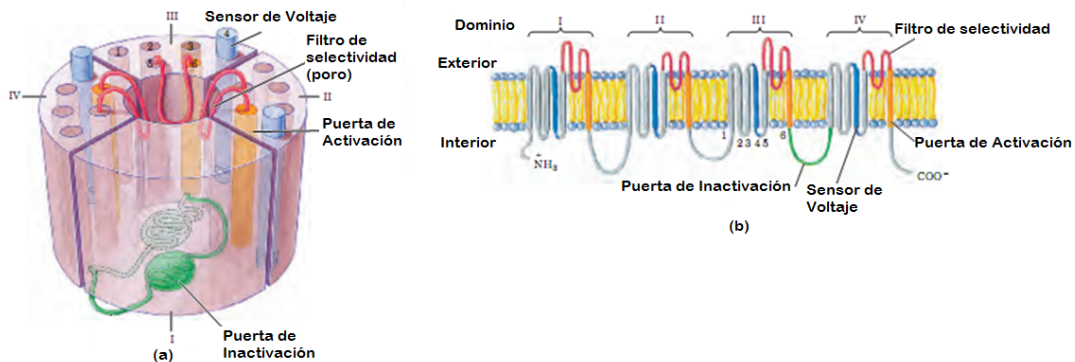


Figura 1.5: **Canal iónico de sodio regulado por voltaje**. (a) Dominios del canal iónico de sodio envueltos en un barril. (b) Dominios del canal de sodio.

su estructura, su función, su actividad e inhibición a través de interacciones en sitios muy específicos de cada canal, entre otros. Por ejemplo, algunos grupos de investigación han encontrado que los canales activados por ligando y voltaje pueden ser inhibidos por anestésicos locales como la tetracaína [26], [27], [28].

Se han desarrollado técnicas muy sofisticadas para dilucidar la estructura de los canales, como la cristalografía de rayos X y la microscopía electrónica. Sin embargo, estas técnicas poseen algunas falencias, debidas a la complejidad que tiene trabajar con proteínas transmembranales fuera de su medio natural, ya que su conformación puede cambiar a causa de variaciones en el medio.

Lo anterior hace pensar que estas técnicas son poco confiables; y si lo son para descifrar

la estructura del canal aún más para determinar específicamente sus sitios de activación, ya que es muy difícil asegurar cuáles y cuántas estructuras moleculares están interactuando con una u otra molécula específica. Además, se debe considerar el hecho de que las configuraciones reales de los péptidos del canal pueden verse alterados por variaciones en la conformación de la proteína.

Sin embargo, cabe resaltar que mediante técnicas de biología molecular, es posible determinar las regiones funcionales de una proteína. Recientemente, en un estudio sobre canales iónicos selectivos a sodio voltaje dependientes (importantes en la propagación del impulso nervioso), mediante la construcción de proteínas recombinantes quiméricas, fue posible determinar aquellos aminoácidos del canal responsables de la sensibilidad a cambios en el voltaje transmembranal. Adicionalmente, por mutagénesis sitio dirigida se determinaron los sitios responsables de la interacción del canal iónico con inhibidores (en este caso toxinas del veneno de tarántula y escorpión) [29].

En este orden de ideas es lógico preguntarse, ¿cómo es que una proteína o un conjunto de ellas puede ser tan selectivo con los diferentes tipos de moléculas únicamente por interacciones electrostáticas o por simple geometría del canal y de la molécula con la que interactúa? ¿Es posible que una proteína transmembranal cambie de configuración y logre reconfigurarse reversiblemente, teniendo en cuenta lo sensibles que son a cambios como la temperatura y el pH? ¿No sería más sencillo atribuirle cierta responsabilidad a la matriz lipídica (que también compone la membrana plasmática) por el cambio de configuración del canal, debido a modificaciones en su conformación a causa de variaciones en cantidades intensivas como la temperatura, la presión lateral o el pH?

Para entender un poco acerca del papel de los lípidos en el tránsito e interacción con moléculas en la membrana plasmática nos permitimos ahondar en el tema a continuación.

### 1.2.2. Poros Lipídicos

La membrana lipídica aún es vista como el mayor obstáculo a la difusión de macromoléculas y iones cargados, de hecho en algunos textos de biología celular se encuentran

imagenes como la de la figura 1.6, donde se indica que ciertas moléculas como la glucosa o iones cargados son incapaces de permear la membrana lipídica, adjudicando esta función de permeación a las proteínas transmembranales, entre ellas, los canales iónicos.

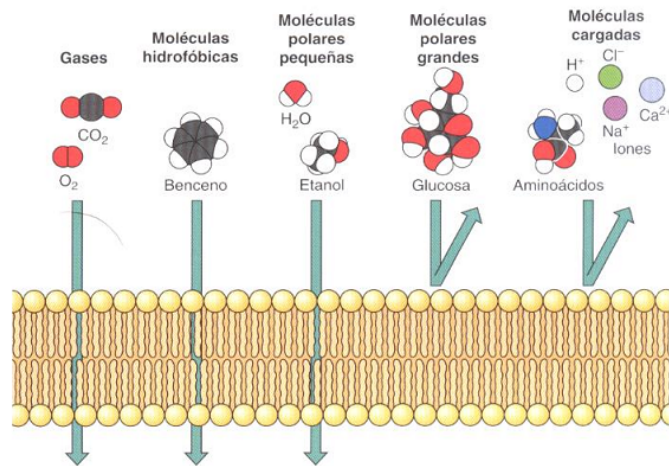


Figura 1.6: Permeabilidad de las bicapas lipídicas según [2].

Existen grupos que se han dedicado a estudiar a la par de los canales iónicos a los poros lipídicos, considerando la idea de que la permeabilidad y la interacción molecular en la membrana plasmática también puede darse a través de los lípidos [28].

En el estudio de la permeación a través de la bicapa lipídica, existen dos mecanismos, por difusión a través de la región hidrocarbonada o por permeación de la bicapa debido a la formación de poros. En este campo, la permeación de agua es uno de los fenómenos más estudiados [30], [31], [32], aunque también se ha estudiado la permeación de moléculas más grandes como la glucosa [33], y de algunos iones como sodio, potasio o litio, entre otros [34], [35]. Dichos estudios dejan en entredicho el hecho de que las membranas lipídicas no participan en el transporte de este tipo de moléculas, y evidencian la subestimación de los poros lipídicos.

Un fenómeno destacado en torno a la permeación de bicapas lipídicas fue hallado por Papahadjopoulos *et al.* [36], quienes encontraron que la permeabilidad iónica a través de la bicapa aumenta en gran medida en la transición de fase.

Por su parte, Boheim G. *et al.* [37], usaron mezclas de lípidos que analizaron durante procesos de calentamiento y enfriamiento, pasando por sus transiciones de fase y observaron fluctuaciones de la corriente cerca de la temperatura de transición, lo cual coincidió con una disminución en la capacitancia de la membrana.

El incremento de la permeabilidad en la transición de fase ha intentado explicarse desde dos posturas: por la formación de dominios en la bicapa, cuya permeación se atribuye a defectos en los mismos [38] o por cambios en la compresibilidad lateral y fluctuaciones del área de la membrana [39].

Una de las técnicas más usadas en el estudio de la permeabilidad iónica en la bicapa lipídica durante la transición de fase es la BLM (Black Lipid Membrane). Esta técnica fue desarrollada por el grupo de Montal y Mueller [40]. En ella se estudiaron las variaciones de la corriente en el sistema causadas por la permeabilidad iónica en una transición de fase; es importante señalar que la BLM, también ha sido usada para estudiar la actividad de canales iónicos. En efecto, en trabajos como el de Antonov A. *et al.* [41], encontraron que la capacitancia variaba justo en las dos temperaturas de transición de los fosfolípidos que componían sus membranas lipídicas, tanto en enfriamiento como en calentamiento.

Por otro lado, Antonov V. *et al.* [35], aprovecharon la técnica de perforación suave, que consistió en reorganizar estructuralmente la bicapa de lípidos formada a partir de fosfolípidos saturados a la temperatura de transición de fase del estado líquido-cristalino al estado gel. Esta técnica les permitió obtener una población de poros lipídicos sin utilizar campos eléctricos fuertes, mediante la cual, lograron estudiar la permeación de algunos iones a través de variaciones en la corriente.

Un trabajo un poco más reciente es el de Wunderlich *et al.* [42], quienes estudiaron fluctuaciones de corriente en membranas de fosfolípidos. Ellos encontraron que, las fluctuaciones permanecen durante un mayor periodo de tiempo a la temperatura de transición del lípido que a temperaturas más elevadas.

Por lo anterior, los poros lipídicos podrían entenderse como canales que se forman en la bicapa lipídica a causa de algún factor externo que produce un cambio en su configuración, generando aberturas que permiten el paso de moléculas durante un cierto periodo de tiempo, mediado por la temperatura de transición de fase de cada composición lipídica.

Según Heimburg T. 2007 [5], los poros lipídicos poseen las siguientes características:

- Exhiben un máximo en su conductancia por iones y moléculas cerca de la transición de fase lipídica, éste incremento puede relacionarse con cambios en la compresibilidad lateral, ej. fluctuaciones del área.
- La ocurrencia de los canales lipídicos depende de variables termodinámicas intensivas como la temperatura, la presión hidrostática, la presión lateral, el pH, la concentración de calcio, entre otros.
- El tiempo de apertura de los canales lipídicos está propablemente relacionado con los tiempos de relajación.

Es importante mencionar que aún no se comprende claramente si la permeabilidad y la interacción de moléculas en la membrana plasmática es mediada únicamente por proteínas, por lípidos o por una conjugación de ambos.

Se han realizado algunos estudios que muestran la influencia que tiene el comportamiento termodinámico de la matriz lipídica sobre algunos canales iónicos. Por ejemplo, Turnheim [43] y Schmidt[44], propusieron que la apertura del canal de potasio es dependiente de la composición lipídica.

En [44] Schimidt D. *et al.*, mostraron que el canal de potasio dependiente de voltaje exhibía una conductancia en membranas lipídicas cargadas negativamente pero no lo hacía en membranas cargadas positivamente.

Ahora bien, lo anterior hace pensar que la función de las proteínas no es independiente de la termodinámica de la matriz lipídica que le rodea. A continuación nos detenemos a revisar un poco acerca del comportamiento termodinámico de una membrana de lípidos.

### 1.2.3. Transición de Fase Lipídica

Una transición de fase es una transformación de un sistema termodinámico de una fase o estado de la materia a otro. Durante la transición de fase de un medio dado ciertas propiedades del medio cambian, con frecuencia discontinuamente, como resultado de una condición externa como la temperatura, la presión, entre otros.

El orden de una transición se clasifica considerando el potencial termodinámico (ej. energía libre de Gibbs ( $G$ )) y su derivada en la transición. Si la primera derivada de  $G$  exhibe una singularidad en el salto, la transición es de 1er orden. Si la primera derivada es continua pero la segunda es singular, la transición es de 2do orden (no nos detendremos a explicarlas).

Las transiciones de fase de primer orden se caracterizan porque durante el salto del sistema de un estado a otro una cantidad conocida como “parámetro de orden” cambia discontinuamente, un ejemplo de ellas es la transición de fase del agua del estado líquido al gaseoso donde el parámetro de orden es la densidad.

Una de las características de las bicapas lipídicas es que tienen la capacidad de cambiar de una fase a otra reversiblemente. Sus transiciones de fase dependen de variables intensivas como la temperatura, la presión, el pH y potenciales químicos de iones como el  $Ca^{2+}$ . Estas variables termodinámicas son capaces de alterar la configuración de una bicapa lipídica y en consecuencia alterar su transición de fase [45],[46]. Un esquema del cambio de configuración de una bicapa lipídica en una transición de fase se observa en la figura 1.7.

De acuerdo a la temperatura a la que se encuentre la membrana, ésta se configura de una manera u otra, a temperaturas menores de la temperatura de transición de los fosfolípidos que la componen, la configuración de la bicapa se encuentra en estado gel,



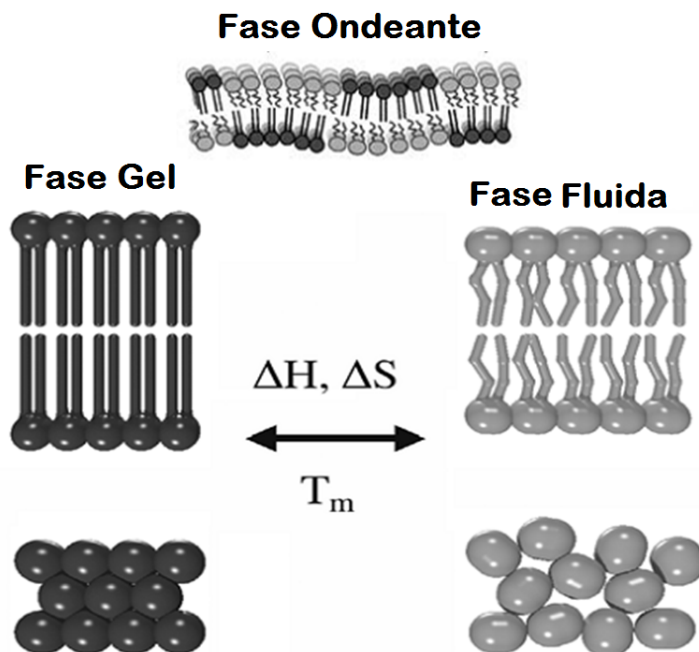


Figura 1.7: **Esquema de una transición de fase lipídica.** La transición va de la fase gel o sólida-ordenada a la fase fluida o líquida-desordenada o en el sentido opuesto a causa de su reversibilidad, pasando por la fase ondeante o ripple justo a la temperatura de transición  $T_m$ , donde la mitad de los fosfolípidos se encuentran en fase gel y la otra mitad se encuentran en fase fluida.

donde las colas de los fosfolípidos se encuentran en configuración “trans”, mientras que a temperaturas superiores a la temperatura de transición, el orden de la bicapa se ve alterado por rotaciones en los enlaces carbono-carbono (C-C) de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, los cuales presentan aleatoriamente isomerizaciones *gauche*<sup>+</sup>, *gauche*<sup>-</sup> y *trans*, como se ejemplifica en la figura 1.8. Allí también se puede observar que al ir de un estado gel a un estado fluido, la configuración de las colas hidrocarbonadas varía de tal forma que el ancho de la bicapa se reduce y la superficie se incrementa [47], [41], [48], lo que se relaciona directamente con la compresibilidad de la bicapa.

### Cantidades Termodinámicas a Considerar en una Transición de Fase

Si se considera que una membrana lipídica sólo se puede encontrar en dos estados, el sólido-ordenado o el líquido-desordenado, su temperatura de transición  $T_m$  se puede interpretar como la temperatura a la cual cualquiera de los dos estados es igualmente probable. En consecuencia, a la  $T_m$  la diferencia de la energía libre en equilibrio de un

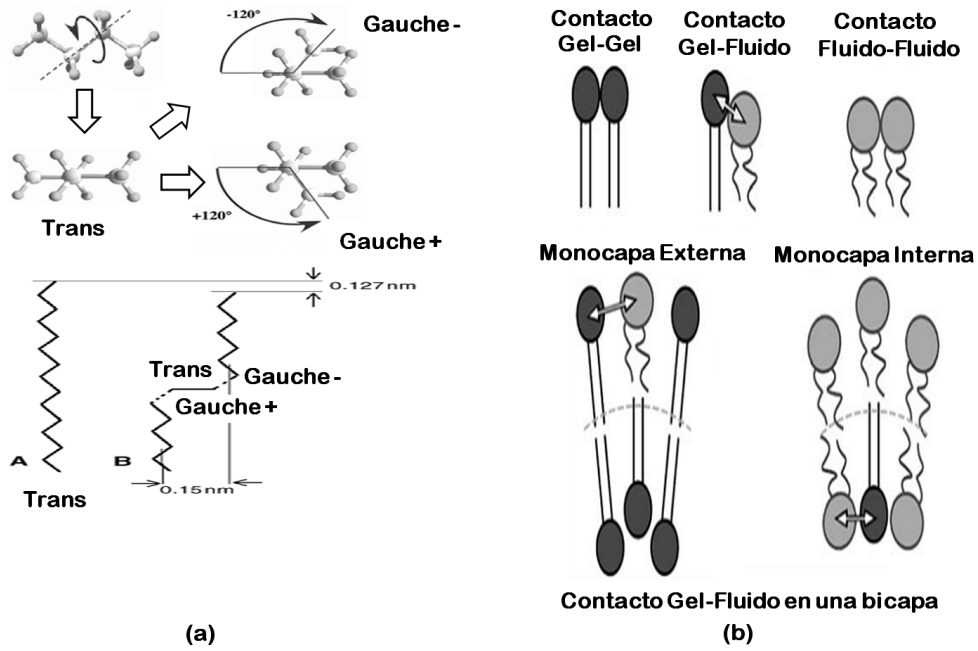


Figura 1.8: **Configuraciones de las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos en una transición de fase.** (a) Superior: Esquema del cambio de configuración sufrida por los enlaces C-C en una cadena de 4 carbonos. Si la configuración es lineal se dice que es una configuración *trans*, si rota alrededor de su enlace central  $120^\circ$  hacia arriba o abajo es una configuración *gauche*<sup>-</sup>, *gauche*<sup>+</sup>, respectivamente. Inferior: Esquema de una cola hidrocarbonada de un fosfolípido antes (A) y después (B) de una transición. (b) Representación de la interacción entre fosfolípidos en una membrana cuando sufre cambios en la configuración de las colas lipídicas.

estado fluido al gel es cero:

$$\Delta G = G_0 - G_s = 0 \quad (1.1)$$

Sabiendo que:

$$\Delta G = \Delta H - T_m \Delta S \quad (1.2)$$

Se obtiene que:

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S} \quad (1.3)$$

Siendo  $\Delta H$  y  $\Delta S$ , la entalpía y entropía en la transición.

Una de las cantidades más importantes a la hora de analizar transiciones de fase es la capacidad calorífica a presión constante  $C_p$ , ya que conociendo esta cantidad física es posible calcular funciones de estado como lo son: la entalpía y la entropía de un sistema durante la transición, lo cual permite caracterizar el sistema ampliamente desde un punto

de vista termodinámico. Una de las técnicas más usadas para medir  $C_p$  es la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), técnica que se usó en el presente proyecto, cuya explicación se amplia en la sección 3.2.2.

Por otro lado, además de las variables termodinámicas mencionadas anteriormente (T, P, pH,  $\mu$ ), algunas moléculas son capaces de alterar la configuración de una bicapa lipídica, generando fluidez o rigidez en la misma según sea su interacción, lo que en consecuencia se ve directamente reflejado en un cambio en la temperatura de transición de fase de la membrana. A continuación nos permitimos indagar un poco acerca del comportamiento y características de algunas de ellas en su interacción con la bicapa lipídica y su influencia en la transición de fase.

### **1.3. Moléculas polares y no polares en la interacción con las membranas**

Las moléculas no polares o hidrofóbicas son aquellas que son incapaces de mezclarse con el agua, es decir, este tipo de moléculas no interaccionan con las moléculas de agua ni por interacciones ion-dipolo ni mediante puentes de hidrógeno. Un ejemplo de ellas son los hidrocarburos saturados, como las colas de los fosfolípidos. Por otro lado, las moléculas polares o hidrofílicas poseen la capacidad de interactuar con el agua, dado que su estructura química así lo permite.

Retomando la estructura de los fosfolípidos (figura 1.3.), ellos poseen una estructura que se denomina anfifílica, es decir, son moléculas que poseen una región polar (cabeza hidrofílica) y otra no polar (colas hidrofóbicas). La región polar corresponde al grupo fosfato, la molécula de glicerol y el grupo característico que determina el tipo de fosfolípido, mientras que la región no polar corresponde a las cadenas hidrocarbonadas. Es por ello que al hidratar fosfolípidos, éstos se arreglan del modo más estable posible y energéticamente menos costoso, formando liposomas, cuyas vesículas están configuradas por una doble capa de fosfolípidos, asemejando la bicapa lipídica de una membrana real.

Por otro lado, un fenómeno interesante cuyo mecanismo permanece sin comprenderse por completo es el proceso de anestesia. Hasta la fecha se han encontrado un gran número de sustancias que son capaces de provocar anestesia (desde moléculas orgánicas e inorgánicas hasta gases nobles), como también se ha discutido acerca de los mecanismos de acción y sitios de unión de moléculas anestésicas en la membrana celular de las neuronas, particularmente en proteínas. De hecho, está tan infundada la idea de que la anestesia actúa en sitios muy específicos de las proteínas transmembranales que para cada anestésico existe un sitio de unión específico en alguna proteína, y al interactuar entre sí producen una inhibición de la transmisión de información en el sistema nervioso central (SNC) o en los nervios periféricos, según el tipo de anestésico.

En particular, se cree que los anestésicos locales influyen sobre la función de los canales iónicos de sodio [49], canales receptores de acetilcolina [27], o siendo aún más específicos existen trabajos que como el de Fodor, *et al.*[50], donde la tetracaína bloquea canales regulados por nucleótidos cíclicos. Habría que preguntarse si tanta especificidad continua siendo viable incluso con moléculas anestésicas tales como el xenón, ¿es posible que por cada sustancia anestésica exista un canal que se pueda bloquear? Esto, considerando que las sustancias analgésicas son tan diferentes entre sí en cuanto a sus propiedades químicas y físicas, además su efecto farmacológico es tan dispar que aún no se ha logrado llegar a un consenso general que determine el mecanismo esencial de la anestesia, de allí que éste sea uno de los enigmas de la farmacología actual.

Por otro lado, se han realizado estudios en los que las moléculas anestésicas producen cierto efecto sobre los lípidos [51], [52]. En el trabajo de tesis de maestría de Wodzinska K, 2008 [52], se realizó un estudio del efecto de los anestésicos octanol y etanol sobre membranas lipídicas a través de las técnicas de DSC y BLM. Encontraron que la permeabilidad de la bicapa lipídica depende fuertemente del estado termodinámico del sistema, el cual era gobernado por la temperatura, el voltaje, el pH del buffer y la presencia de anestésicos.

Este fenómeno tiene una explicación lógica, que fue descrita aproximadamente en 1900 por los fisiólogos Overton & Meyer, quienes de manera independiente descubrieron que la

potencia anestésica estaba correlacionada con la capacidad de los anestésicos de disolverse en ácidos grasos (no polares) más que en sustancias polares.

Meyer concluyó que, todas las sustancias que son químicamente no reactivas y que son solubles en sustancias grasas deben tener un efecto narcótico, además, la fuerza relativa de acción de narcosis debe ser dependiente tanto de su afinidad mecánica a sustancias grasas, como a otros constituyentes celulares, y que esto depende del coeficiente de partición, quién determina la distribución de anestésico en una mezcla de lípidos/agua.

Overton por su parte propuso que la anestesia actúa en todos los organismos de una manera similar, y quizás su conclusión más importante fué que: la potencia anestésica es directamente proporcional a su coeficiente de partición, dada por la razón de concentración de la droga entre agua/aceite de oliva. Destacó que la solubilidad de moléculas anestésicas en aceite de oliva refleja la solubilidad en la membrana lipídica de las células, en particular de células nerviosas. Además, el efecto anestésico es independiente de la naturaleza química de éste.

Las contribuciones de Overton y Meyer se resumen en lo que se denomina “Regla de Meyer-Overton”. Donde el coeficiente de partición ( $P$ ), se define como la razón de concentraciones de la droga entre aceite (o membranas de lípidos) y agua, a su vez ( $P$ ) es inversamente proporcional a la dosis crítica de anestésico ( $ED_{50}$ ) en agua a la cual ocurre la anestesia con una determinada droga, esto se puede ejemplificar en la figura 1.9.

Cabe resaltar que no sólo las sustancias anestésicas son capaces de permear la membrana lipídica sino también aquellas moléculas que sean lo suficientemente hidrofóbicas y que cumplan con el modelo de solubilidad-difusión [53].

En resumen, los anestésicos son moléculas hidrofóbicas capaces de solubilizarse en membranas lipídicas, lo cual claramente afectaría la conformación estructural de la bica-pa lipídica desordenandola de algún modo, y en consecuencia modificaría su transición de fase hacia temperaturas más bajas [54], [55], [56].

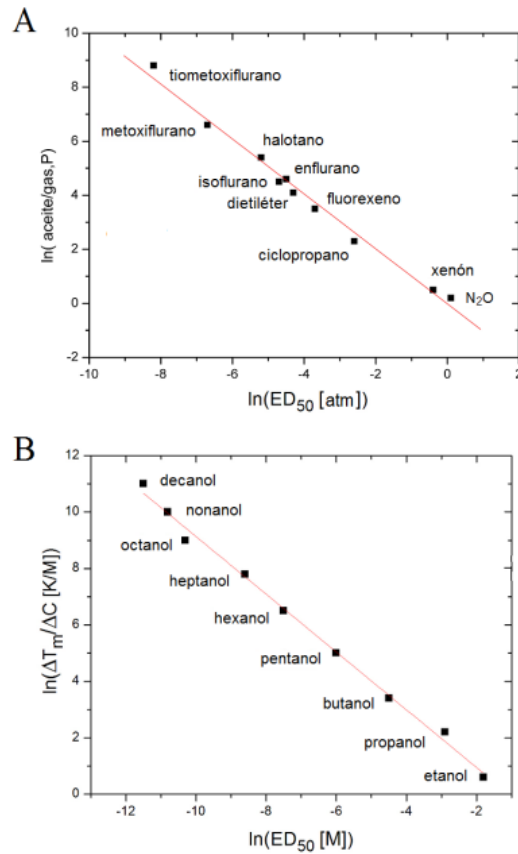


Figura 1.9: **Regla de Meyer-Overton**. Figura adaptada de los datos de (Overton, 1991 & Kharakoz, 2001) tomada de [1]. (A) Regla de Overton-Meyer: el coeficiente de partición está inversamente relacionado con la dosis efectiva de anestésico [ED<sub>50</sub>] para anestésicos volátiles en humano. (B) Concentración dependiente del punto de fusión de membranas DPPC contra la dosis de anestesia crítica, ED<sub>50</sub>.

En este proyecto se trabajó con un anestésico local. Un anestésico local puede ser definido como una droga que previene reversiblemente la transmisión del impulso nervioso en la región en la cual es aplicada, sin afectar la conciencia.

Generalmente, los anestésicos locales tienen un grupo aromático lípido-soluble y una carga en el grupo amida hidrofílico. El enlace entre estos dos grupos determina la clase de droga, y puede ser amida o éster. El enlace éster puede romperse más fácil que el enlace amida, por lo que las drogas éster son menos estables en solución y no pueden ser almacenadas por mucho tiempo, a diferencia de las amidas. Por otro lado, los amida-anestésicos son estables al calor mientras que los éster-anestésicos no.

Los anestésicos locales, son drogas estabilizadoras de membrana. Se supone que ellos disminuyen reversiblemente la razón de depolarización y repolarización de membranas excitables. Actúan principalmente inhibiendo la entrada de sodio en canales específicos de sodio (canales de sodio regulados por voltaje), en la membrana de las células nerviosas. Cuando la entrada de sodio es interrumpida el potencial de acción no se produce y la señal de conducción se inhibe, es decir, se produce anestesia.

Todos los anestésicos locales son bases débiles, lo que significa que ellos existen en dos formas: Desionizada y ionizada. El pKa define el pH al cual ambas formas existen en cantidades iguales. El pKa de un anestésico local determina la cantidad a la cual éste existe en forma ionizada a un pH dado. A pH fisiológico (7.4) todos los anestésicos locales están más ionizados que desionizados (todos los valores de pKa son más grandes que 7.4) [57].

Por otro lado, la anestesia general, induce un estado de inconciencia con ausencia de la sensación de dolor sobre el cuerpo entero, a través de la administración de drogas anestésicas. Se piensa que durante este tipo de anestesia, la audición y estímulos tanto visuales como táctiles, son procesados por el (SNC), aunque la información es alterada. La conducción de nervios periféricos y la transmisión en las bifurcaciones neuromusculares parecen ser escasamente afectadas. Así, la anestesia general actúa predominantemente sobre el SNC [58].

Ahora bien, sí las sustancias anestésicas son capaces de alterar la transición de fase de la bicapa lipídica en su interacción con la membrana, ¿será posible que moléculas catalogadas por producir un efecto contrario a la anestesia, es decir, sustancias que estimulen el sistema nervioso y produzcan un estado de alerta, podrían realizar un efecto contrario al producido por los anestésicos en la bicapa lipídica?

Según Heimburg, 2007, el efecto de los anestésicos sigue la misma dependencia que la composición lipídica en cambios en las variables termodinámicas, lo cual significa que un incremento en la concentración del solvente y/o en la presión hidrostática actúa en la

potencia anestésica en dirección opuesta, es decir, atenúa o revierte el efecto anestésico. Se ha comprobado que algunas sales tienen la capacidad de incrementar la temperatura de transición de las bicapas lipídicas, tal es el caso del LiCl [35], como también iones divalentes como el  $Ca^{2+}$  causan el mismo efecto [59]. Entonces, ¿será posible que moléculas estimulantes como la cafeína logren revertir o atenuar el efecto producido por algún anestésico?

Para intentar darle respuesta a estas preguntas, en el presente proyecto nos propusimos estudiar el comportamiento termográfico de liposomas de DPPC:DPPA bajo su interacción con moléculas polares (Cafeína) y no polares (Tetracaína).

A continuación, nos permitimos dar una breve descripción de las propiedades de las moléculas que se usaron (figura 1.10).

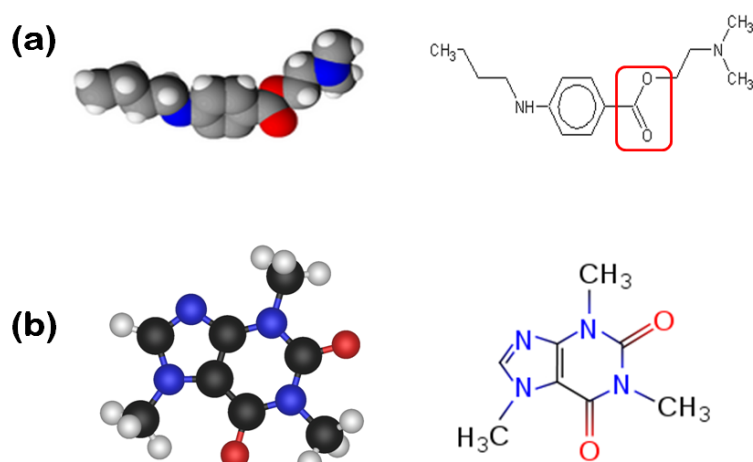


Figura 1.10: **Estructura química de las moléculas de Tetracaína y Cafeína.** Del lado izquierdo se muestra el diagrama de bolas y bastones, y del lado derecho se muestra la estructura molecular, de (a) La Tetracaína y (b) La Cafeína.

## Tetracaína

La tetracaína, es un anestésico local potente, que posee un grupo ester, como se señala en la figura 1.10(a). Es una base débil, insoluble en agua a menos que se haya hidrociorado. La tetracaína es usada tópicamente en oftalmología, como antipruriginoso y en anestesia espinal.



Existen trabajos en los que se ha encontrado que la tetracaína bloquea alostéricamente la función de canales de sodio voltaje-dependientes [49]. A bajas concentraciones, la tetracaína causa una inhibición inicial de los eventos de liberación espontánea de calcio y a altas concentraciones bloquea esta liberación por completo.

Por otro lado, se ha investigado acerca de la influencia de la tetracaína en las propiedades termodinámicas y temperatura-presión dependientes del comportamiento de fase en modelos de biomembranas de Dimiristoil Fosfatidil Colina (DMPC) [60]. Bottner y Winter [60], encontraron que la incorporación de tetracaína en la membrana conducía a un desordenamiento total de ésta. Este comportamiento se interpretó a partir de la disminución en la temperatura de transición de fase y la reducción del cambio de volumen en la transición de fase principal.

En general, la tetracaína en su característica de anestésico es altamente hidrofóbica, lo que significa que va a interactuar principalmente con las colas de los lípidos. Sin embargo, su grupo ester podría interactuar parcialmente con las cabezas polares, debido a los átomos de oxígeno. De este modo, la tetracaína podría comportarse como una molécula anfifílica.

## **Cafeína**

La cafeína (figura 1.10 (b)), pertenece a la familia de los compuestos heterocíclicos también conocidos como purinas. Se clasifica como un alcaloide. Es soluble en agua y muchos solventes orgánicos, en forma pura aparece como cristal líquido.

Una dosis terapéutica de cafeína es casi la misma cantidad que se encuentra en una taza de café, entre 100 y 200 miligramos. La cafeína entra en el organismo 10 minutos después de la ingestión, el tiempo de vida media es de 5 horas, pero puede permanecer en el cuerpo hasta por 12 horas.

La cafeína es el estimulante del SNC más consumido. Nehlig *et al.* [61], describe tres mecanismos principales de acción de la cafeína en el SNC. Movilización de calcio intra-

celular e inhibición de fosfodiesterasas, ocurre únicamente a concentraciones de cafeína muy altas (no fisiológicas), y el único mecanismo probable de acción de la cafeína es el antagonismo a nivel de los receptores de adenosina.

La cafeína incrementa la energía del metabolismo a través del cerebro, pero al mismo tiempo disminuye el flujo de sangre cerebral, induciendo hipoperfusión cerebral relativa. Esta molécula, activa neuronas de noradrenalina y parece afectar la liberación local de dopamina.

Para el caso de la cafeína, ésta se podría clasificar como una molécula polar a causa de su solubilidad en agua y en compuestos orgánicos, lo que la haría interactuar principalmente con las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos. Sin embargo, en su estructura posee una pequeña región hidrofóbica que podría en dado caso interactuar con las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos.

Como se ha mencionado a lo largo de esta sección, el mecanismo esencial a través del cual se lleva a cabo la anestesia continua siendo una incógnita, por lo que una de las motivaciones de este proyecto es continuar el estudio del comportamiento de membranas lipídicas y sus cambios de transición de fase cuando el sistema se somete a interacciones con sustancias anestésicas y estimulantes, con el objetivo de entender un poco más acerca del mecanismo de interacción de algunas moléculas polares y no polares con la membrana celular, en especial aquellas que se relacionan con efectos de inhibición y estimulación del (SNC), considerando la importancia de los lípidos en la transmisión o inhibición de señales eléctricas.

## 2

# Objetivos

### 2.1. General

Estudiar el comportamiento termodinámico de membranas artificiales bajo la acción de moléculas polares y no polares.

### 2.2. Particulares

- Estudiar el perfil calorimétrico de membranas artificiales de DPPC:DPPA (95:5 mol/mol) mediante la técnica DSC.
  1. Analizar el efecto producido por la Tetracaína (Molécula No Polar).
  2. Analizar el efecto producido por la Cafeína (Molécula Polar).
  3. Analizar el efecto producido por la combinación Tetracaína y Cafeína.
- Estudiar las variaciones de temperatura de transición en dichos casos.

# 3

## Materiales y Métodos

A continuación se especifican los materiales utilizados para el desarrollo del presente proyecto, así mismo, se describe la técnica de Microcalorimetría Diferencial de Barrido, usada para medir la variación de la capacidad calorífica con respecto a la temperatura de las membranas sintéticas diseñadas, bajo la interacción de éstas con moléculas no polares (Tetracaína) y polares (Cafeína), y en combinación de ellas, además se detalla en el modo de análisis de las curvas calorimétricas obtenidas.

### 3.1. Materiales

- Lípidos y soluciones: Se usó, 16:0 PC (DPPC) 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfocolina y 16:0 PA (DPPA) 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfato (sal de sodio)<sup>1</sup>, los cuales fueron sintetizados por Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), en consistencia polvo, no se usó ninguna purificación adicional. Los lípidos fueron disueltos en cloroformo para ser usados en la preparación de liposomas y se almacenaron a  $-20^{\circ}C$ . Las concentraciones a las cuales se almacenaron los lípidos en solución se describen en el cuadro 3.1.

Como solución amortiguadora se usó HEPES a una concentración de 10mM. Éste se adicionó en el paso de hidratación de los lípidos durante la preparación de liposomas, como se explica en la sección 3.2.1.

---

<sup>1</sup>El DPPA posee una carga neta negativa de -1.3C a pH 7.4, se usó en combinación con el DPPC para evitar agregación de los liposomas por envejecimiento.

Lípido	Concentración en almacenaje
DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfocolina)	25mg/mL
DPPA (1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfato (sal de sodio))	23.7mg/mL

Cuadro 3.1: Concentraciones de los Fosfolípidos en Almacenamiento.

- Moléculas Polares y No Polares: Se usó tetracaína base libre de HCl como molécula no polar y cafeína como molécula polar, también se usó  $CaCl_2$  para los experimentos descritos en la sección 4.4. Los compuestos usados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). Para solubilizar la tetracaína se usó DMSO al 99.5% de pureza, el stock se almacenó a temperatura ambiente a una concentración de 250mM. Mientras que la Cafeína se solubilizó en agua milli-Q a  $18.2M\Omega.cm$ , considerando que su solubilidad máxima a temperatura ambiente en agua es de 2.17g/100ml.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Preparación de Liposomas

Para llevar a cabo la preparación de liposomas se requirieron las siguientes cantidades de Fosfolípidos (FL):

Concentración del FL almacenado	Volumen ( $\mu L$ )	Masa (mg)	Masa ( $\mu mol$ )
25mg/mL de PC	952	23.8	32.42
23.75mg/mL de PA	50	1.19	1.70
Masa Mezcla FL	De 24.99 mg a 25 mg	Concentración final FL	25mg/mL

Cuadro 3.2: Cantidades de Fosfolípidos requeridas en la preparación de Liposomas.

### Descripción de la Preparación

El proceso de preparación de liposomas [62] se resume en las siguientes 4 etapas y gráficamente se describen en el esquema de la figura 3.1.

1. **Evaporación:** Se depositó 1mL de la mezcla de FL en un matraz de bola, se selló con un tapón de caucho, a través del cual se hizo pasar gas nitrógeno para evaporar el cloroformo en el que se encontraba disuelta la muestra de FL. Este proceso se realizó con el objetivo de obtener una mezcla homogénea compuesta por los dos FL. Una vez evaporado todo el cloroformo se observaba en la base del matraz una mancha blanca, que es conocida como “Pastel de Lípidos”. Este paso tomó entre 10 y 15 minutos.
2. **Hidratación:** El pastel de lípidos debe ser hidratado para inducir la formación de vesículas de FL en multicapas [63]. La solución utilizada para la hidratación fue HEPES a una concentración de 10mM, esta solución funcionaba como amortiguador de la muestra, lo que permitió regular el pH más fácilmente. Se usaron 9mL de esta solución por preparación de liposomas. El proceso de evaporación e hidratación se realizó utilizando la técnica de baño María, el agua se encontraba a una temperatura mayor que las temperaturas de transición de los lípidos DPPC y DPPA que componían la mezcla. Este proceso se realizó para evitar una gelación de la muestra.<sup>2</sup>
3. **Agitación y Sonicación:** Para lograr una mezcla homogénea entre el pastel de lípidos y la solución utilizada en la hidratación, se llevó a cabo el proceso de agitación con un Vortex Mixer Labnet International, Inc. S0200, (Edison, NJ USA) a 3,400 rpm, esta técnica se realizó con el objetivo de despegar el pastel de lípidos de la base del matraz. En este proceso la mezcla de lípidos del pastel se separa por completo del fondo del matraz y debido a las propiedades anfifílicas de los FL, éstos se estructuran de modo que sus colas hidrofóbicas se organizan en la región central, mientras que las cabezas hidrofílicas quedan expuestas hacia la región acuosa de la suspensión, a su vez la región interna de las vesículas es hidrofílica [64]. Sin embargo, en el proceso de

---

<sup>2</sup>Para una descripción más detallada del protocolo de preparación de liposomas consulte el siguiente enlace: ([http : //www.avantilipids.com/index.php?option = com\\_content&view = article&id = 1384&Itemid = 372](http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1384&Itemid=372)).

agitación, las vesículas no estaban ordenadas a modo de bicapas sino en multicapas, por lo que fue necesario llevar a cabo la sonicación, que permitió reestructurar las vesículas multilamelares en liposomas [65], [66], los cuales estaban constituidos por una única bicapa de FL. Para el proceso de sonicación se utilizó una ultrasonica AS2060B(Ultrasonic Cleaner) AutoScience (Dallas, TX USA), a una frecuencia de 40kHz durante 25 minutos.

4. Extrusión: El objetivo de este proceso fue reducir el tamaño de los liposomas al hacerlos pasar diez veces a través de un filtro de polietersulfona de  $0,2\mu m$  [67]. Finalmente, se obtuvieron liposomas en forma de (LUVs) vesículas unilamelares grandes.

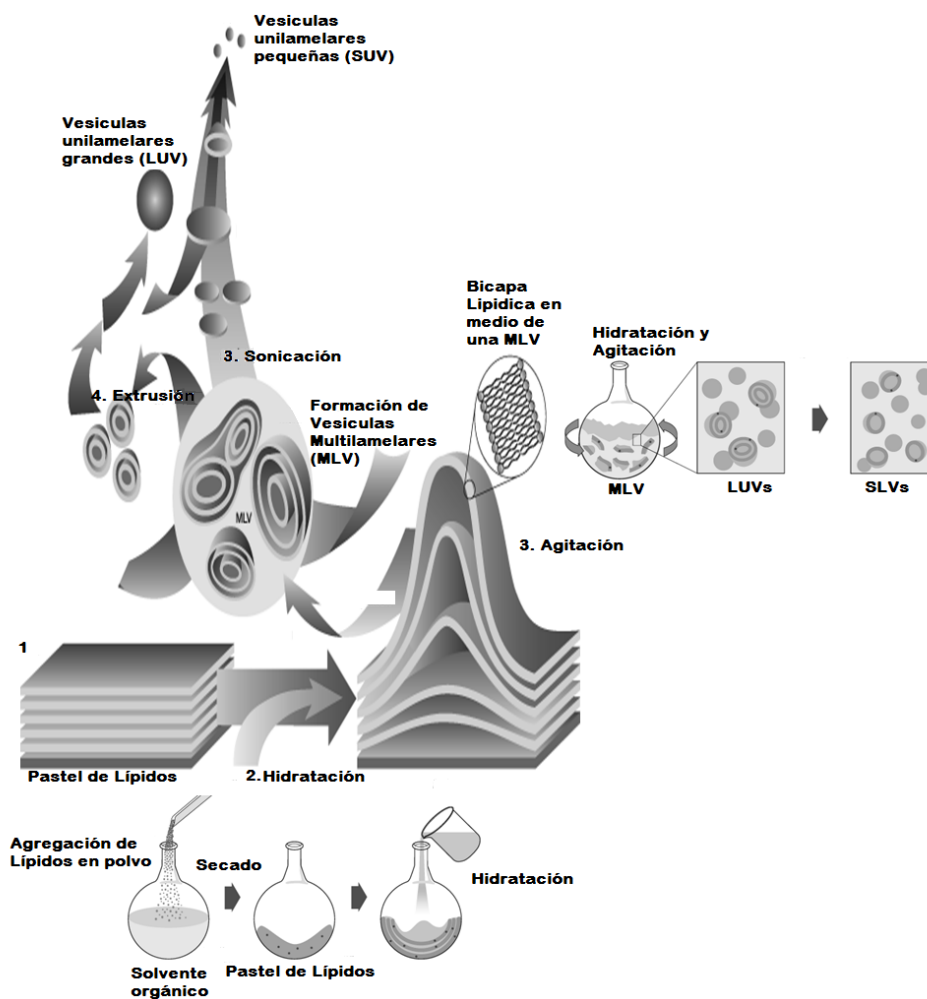


Figura 3.1: Esquema del proceso de preparación de Liposomas.

### 3.2.2. Microcalorimetría Diferencial de Barrido

La calorimetría es una técnica que se encarga de medir el calor absorbido o liberado por un sistema a causa de una reacción química o un cambio físico. La medición se lleva a cabo usando un calorímetro, el cual mide la capacidad calorífica propia de cada sustancia. Según las condiciones bajo las cuales se mide la liberación de calor existen diferentes tipos de calorímetros: de reacción, de titulación isotérmica, de calorimetría diferencial de barrido (DSC), entre otros [68], [69]; el más utilizado por los biofísicos es el de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

*La técnica de DSC ha sido ampliamente usada para determinar la termodinámica de las transiciones de fase y cambios conformacionales en sistemas biológicos como: proteínas [70], [71], ácidos nucleicos [72], [73] y arreglos lipídicos [74], [75], [76]. El calorímetro DSC mide la diferencia de temperatura entre las dos celdas (celda de referencia y celda de muestra), en función del tiempo y la temperatura, a una razón de temperatura dada. La diferencia de temperatura es expresada en unidades de una diferencia de potencia, la que es convertida a una diferencia en la capacidad calorífica entre la solución de muestra y la de referencia en función de la temperatura. Las transiciones de primer orden en una muestra biológica son observadas como grandes cambios discretos en esa diferencia en la capacidad calorífica sobre un pequeño rango de temperatura, lo que se observa como un pico de transición.[77].*

En el presente proyecto se trabajó con Microcalorimetría Diferencial de barrido [78], es una técnica similar a la DSC, la diferencia está en que el instrumento aquí usado posee mayor sensibilidad, ya que logra detectar cambios en la liberación de calor del orden de los nanowatts, generados por una cantidad muy pequeña de muestra. En nuestro laboratorio contamos con un microcalorímetro Nano-DSC de TA Instruments, su esquema se observa en la figura 3.2.

El instrumento posee dos celdas, una de referencia y otra de muestra, la celda de referencia se llena con agua o con la solución amortiguadora usada en el experimento y la celda de muestra se llena con la solución que contiene la sustancia a estudiar, en este



caso con liposomas, cada celda tiene un calentador peltier en la base que se encarga de calentar a cada una de ellas a temperatura constante, la diferencia de temperatura entre las dos celdas también es mantenida constante, además el instrumento posee un sistema de aislamiento adiabático.

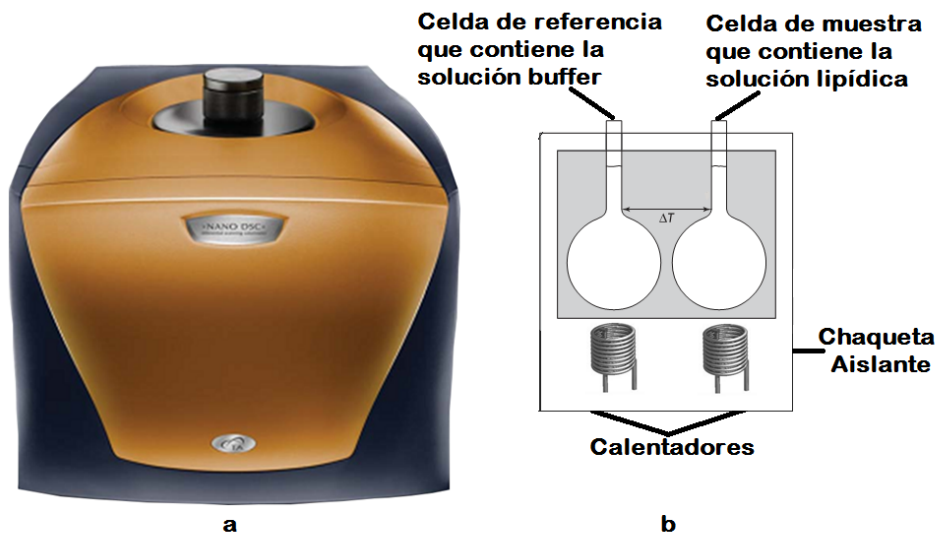


Figura 3.2: **Esquema de un Calorímetro DSC.** (a) Microcalorímetro NanoDSC usado en nuestro laboratorio. (b) Representación del interior de un Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC).

En DSC la cantidad física que mide las variaciones en la energía térmica es la capacidad calorífica ( $C$ ), que se define como la cantidad de energía que requiere un cuerpo para aumentar su temperatura en  $1^\circ C$ , en otras palabras:

$$C = \lim_{\Delta T \rightarrow 0} \frac{Q}{\Delta T} \quad (3.1)$$

Esta magnitud es fácil de medir, además, todas las sustancias poseen una capacidad calorífica y es de suma importancia porque puede ser usada para calcular cambios en la entalpía ( $\Delta H$ ) y en la entropía ( $\Delta S$ ) de un sistema, lo cual a su vez permite tener un conocimiento amplio del comportamiento termodinámico del objeto de estudio. Estas dos funciones de estado pueden ser calculadas si se mide la capacidad calorífica a presión constante, ya que ésta se define como:

$$C_p = \left( \frac{dQ}{dT} \right)_p \quad (3.2)$$

La entalpía es la medida de la energía total de un sistema y está dada por:  $H = U + pV$ , donde  $U$  es la energía interna del sistema,  $p$  la presión y  $V$  el volumen. Sin embargo, la entalpía de un sistema no puede ser medida directamente por lo que se mide su cambio, teniendo:

$$dH = dU + pdV + Vdp \quad (3.3)$$

De la primera ley de la termodinámica se sabe que:  $dU = dQ + dW$ , donde  $dW = -pdV$ , reemplazando:

$$dH = dQ + Vdp \quad (3.4)$$

Combinando la ecuación (3.2) con la (3.4) y teniendo en cuenta que  $p$  es constante, se obtiene:

$$C_p = \left( \frac{dH}{dT} \right)_p \quad (3.5)$$

Por otro lado, se puede hallar el cambio de entropía en el sistema, recordando que la entropía puede entenderse como la energía no disponible para realizar trabajo en un proceso termodinámico, conociendo que  $dQ = TdS$  y sustituyendo en la ecuación (3.5):

$$C_p = T \left( \frac{dS}{dT} \right)_p \quad (3.6)$$

Hallando estas dos funciones de estado se conoce la energía total del sistema termodinámico como también la energía de la cual no se dispone, y además se pueden deducir características tales como, la energía necesaria para crear el sistema ( $U$ ) y la energía requerida para llevar a cabo un proceso bajo condiciones isotérmicas o isobáricas ( $G$ ).

Como se puede dar cuenta, con sólo calcular experimentalmente una cantidad como la capacidad calorífica a presión constante es posible describir el comportamiento termodinámico de un sistema, de allí la relevancia que tiene medir esta cantidad. Es importante señalar que las deducciones matemáticas descritas se dan para procesos termodinámicos reversibles.

### 3.2.3. Análisis de las Curvas Calorimétricas

En una curva calorimétrica clásica para transiciones de arreglos lipídicos se observan dos picos característicos, el primero posee una mayor amplitud que el segundo. Son co-

nocidos como la pre-transición y la transición principal, respectivamente, estos picos de transición dan una idea del cambio de configuración que puede estar sufriendo una bicapa constituida por fosfolípidos.

En la figura 3.3, se muestra la curva calorimétrica promedio obtenida para la muestra control del presente proyecto, en ella se evidencian los dos picos característicos ya mencionados. En general, este es el comportamiento que se obtiene para un conjunto cualquiera de arreglos lipídicos, lo que varía es la temperatura de transición de fase, que depende de la composición lipídica del arreglo. La  $T_m$  se incrementa si el lípido o conjunto de lípidos estudiados poseen una cadena hidrocarbonada larga saturada y disminuye a una menor longitud de la cadena hidrocarbonada o con el incremento de las insaturaciones.

En calorimetría, durante una medición la temperatura se incrementa a una velocidad dada. Al iniciar el incremento de la temperatura la configuración de la bicapa es estable, las colas de los fosfolípidos se encuentran perfectamente organizadas y la bicapa se encuentra en una fase gel o sólida ordenada, en la medida que la temperatura va en aumento llega un momento en el que parte de los fosfolípidos de la bicapa sufren una reconfiguración a un estado un poco más desordenado “pre-transición” pero no lo suficiente como para llegar al estado fluido, la temperatura continua incrementándose a razón constante hasta que llega a un punto en el que la mitad de los fosfolípidos de la bicapa se encuentran en fase gel y la otra mitad se encuentra en fase fluida, a esa temperatura se le conoce como temperatura de transición ( $T_m$ ), una vez se supera esa  $T_m$  la configuración de la bicapa ha cambiado completamente a su fase fluida o líquida desordenada, este proceso es reversible.

El cambio de configuración de los arreglos lipídicos del estado gel al estado fluido es tan drástico y rápido que se evidencia en un notorio cambio en la capacidad calorífica, observado como el punto máximo del pico, este comportamiento se interpreta como una transición de fase de primer orden, en donde el sistema “salta” de un estado a otro.

A partir de una medición DSC simple con una transición conformacional reversible, es posible determinar: la temperatura de transición, la entalpía de transición, el cambio de

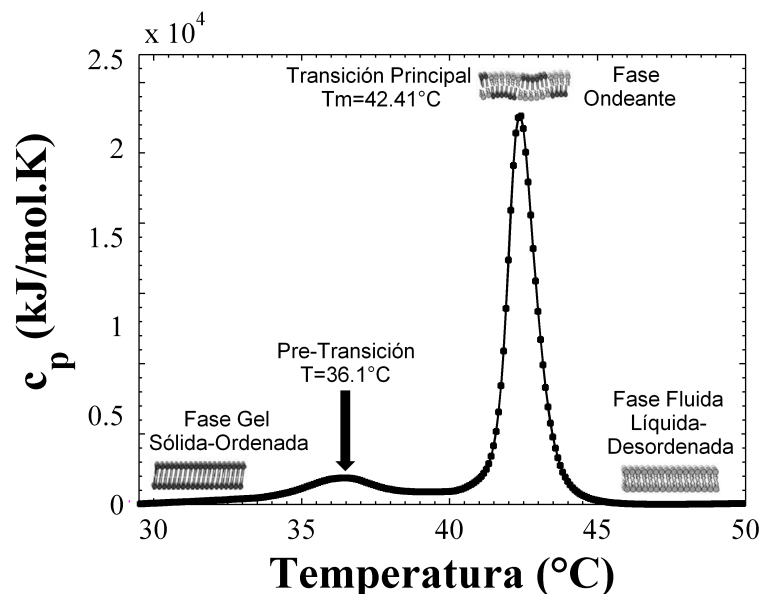


Figura 3.3: Curva Calorimétrica Típica para un Arreglo de Lípidos. Pico de transición de la muestra control del presente trabajo (DPPC:DPPA 95:5 mol/mol).

capacidad calorífica que acompaña la transición, la cooperatividad y estequiometría de la transición, en este trabajo nos limitamos a analizar las tres primeras, que se extrajeron de las curvas calorimétricas de la siguiente manera:

- Entalpía Calorimétrica ( $\Delta H$ ): Se obtuvo calculando la diferencia entre la curva de la capacidad calorífica de la muestra y la línea base, esa curva resultante se integró en el rango de temperatura transicional por cantidad de lípido en gramos o en moles sometidos a la transición.
- La temperatura de transición ( $T_m$ ), es la temperatura correspondiente a la máxima capacidad calorífica en la curva calorimétrica. Para nuestro caso, también se interpretó como la temperatura donde el cambio de la energía de Gibbs molar estándar ( $\Delta G_0$ ) de la transición es igual a cero.
- La diferencia entre las capacidades caloríficas de un arreglo lipídico de su conformación gel a su conformación fluida arrojó el cambio en la capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ).

En el análisis de datos se usaron dos programas computacionales: el DSCRun, que es una interface calorímetro-computador en donde se almacenaron y observaron las mediciones de la muestra experimental en tiempo real, en él se fijaron las siguientes cantidades

físicas: la presión (P), el rango de temperaturas ( $T_{max}$  y  $T_{min}$ ), la razón a la cual se incrementaba la temperatura, el tiempo intermedición<sup>3</sup>, el número de mediciones por muestra, el volumen (V), la concentración [C] y el peso molecular (PM) de la muestra.

El segundo programa fue el NanoAnalyze, en este paquete se analizaron los datos almacenados en DSCRUn, ya que los datos obtenidos se presentaban en unidades de ( $\mu W$ ) para el calor, con el NanoAnalyze fue posible realizar la conversión de unidades a ( $\frac{kJ}{molK}$ ) obteniendo de este modo la capacidad calorífica ( $C_p$ ), considerando el V, la [C] y el PM de la muestra definidos inicialmente en DSCRUn.

Para obtener el efecto neto del sistema a estudiar se midieron previamente en el microcalorímetro un conjunto de líneas base, en el cual tanto la celda muestra como la celda de referencia contenían la solución amortiguadora sin liposomas, en la medición se fijaron las mismas cantidades físicas que en la medición con liposomas, a excepción de la [C] y el PM de la muestra.

La curva final que muestra el comportamiento neto del sistema se obtuvo calculando la diferencia entre la curva experimental con liposomas y la línea base, esto se realizó para cada una de las mediciones por muestra con el fin de efectuar estadística del sistema<sup>4</sup>. Una vez finalizado el análisis de las curvas calorimétricas en este programa, los datos por medición se exportaron a formato .txt y se graficaron a través del programa Matlab.

Las cantidades físicas que se mantuvieron constantes a lo largo de los experimentos desarrollados en el proyecto se resumen en el cuadro 3.3.

---

<sup>3</sup>Cuando el calorímetro realiza una medición de calentamiento y regresa a la temperatura de inicio  $T_{min}$ , es necesario darle un tiempo de espera al sistema para que se equilibre antes de iniciar una segunda medición, este intervalo de tiempo es lo que se denominó “tiempo intermedición”.

<sup>4</sup>La descripción detallada del análisis de las curvas en el NanoAnalyze se encuentra en NanoAnalyze Software Getting Started Guide, TA Instruments.

Cantidad Física	Valor o intervalo fijado como constante
Presión (P)	3 atm
Razón de incremento de la temperatura "rate"	$1 \frac{^{\circ}C}{min}$
Tiempo Intermedición	8 Minutos
Peso Molecular de la muestra (PM)	1430.959 KD
Volumen x Celda	0.3 - 1 mL
Número de mediciones x muestra	3
Número de muestras x Dosis	2
Total de mediciones promediadas x Dosis	6
Intervalo de Temperatura x Experimento Control o Control + Molécula Polar Control + Molécula No Polar a concentraciones $\geq 20mM$	$25^{\circ}C$ a $50^{\circ}C$ $20^{\circ}C$ a $50^{\circ}C$
Intervalo de temperatura de Integración de la Línea Base	$28^{\circ}C$ a $50^{\circ}C$

Cuadro 3.3: Cantidades físicas mantenidas como constantes en el DSCRun y el NanoAnalyze.

# 4

## Resultados

Durante el presente proyecto se usaron como objeto de estudio membranas artificiales libres de proteínas constituídas por los fosfolípidos DPPC:DPPA, en una relación 95:5 mol/mol, producidas tal como se describió en el capítulo 3.

Se estudiaron las variaciones del comportamiento termográfico de las membranas producidas bajo su interacción con: un anestésico local (tetracaína), un agente excitatorio (cafeína), combinaciones de tetracaína-cafeína y finalmente calcio.

Para la tetracaína y la cafeína se realizaron experimentos a diferentes dosis, las cuales son especificadas en los cuadros 4.1. y 4.2. En los experimentos donde se combinó tetracaína y cafeína se hizo variar la dosis del anestésico local tal como se hizo en los experimentos realizados únicamente con tetracaína y se usó siempre la misma dosis de cafeína (111mM), correspondiente a la dosis máxima permitida de éste debido a sus propiedades de solubilidad en soluciones acuosas a temperatura ambiente (cuadro 4.4). En cuanto a los experimentos con calcio, se usó una dosis de 200mM de  $CaCl_2$ , teniendo en cuenta un experimento complementario que se realizó en el trabajo de Sierra F [1], con el fin de comparar resultados.

Por cada muestra se realizaron tres mediciones y cada dosis se midió dos veces para un total de seis mediciones por dosis (cuadro 3.3), esto con el fin de realizar promedio estadístico.

En la figura 3.3, se muestra la curva calorimétrica promedio obtenida para la muestra control del proyecto, en ella se observa la pre-transición a los  $36.41^{\circ}C$  y la transición de fase principal del estado gel al estado fluido ( $T_m$  Control) a los  $42.41^{\circ}C$ .

A continuación se muestran las curvas calorimétricas obtenidas para la muestra control bajo su interacción con diferentes dosis de tetracaína, cafeína, combinaciones de tetracaína y cafeína y una comparación con un sistema vivo teniendo en consideración los datos obtenidos por Sierra F, en su tesis de maestría [1]. Las dosis aplicadas y las temperaturas de transición obtenidas en los experimentos realizados se muestran en los cuadros 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4.

#### 4.1. Análisis del Efecto producido por la Tetracaína

En la figura 4.1, se muestra un conjunto de curvas calorimétricas obtenidas para las transiciones de fase que exhibió la muestra control bajo su interacción con la tetracaína a distintas dosis (Cuadro 4.1).

Dosis de Tetracaína (mM)	Temperatura de transición ( $^{\circ}C$ )
0	$42.41 \pm 0.021826$
1	$37.75 \pm 0.032514$
5	$36.15 \pm 0.036036$
10	$34.78 \pm 0.042971$
15	$33.91 \pm 0.015720$
20	$33.44 \pm 0.024757$
25	$33.00 \pm 0.025426$
30	$32.99 \pm 0.038340$
35	$32.47 \pm 0.001738$

Cuadro 4.1: Dosis de tetracaína y las respectivas temperaturas de transición exhibidas por la muestra con cada una de ellas.



Los experimentos se realizaron usando como dosis máxima 35mM de tetracaína, dado que para dosis superiores a esta concentración la muestra se observaba poco homogénea y las curvas calorimétricas no eran reproducibles, sólo se lograba realizar una medición por muestra, puesto que para las siguientes mediciones el pico desaparecía como si los liposomas se desintegraran, siendo este hecho un indicio de saturación de tetracaína en el medio.

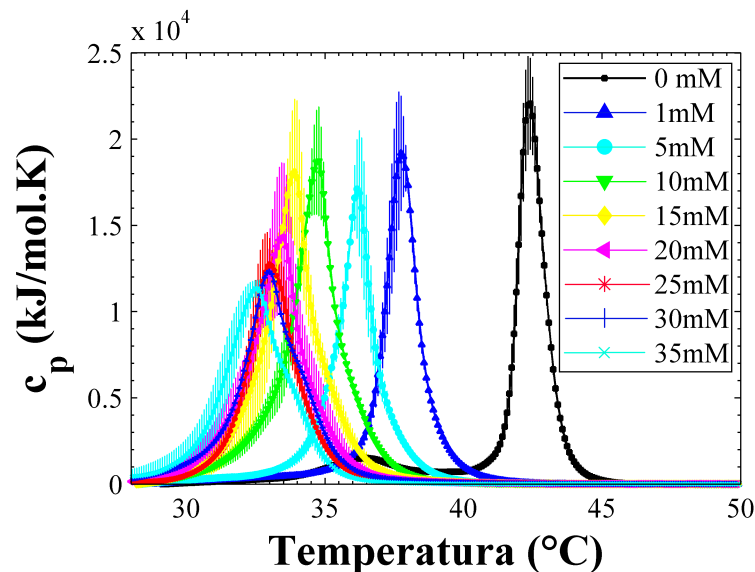


Figura 4.1: Curvas calorimétricas de liposomas control bajo diferentes dosis de tetracaína.

A partir de la figura 4.1, se puede observar que en la medida que se incrementa la dosis de tetracaína la temperatura de transición de la membrana lipídica va disminuyendo, es decir, el pico calorimétrico sufre un corrimiento hacia la izquierda con respecto al control (0mM de tetracaína) a mayores dosis de este anestésico local, como también se observa una disminución en la amplitud del pico calorimétrico, en otras palabras de la capacidad calorífica, lo que se evidencia en la figura 4.2.

El hecho de que la temperatura de transición y la capacidad calorífica de los liposomas control disminuyan bajo su interacción con tetracaína, indica que a mayores dosis del anestésico en el medio, el sistema se modifica de cierto modo, tal que ahora le es más sencillo cambiar de fase, de allí la disminución en estas dos cantidades físicas. De otro modo, esto significa que la energía que se tiene que invertir para llevar al sistema de un estado a otro es menor a mayores dosis de tetracaína.

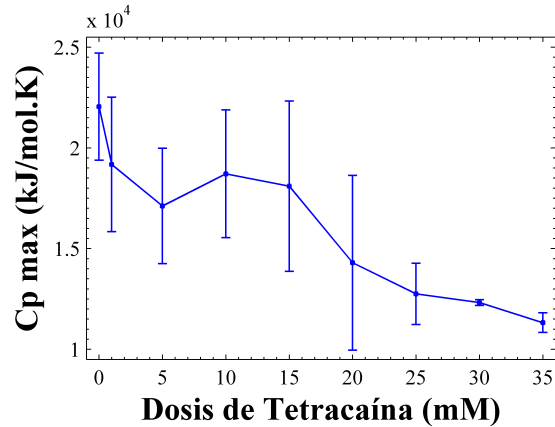


Figura 4.2: Capacidad Calorífica máxima Vs Dosis de tetracaína.

Por otro lado, es interesante comprender cual es el efecto que tiene el anestésico sobre el sistema, una forma de interpretarlo es construir una curva de dosis respuesta como la que se muestra en la figura 4.3.

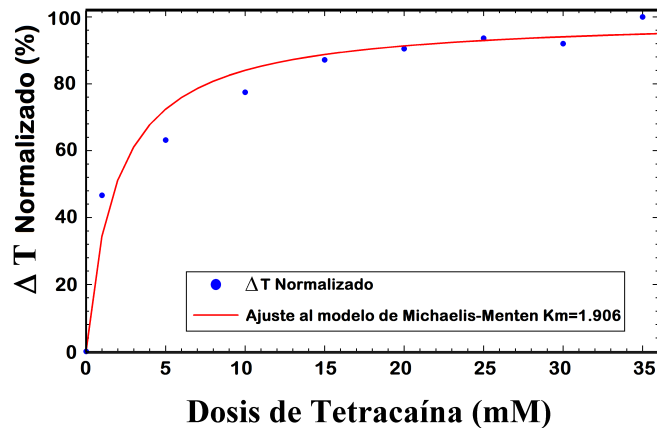


Figura 4.3: Curva Dosis-Respuesta (Control + Tetracaína). Representa el cambio de la temperatura de transición con respecto al control en función de la concentración de la dosis de tetracaína. El eje Y se normaliza respecto al cambio de la temperatura de transición más alta. Se ajustó un modelo de Michaelis-Menten a la curva de dosis respuesta real.

La figura 4.3 muestra la magnitud del cambio de la temperatura de transición a cierta dosis de tetracaína con respecto a la temperatura de transición control. El eje Y se normaliza con respecto al efecto máximo. En el gráfico se observa que a dosis mayores de tetracaína, mayor es el cambio en la temperatura de transición ( $\Delta T$ ), hasta llegar a una dosis de saturación donde el sistema no evidencia mayores cambios en la temperatura de

transición de fase.

Por otro lado, a los datos experimentales se les ajustó una curva de Michaelis-Menten. La ecuación de Michaelis-Menten se usa para describir reacciones enzimáticas controladas. La suposición principal de esta teoría es que la enzima y el substrato reaccionan reversiblemente para formar un complejo inicial, subsecuentemente el complejo se descompone para formar una enzima libre más uno o más productos. A partir de estas conjeturas se representan esquemáticamente las reacciones, de donde se define un conjunto de ecuaciones diferenciales de acuerdo a la ley de acción de masas.

Finalmente, las soluciones de ese conjunto de ecuaciones diferenciales se resumen en lo que se conoce como la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 4.1):

$$v_0 = \frac{V s_0}{s_0 + K_m} \quad (4.1)$$

Donde  $v_0$  es la velocidad de reacción,  $V$ , es el máximo valor de la velocidad de reacción,  $s_0$ , es la cantidad de substrato y  $K_m$ , es la constante de Michaelis. Para nuestro sistema la ecuación de Michaelis-Menten se reescribiría de la siguiente manera:

$$\Delta T = \frac{\Delta T_{max} D}{D + K_m} \quad (4.2)$$

Donde  $\Delta T$  es el cambio en la temperatura de transición,  $D$  es la dosis del fármaco usado,  $\Delta T_{max}$ , es el cambio máximo en la temperatura de transición y  $K_m$ , es la dosis a la cual se obtiene la mitad del efecto máximo del anestésico.

La ecuación 4.2 se usó para ajustar los datos obtenidos experimentalmente en nuestros experimentos. A partir del ajuste se encontró teóricamente la dosis a la cual se obtiene la mitad del efecto máximo del anestésico, según el modelo realizado en Matlab es  $K_m = 1.906\text{mM}$ , eso significa que aproximadamente a esta concentración de tetracaína en los liposomas control se obtiene el efecto máximo medio del anestésico en el sistema.

## 4.2. Análisis del Efecto producido por la Cafeína

En la figura 4.4, se muestran las curvas calorimétricas obtenidas para la interacción de la muestra con distintas dosis de cafeína. En el gráfico no se observan mayores cambios en la temperatura de transición de fase para dosis pequeñas. Sin embargo, para dosis mayores a 20mM se observan variaciones en la temperatura de transición de la muestra superiores a  $0.5^{\circ}\text{C}$  (cuadro 4.2).

Dosis de Cafeína (mM)	Temperatura de Transición ( $^{\circ}\text{C}$ )
0	$42.41 \pm 0.021826$
5	$42.32 \pm 0.051038$
10	$42.58 \pm 0.042058$
20	$42.40 \pm 0.044541$
30	$42.07 \pm 0.033353$
50	$41.99 \pm 0.033345$
111	$41.96 \pm 0.037603$

Cuadro 4.2: Dosis de cafeína y las respectivas temperaturas de transición exhibidas por la muestra con cada una de ellas.

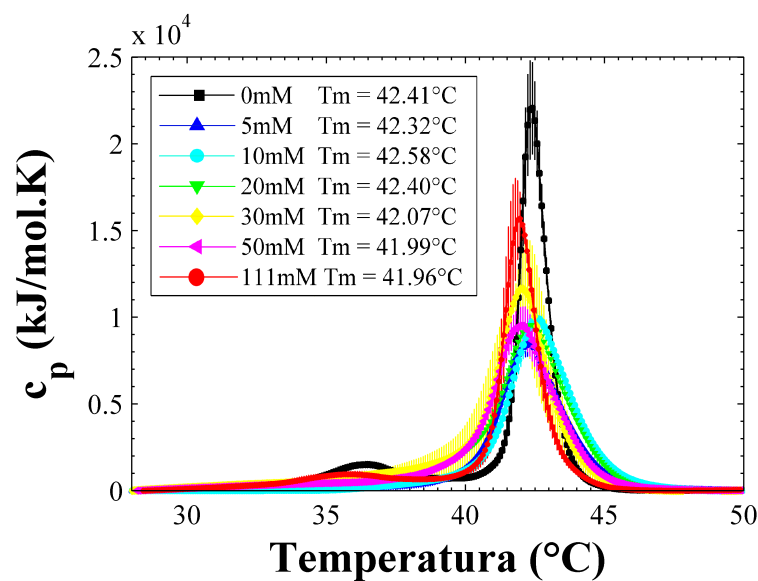


Figura 4.4: Curvas calorimétricas de liposomas control bajo diferentes dosis de cafeína.

Lo sorprendente de estos resultados es que en contra de lo que se esperaría para una molécula excitatoria como la cafeína, ésta en lugar de presentar corrimientos del pico calorimétrico hacia la derecha, para dosis superiores a 20mM produce corrimientos de la curva calorimétrica hacia la izquierda, es decir, la temperatura de transición disminuye para dosis altas.

Por otro lado, también es posible observar que la cafeína disminuye la capacidad calorífica de la muestra para las dosis probadas, aunque un hecho interesante es que el  $C_p$  se incrementa cuando la muestra control interactúa con la dosis de cafeína máxima, tal como se observa en la figura 4.5.

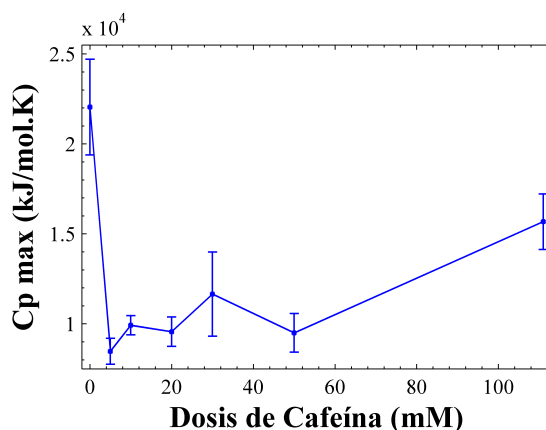


Figura 4.5: Capacidad Calorífica máxima Vs Dosis de cafeína.

### 4.3. Análisis del Efecto producido por la Combinación de Tetracaína y Cafeína

Conociendo que las moléculas de tetracaína y cafeína poseen efectos contrarios sobre las neuronas, anestésicos y excitar, respectivamente, se tornó interesante observar que ocurriría si se aplicaba una combinación de las dos moléculas en los liposomas control.

En la figura 4.6 se observa el conjunto de resultados obtenidos para la interacción de los liposomas control con la combinación de tetracaína y cafeína (Cuadro 4.4)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>El cuadro 4.4 se muestra al final de este capítulo.

Los resultados de estos experimentos muestran que el efecto que produjo la tetracaína sobre los liposomas disminuye al agregar la misma dosis de cafeína (111mM) en cada caso, esto se evidencia en el aumento de la temperatura de transición de los liposomas que contenían la combinación tetracaína-cafeína, con respecto a los que sólo contenían tetracaína.

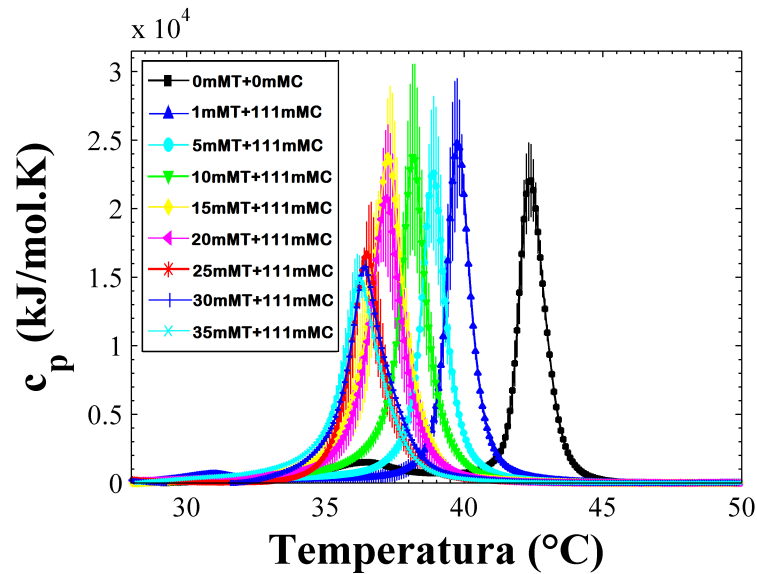


Figura 4.6: **Curvas calorimétricas de liposomas control bajo diferentes dosis de tetracaína y 111mM cafeína.** (mMT) y (mMC) se refiere a la concentraciones en (mM) de tetracaína y cafeína en el medio, respectivamente.

La diferencia que hay entre los picos calorimétricos de la muestra con tetracaína y de la muestra con la combinación (tetracaína + 111mM cafeína) puede verse claramente resumida en la figura 4.7. A partir de estas dos gráficas también puede abstraerse que la capacidad calorífica de las muestras con la combinación aumenta en comparación a las que sólo contenían tetracaína.

La curva dosis-respuesta para la combinación de tetracaína-cafeína se muestra en la figura 4.8 (b), donde se observa un resultado muy interesante y es que cuanto mayor es la concentración de tetracaína en el medio mayor es el efecto producido por la misma dosis de cafeína, puesto que el cambio en la temperatura de transición de la muestra (combinación) respecto a la muestra control (muestra con la misma dosis de tetracaína libre de

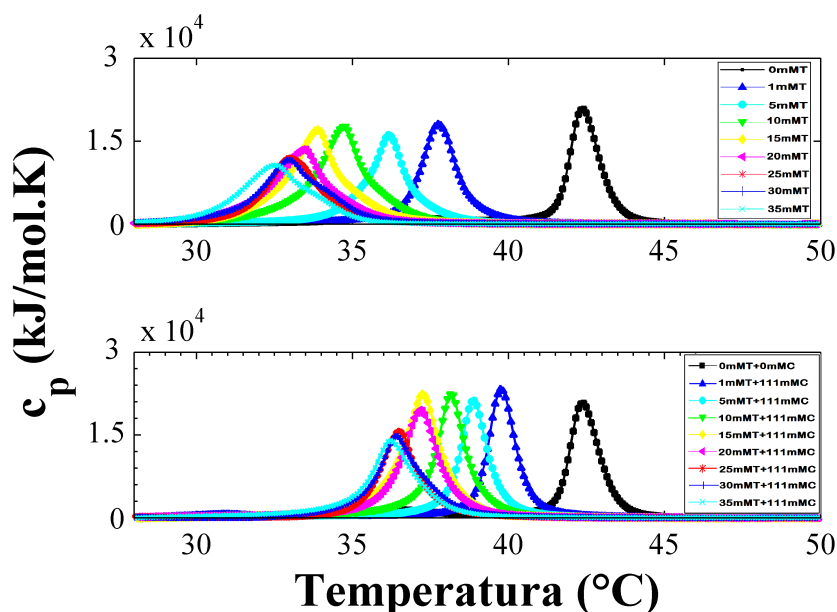


Figura 4.7: Comparación de los perfiles calorimétricos para los experimentos realizados con Tetracaína y la combinación Tetracaína-Cafeína.

cafeína) ( $\Delta T$ ) se incrementa a dosis mayores de tetracaína.

En la figura 4.8 se graficaron las curvas dosis respuesta para los experimentos con tetracaína (a) y la combinación tetracaína-cafeína (b). Comparando ambas curvas se observa una disminución en el cambio de la temperatura de transición ( $\Delta T$ ) de la curva (a) con respecto a la (b), de donde se concluye que el efecto producido por la tetracaína es claramente disminuído por la acción de la cafeína.

Sin embargo, la cafeína en su dosis máxima no es capaz de revertir totalmente el efecto de la tetracaína, ya que no es posible alcanzar nuevamente una temperatura de transición igual a la  $T_m$ Control y en consecuencia el cambio en la temperatura de transición ( $\Delta T$ ) nunca se hace cero.

Se podría pensar que el sistema liposomas-tetracaína-cafeína interactúa por medio de un antagonismo no competitivo, considerando que las moléculas de tetracaína y las de cafeína actúan en lugares distintos de la bicapa lipídica de acuerdo con las propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas de cada una, y a su estructura molecular. Además, la cafeína

produce una disminución del efecto producido por la tetracaína cuando ésta interactúa como agonista con la membrana, pero no revierte su efecto por completo.

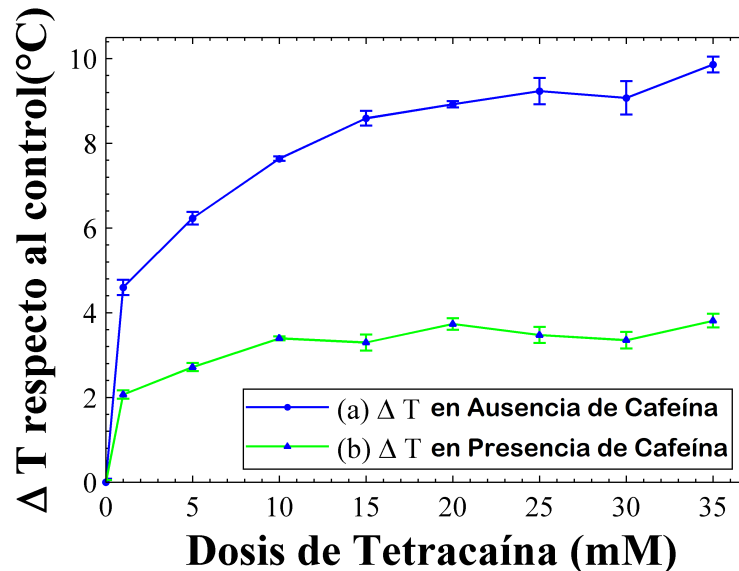


Figura 4.8: Comparación de las curvas de dosis-respuesta para los experimentos realizados con tetracaína y la combinación tetracaína-cafeína. El eje Y representa el cambio de la temperatura de transición con respecto al control en función de la concentración de las moléculas utilizadas (tetracaína y la combinación tetracaína + 111mM de cafeína).

#### 4.4. Comparación de una membrana lipídica artificial con la membrana plasmática de una célula motil

En el trabajo de tesis de maestría realizado por Sierra F.[1], se desarrolló una técnica experimental para estudiar la motilidad del espermatozoide de ratón. En este estudio se analizaron factores que afectaban la movilidad del espermatozoide, tales como la temperatura, su interacción con anestésicos, cafeína y calcio, y finalmente la variación del pH.

Ellos estudiaron la motilidad en función del tiempo, a través de un parámetro de motilidad que denominan  $\tau$ . El parámetro de motilidad celular ( $\tau$ ) fue estimado mediante un análisis de autocorrelación temporal de imágenes, el cual se define ampliamente en [1].



De acuerdo a la interpretación de Sierra F, si  $\tau$  crece más rápido con respecto al tiempo se dice que la motilidad celular del esperma decrece, pero si se mantiene casi constante y muy cercano al eje de las X, se entiende como una extensión del periodo de motilidad.

Entre otros, Sierra F, encontró que los anestésicos locales usados eran capaces de disminuir la motilidad del esperma (aumento del parámetro  $\tau$  respecto al tiempo), mientras que moléculas estimulantes como la cafeína eran capaces de incrementar la motilidad del esperma (disminución del parámetro  $\tau$  respecto al tiempo), y además la cafeína lograba disminuir el efecto producido por los anestésicos locales. Para información más detallada de trabajo de Sierra F, ver [1] y [79].

En nuestro laboratorio interesados en los resultados que se obtuvieron en ese proyecto, se decidió realizar un estudio de los efectos de agentes anestésicos y excitatorios en los puntos de transición de liposomas puros control (DPPC:DPPA, 95:5 mol/mol), bajo las mismas condiciones en las que se realizaban los experimentos con los espermas [79].

Los experimentos que se extrajeron de un trabajo complementario de Sierra F, se describen a continuación, cuyos resultados se muestran en la figura 4.9:

1. Experimento tetracaína-cafeína, realizado a  $25^{\circ}C$ , con las siguientes pruebas: muestra control, 8mM de tetracaína, 110mM de cafeína, y la combinación 8mM de tetracaína y 110mM de cafeína.
2. Experimento tetracaína-calcio, realizado a  $10^{\circ}C$ , con las siguientes pruebas: muestra control, 8mM de tetracaína, 200mM de  $CaCl_2$ , y la combinación 8mM de tetracaína y 200mM de  $CaCl_2$ .

En el experimento1 (figura 4.9 (a)), se contrasta el comportamiento de la tetracaína que se observa como un inhibitorio de la motilidad (células espermáticas anestesiadas) con respecto a la acción excitatoria de la cafeína que se observa con un aumento en la motilidad, tal como se describió en [1]. Lo interesante del experimento es que cuando se juntan la tetracaína y la cafeína en las dosis ya descritas, se observa una disminución del efecto inhibitorio producido por la tetracaína, mostrando un comportamiento similar al

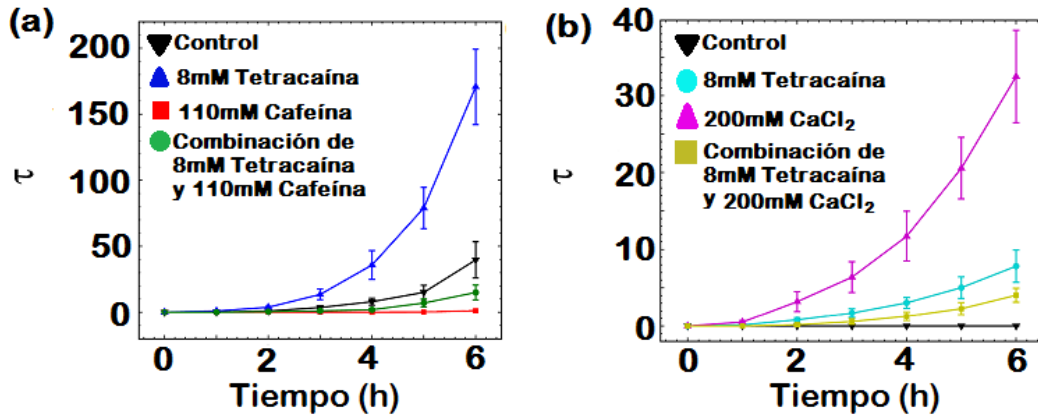


Figura 4.9: Resultados de los experimentos de motilidad obtenidos por Sierra F. (a) Experimento (1) tetracaína-cafeína. (b) Experimento (2) tetracaína-calcio. Datos obtenidos por Sierra F, en un trabajo complementario a su tesis de maestría.

del control.

Por otro lado, en el experimento 2 (figura 4.9 (b)), encontraron que a una dosis muy alta de calcio (200mM) se produjo una alta inhibición de la motilidad, pero curiosamente cuando se combinó esa misma dosis de calcio con la tetracaína, la motilidad mejoró y permaneció por un mayor tiempo.

A partir de estos resultados se realizaron experimentos usando las mismas dosis de tetracaína, cafeína y calcio, bajo las mismas condiciones que los espermatozoides de ratón del trabajo de Sierra. F [79]. El objetivo de estos experimentos fue considerar un sistema más cercano a una membrana real libre de proteínas. Cabe recalcar que los lípidos más abundantes en las membranas plasmáticas de los espermatozoides son los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAS) pero su temperatura de transición es demasiado baja y nuestro calorímetro sólo logra llegar a  $-10^{\circ}\text{C}$ , por lo que se usó DPPC que es el fosfolípido más común y que se encuentra en mayor proporción en las membranas plasmáticas.

Los resultados del comportamiento calorimétrico obtenidos para la muestra de liposomas bajo las condiciones descritas en los experimentos 1 y 2 se muestran en el cuadro 4.3<sup>2</sup>.

<sup>2</sup>Es importante mencionar que, las dosis usadas en los modelos con liposomas se consideran a partir de las dosis usadas en el trabajo complementario realizado por Sierra F.

Dosis (mM)	Temperatura de Transición ( $^{\circ}C$ )
“Control sin fármaco”	42.5 $\pm$ 0.0233
8mM de Tetracaína	34.81 $\pm$ 0.0478
110mM de Cafeína	42.04 $\pm$ 0.0385
8mM Tetracaína + 110mM Cafeína	38.65 $\pm$ 0.0264
200mM $CaCl_2$	42.96 $\pm$ 0.0381
8mM Tetracaína + 200mM $CaCl_2$	36.34 $\pm$ 0.0099

Cuadro 4.3: Conjunto de dosis usadas en los modelos liposomales y sus respectivas temperaturas de transición.

En la figura 4.10 se observan los resultados del experimento 1. Los liposomas control bajo condiciones fisiológicas de salinidad y pH se comportan del mismo modo que los liposomas control en un amortiguador HEPES. Tal como se describió en las secciones anteriores, la tetracaína induce un cambio en la temperatura de transición de los liposomas generando un corrimiento del pico calorimétrico hacia las bajas temperaturas.

Por otro lado, la cafeína a diferencia de lo obtenido por Sierra F, produce un cambio de la temperatura de transición hacia temperaturas menores cuando actúa sola sobre los liposomas. Mientras que, cuando actúan combinadas (la tetracaína y la cafeína), la cafeína es capaz de contrarrestar el efecto producido por la tetracaína, de modo tal que la temperatura de transición de la muestra en combinación con estas dos moléculas se incrementa respecto a la muestra que contenía sólo tetracaína.

En cuanto al experimento 2, en la figura 4.11 se observa que la temperatura de transición para los liposomas control siempre se incrementa para diferentes dosis de  $CaCl_2$  (los resultados para otras dosis no se muestran), a diferencia del efecto producido por la cafeína cuando interactúa sólo con la bicapa.

Se cree que al incrementarse la temperatura de transición se presenta una estabiliza-

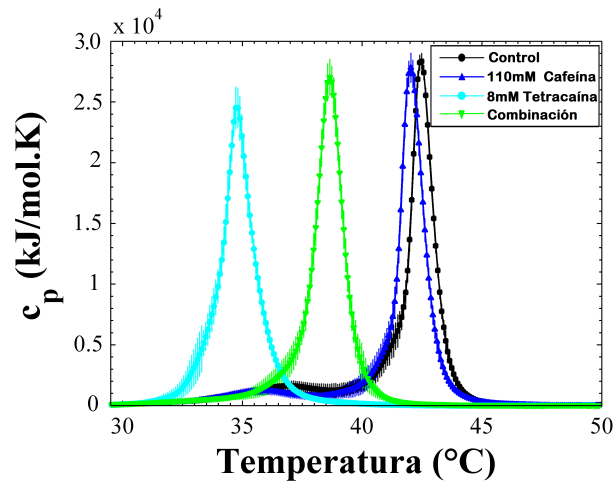


Figura 4.10: Resultados Experimento 1-Modelo con liposomas.

ción de la membrana, que podría atribuirse a un apantallamiento de la bicapa. Además, como era de esperarse cuando se usa una combinación de tetracaína y calcio en el medio, el efecto causado por la tetracaína disminuye por acción del calcio, evidenciando un aumento en la temperatura de transición.

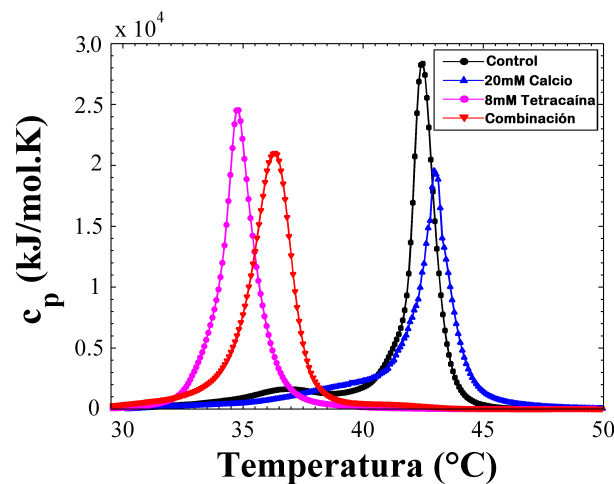


Figura 4.11: Resultados Experimento 2-Modelo con liposomas.

En general, de acuerdo a lo que se ha encontrado en la literatura y a los resultados que se han obtenido en nuestro laboratorio se cree que la interacción que se presenta entre estas moléculas y la membrana lipídica afecta directamente a la compresibilidad de la bicapa, fluidizándola (induciendo desorden) cuando interacciona con un anestésico y rigidizándola (induciendo orden) cuando interactúa con moléculas excitatorias o con

iones de carga positiva. Este efecto que se ve directamente reflejado en el cambio de la temperatura de transición.

De acuerdo al estado inicial de la bicapa (ordenado o desordenado), ésta puede ir más fácil o más difícilmente de un estado a otro disminuyéndolo o incrementándolo su temperatura de transición de fase. Esta hipótesis se discutirá a mayor detalle en el capítulo 5.

A modo de comentario, en las curvas calorimétricas ( $C_p$  vs  $T$ ) las barras de error en el eje Y de algunos de los experimentos realizados se observaban grandes, esto fue causado por el error de precisión introducido en la solubilización de los lípidos. Debido a que los lípidos fueron disueltos en cloroformo y este solvente orgánico es muy volátil, aún con las precauciones técnicas que se tomaron se evaporaba de un día a otro, por lo que la concentración de lípidos usada en cada preparación de liposomas variaba de acuerdo al día en el que se había preparado el stock de lípidos. Sin embargo, este hecho no es de preocuparse, ya que lo que se estudió fue la temperatura de transición de las membranas artificiales, cuya desviación estándar dada en el eje de las X, fue tan pequeña que el símbolo que representaba cada dato promedio la cubría por completo.

Dosis de Tetracaína (mM) + 111mM de Cafeína	Temperatura de Transición ( $^{\circ}C$ )
0	$42.41 \pm 0.021826$
1 + 111	$39.75 \pm 0.032514$
5 + 111	$38.90 \pm 0.036036$
10 + 111	$38.14 \pm 0.042971$
15 + 111	$37.25 \pm 0.015720$
20 + 111	$37.17 \pm 0.024757$
25 + 111	$36.49 \pm 0.025426$
30 + 111	$36.45 \pm 0.038340$
35 + 111	$36.23 \pm 0.001738$

Cuadro 4.4: Dosis de la combinación tetracaína + 111mM cafeína y las respectivas temperaturas de transición exhibidas por la muestra con cada una de ellas.

## 5

# Discusión

Para empezar cabe resaltar que el instrumento que utilizamos durante el proyecto (Microcalorímetro Nano-DSC TA), es un altamente sensible y preciso, como se describió en la sección 3.2.2. A través de éste se lograron obtener picos calorimétricos bastante reproducibles, por lo que la desviación estándar obtenida para la temperatura en experimentos con muestras distintas bajo las mismas condiciones, fue del orden de  $10^{-2}$ . Esto nos dió la ventaja de observar variaciones muy pequeñas en la temperatura de transición. Es decir, cambios mínimos en la temperatura de transición fueron relevantes en los análisis de cambios de la transición de fase en nuestro sistema.

Como se mencionó en la introducción, las moléculas anestésicas son capaces de disolverse en ácidos grasos. Esto implica que al combinar el sistema liposoma-anestésico, la molécula anestésica, debido a sus propiedades hidrofóbicas, va a interactuar directamente con la región hidrofóbica de la bicapa lipídica; es decir, con sus colas hidrocarbonadas.

Inicialmente los liposomas control se encuentran arreglados en su conformación más estable: las colas hidrofóbicas están interactuando entre ellas a través de interacciones de Van der Waals, mientras que las cabezas se repelen entre ellas electrostáticamente. Pero al interactuar con el anestésico, éste es capaz de permear la bicapa, debilitando las interacciones de Van der Waals que existen entre las colas para arreglarse entre de ellas. Esto produce un cambio en la configuración de la bicapa, generando cierto desorden o fluidización en el sistema, lo que efectivamente altera la temperatura de transición ( $T_m$ ),

haciendo que la ( $T_m$ ) del sistema liposoma-anestésico sea menor que la ( $T_m$ ) del control.

El cambio en la temperatura de transición de fase y en consecuencia en las propiedades físicas de las membranas lipídicas en la interacción fosfolípidos-anestésicos, ya se ha estado estudiando tanto en trabajos experimentales como en teóricos. Tal es el caso de Papahadjopoulos *et al.* [54], Jorgensen *et al.* [80], y Mountcastle *et al.* [81], entre otros, donde se señala una disminución de la  $T_m$  y un incremento en el ancho de la transición, cuando diferentes moléculas anestésicas interactúan con una bicapa lipídica.

El anestésico local “tetracaína”, no podía ser una excepción. Su polarizabilidad eléctrica ( $31.379 \times 10^{-24} \text{cm}^3$ ) lo hace altamente hidrofóbico, lo cual implica que al mezclarse con los liposomas interactúa principalmente con las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la tetracaína es una molécula que se considera anfifílica. Por lo tanto una región de su estructura molecular interactúa con las cabezas polares fosfolipídicas.

Los experimentos resumidos en la figura 4.1, evidencian una fluidización de las membranas constituídas por DPPC:DPPA (95:5) al interactuar con diferentes dosis de tetracaína. Lo anterior se interpreta a partir del corrimiento de la temperatura de transición de los liposomas hacia temperaturas cada vez menores con el incremento de la concentración del anestésico en el medio. Esto implica que el sistema requiere menos energía para cambiar de la fase gel a la fluida con el incremento de la dosis.

Adicionalmente, es posible observar un ensanchamiento en la falda de transición cuando la dosis de tetracaína aumenta, demostrando de manera efectiva la fluidización del sistema. Estos resultados concuerdan con lo que se ha obtenido en los trabajos de Mayurama *et al.* [82], Bottner *et al.* [60], y Shimooka [83], donde ya se había evidenciado que la tetracaína afectaba la temperatura de transición de las bicapas lipídicas.

Por otro lado, vale la pena preguntarse de qué manera están interactuando las regiones polares y no polares de las moléculas de DPPC-DPPA-Tetracaína. Basados en los resul-



tados de NMR (Resonancia Magnética Nuclear) obtenidos por Boulanger *et al.* [84], para la interacción de DMPC y tetracaína, nos permitimos esquematizar de manera cualitativa en la figura 5.1 un modelo de las posibles configuraciones que podría tener una bicapa lipídica de DPPC:DPPA con y sin tetracaína. En el esquema también se intenta mostrar que una región de la tetracaína interactúa con las cabezas de los fosfolípidos mientras que una gran parte de la molécula se inserta en medio de las colas hidrocarbonadas de la bicapa.

Efectivamente, tal como se muestra en la figura 5.1 y como se ha discutido en los trabajos de Vanderkooi *et al.* [85], Ivanova *et al.* [86] y Heimburg [5], el área de una bicapa lipídica se incrementa en la medida que aumenta el desorden en el sistema inducido en este caso por las moléculas de tetracaína que interactúan con los fosfolípidos. Esto, aunado a la disminución de la temperatura de transición, indica que la tetracaína disminuye el grado de interacción de cooperatividad entre las moléculas de fosfolípido en la bicapa, provocando fluidización.

Por otro lado, es bien conocido que algunas sales, la disminución en el pH, el incremento de la presión en el sistema y la interacción con iones cargados, especialmente divalentes, son factores capaces de cambiar la transición de fase de una bicapa lipídica hacia temperaturas más altas [5]. Esto nos lleva a preguntarnos: ¿es posible que compuestos que generan efectos opuestos a los de la anestesia, es decir, estimulantes o excitatorios sean capaces de modificar la configuración de la membrana lipídica produciendo un incremento en su temperatura de transición de fase? Para resolver esta pregunta se decidió estudiar el comportamiento de la bicapa lipídica bajo su interacción con cafeína. Es importante mencionar que a la fecha no hay reportes en la literatura en donde se hayan realizado estudios calorimétricos de membranas lipídicas bajo la interacción con esta molécula. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo permiten dar una idea del mecanismo de acción de la cafeína sobre las membranas lipídicas.

La hipótesis que se tenía antes de realizar los experimentos era que la cafeína al ser una molécula polar iba a interactuar con las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos. O

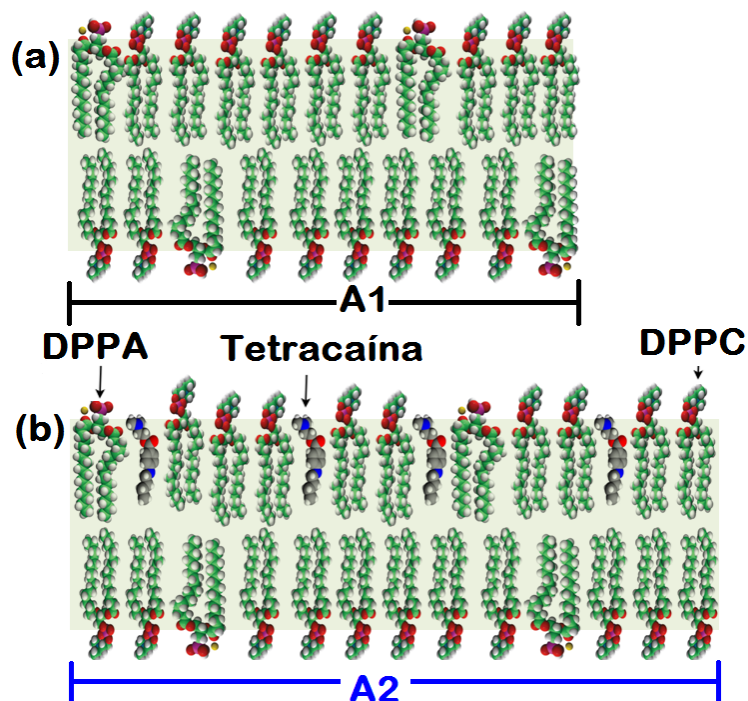


Figura 5.1: Representación esquemática del sistema membrana lipídica-Anestésico. (a) Esquema de la bicapa de DPPC:DPPA sin anestésico. (b) Esquema de la bicapa de DPPC:DPPA con anestésico.

sea, se esperaba que la cafeína apantallara las cabezas de los fosfolípidos en la bicapa. En consecuencia la temperatura de transición del sistema Liposoma-Cafeína aumentaría respecto al control; es decir, el sistema sufriría una rigidización.

Para nuestra sorpresa y en contra de la hipótesis inicial, la cafeína mostró un comportamiento muy particular. Al interactuar la cafeína con la membrana, la temperatura de transición disminuyó para las distintas dosis, tal como se observa en la figura 4.4, comportándose como si fuese un anestésico. Otro efecto interesante se observa en el ancho de la transición, el cual disminuye en la medida que se incrementa la dosis de cafeína.

Suponemos que lo que está ocurriendo es que el sistema control se encuentra tan estable que cuando la molécula de cafeína interactúa con él, no puede volverlo más estable. Por el contrario, lo que hace es desestabilizar el sistema fluidizándolo. Esto podría explicarse con el hecho de que la cafeína es una molécula polar y no polar al mismo tiempo, y de acuerdo a la situación puede adquirir un comportamiento u otro como veremos más

adelante.

Hasta ahora hemos estado hablando de la fluidización y la rigidización del sistema. En resumen, una membrana que es sometida a un proceso de rigidización, sufre un corrimiento del punto de fusión hacia altas temperaturas (derecha), debido a una disminución de la compresibilidad. Sin embargo, una membrana que es sometida a un proceso que le brinde una mayor fluidez, sufre un corrimiento del punto de fusión hacia bajas temperaturas (izquierda), debido a un aumento en la compresibilidad [87], [5], [88].

Además las funciones respuesta (área isotérmica y compresibilidades del volumen, elasticidad de enlace o tiempos de relajación) están directamente relacionados con los cambios de la capacidad calorífica, con su máximo en la temperatura de transición. Esto último se relaciona termodinámicamente con la relación de proporcionalidad entre la entalpía y los cambios de área/volumen cerca de la temperatura de transición [89], [90].

Es importante recordar que el área bajo la curva de un perfil calorimétrico representa la energía disponible que absorbe la membrana para cambiar del estado gel al fluido. Por lo tanto, un corrimiento del perfil calorimétrico hacia altas (o bajas) temperaturas significa que la membrana necesita alcanzar una mayor (o menor) temperatura para cambiar de estado.

En conclusión, de acuerdo a los resultados de las figuras 4.1 y 4.4, podemos mencionar que nuestros dos sistemas de estudio (Liposomas-Tetracaína y Liposomas-Cafeína) sufrieron un incremento en la compresibilidad de la membrana (fluidización), aunque lo hizo en menor proporción el sistema que contenía cafeína.

Por otro lado, a la fecha se han estudiado diversos mecanismos que revierten el efecto anestésico. Por ejemplo, Mayurama *et al.* [82], encontraron en bicapas de DPPC que tanto las temperaturas de transición principal como las de pre-transición son disminuídas con la adición de tetracaína y lograron elevarlas agregando presión al sistema, observando un antagonismo presión-anestésico para esas transiciones.

Heimburg y Jackson [91], por su cuenta demostraron que el efecto anestésico puede ser revertido de una manera cuantitativamente predecible por cualquier mecanismo que incremente la temperatura de transición y restaure la diferencia de energía libre a su valor original. Dentro de los mecanismos están la presión hidrostática, la disminución del pH y el incremento de la concentración de calcio. Sin embargo, aún no se ha estudiado si moléculas como la cafeína serían capaces de revertir el efecto anestésico. De allí nuestro interés en estudiar este fenómeno.

Cuando la cafeína interactuaba con muestras que ya contenían tetracaína, es decir, que se encontraban fluidizadas, se observó un incremento en la temperatura de transición del sistema Liposomas-Tetracaína-Cafeína con respecto al sistema Liposomas-Tetracaína para las mismas dosis del anestésico, tal como se observa en la figura comparativa 4.7.

Nuestros resultados indican que efectivamente la cafeína fue capaz de disminuir el efecto producido por la tetracaína, tal como se demuestra en las curvas de dosis-respuesta de la figura 4.8, de modo que el sistema muestra un antagonismo molécula estimulante-molécula antestésica (cafeína-tetracaína) para esas transiciones. Lo anterior sugiere que la bicapa lipídica ha incrementado su rigidez y en consecuencia su compresibilidad ha disminuído. En otras palabras la membrana se ha reorganizado por efecto de la cafeína. En este caso podríamos decir que la cafeína se comporta como una molécula polar interactuando principalmente con las cabezas hidrofílicas.

En la figura 5.2 (b) se esquematiza cualitativamente cómo creemos que la cafeína interactúa con las cabezas de los fosfolípidos en el sistema liposomas-cafeína. Por otra parte, en la figura 5.2 (c) se esquematiza cualitativamente cómo creemos que actúan la tetracaína y la cafeína en sus respectivos sitios de unión en la membrana lipídica. Suponemos que la cafeína, a causa de su naturaleza polar, se encarga de apantallar las cabezas polares de los fosfolípidos, lo cual reorganiza el desorden que había sido provocado por la tetracaína en las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos.

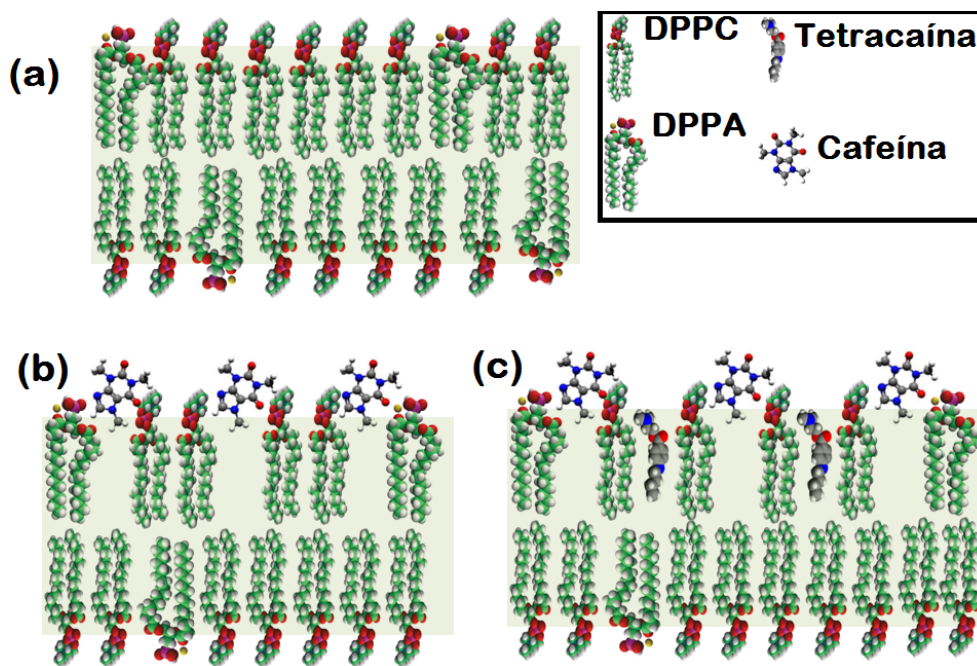


Figura 5.2: **Representación esquemática del sistema membrana lipídica-Anestésico-Estimulante.** (a) Esquema de la bicapa de DPPC:DPPA sin anestésico ni estimulante. (b) Esquema de la bicapa de DPPC:DPPA con cafeína. (c) Esquema de la bicapa de DPPC:DPPA con la combinación de tetracaína y cafeína.

Para finalizar quisimos tomar en consideración los resultados expuestos por Sierra F, acerca del aumento y disminución de la motilidad de los espermatozoides cuando éstos interactuaban con cafeína y tetracaína, los cuales interpreta como una rigidización o fluidización de la membrana del espermatozoide respectivamente, además él también observó que la cafeína era capaz de revertir el efecto de la tetracaína en la motilidad, tal como se describe en su tesis de maestría [1].

En la figura 4.9, se puede observar que en congruencia con los experimentos que realizamos con los liposomas bajo las mismas condiciones de hidratación de los experimentos de Sierra F [79], se obtuvo una disminución de la temperatura de transición ( $T_m$ ) a la misma dosis de tetracaína (fluidización) y un aumento de la ( $T_m$ ) al combinar la muestra con la dosis máxima de cafeína. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos por Sierra F, cuando la cafeína interactuaba independientemente con la membrana, no se evidenció ningún aumento de la ( $T_m$ ) (rigidización). Por el contrario, su ( $T_m$ ) disminuyó (fluidización).

Por otro lado, el caso del calcio, al ser éste un ion positivo divalente, exhibe un pronunciado efecto en las membranas, ya que se enlaza tanto a membranas cargadas negativamente como a membranas zwitterionicas. Esto se asocia con la electrostática de las membranas. Según Heimburg [92], las dos cargas del calcio probablemente se entrecruzan en los grupos fosfato de los lípidos adyacentes.

Típicamente, el calcio incrementa la temperatura de transición de las membranas. Sin embargo, dependiendo del estado de la membrana (si se encuentra abajo o arriba de la temperatura de transición) el calcio puede inducir o inhibir canales iónicos lipídicos [92].

En general, el efecto del calcio está directamente relacionado con la superficie de potencial de la membrana. Para los resultados que obtuvimos, consideramos teniendo en cuenta el trabajo de Heimburg [92] que, el calcio logra disminuir significativamente la repulsión electrostática entre las cabezas de los fosfolípidos de la bicapa, incrustando sus cargas en los grupos fosfato y produciendo en consecuencia un apantallamiento. En los experimentos mostrados en la figura 4.10 obtuvimos un incremento en la temperatura de transición de las bicapas bajo la acción del calcio, que interpretamos como un apantallamiento de la membrana a causa del calcio. También se demuestra la reversibilidad del efecto anestésico producido por la tetracaína. En otras palabras, el calcio es capaz de rigidizar la bicapa. Estos resultados son congruentes con los resultados obtenidos por Heimburg y Jackson [91], [5].

## 6

# Conclusiones

De nuestro trabajo podemos concluir que la tetracaína es capaz de inducir un cambio en la transición de fase de la bicapa de fosfolípidos, esto se debe al cambio que genera en su estructura, dadas sus propiedades de alta solubilidad en ácidos grasos. El cambio que genera hace que la membrana sea menos estable y más fluida. Este cambio en la transición de fase sugiere que no sólo las proteínas pueden ser afectadas por acción de los anestésicos, sino también la bicapa lipídica. En nuestros experimentos, se encontró que la dosis de saturación del sistema es 35mM de tetracaína, la cual corresponde a 1 mol de tetracaína por cada 3 moles de fosfolípidos, al cabo de esta dosis no se obtuvo mayor respuesta del sistema en el corrimiento de la temperatura de transición.

Por otro lado, encontramos que la cafeína se comporta como una molécula polar y no polar al mismo tiempo, tiene la capacidad de actuar sobre la bicapa lipídica dependiendo del estado inicial en que se encuentre la membrana. Si de entrada la bicapa lipídica se encuentra en un estado estable, la cafeína induce un ligero desorden en la membrana, fenómeno que se vió reflejado en la disminución de la temperatura de transición de fase del sistema liposomas-cafeína. Sin embargo, cuando el estado inicial de la bicapa es fluido-desordenado, la cafeína se encarga de reconfigurar la bicapa para regresarla a un estado más estable y organizado, de allí que se observara un incremento de la temperatura de transición en el sistema liposomas-tetracaína-cafeína con respecto al sistema liposomas-tetracaína.

Esto significa que la cafeína vista como una molécula estimulante en el SNC, en nuestro sistema actúa como antagonista, siendo capaz de revertir parcialmente el efecto producido por el anestésico local (tetracaína). Adicionalmente, se encontró que en cuanto más fluido se encuentre el sistema la cafeína logra revertir el efecto en una mayor proporción. Cabe resaltar que el efecto de la cafeína sobre las bicapas lipídicas no se había estudiado antes.

El Calcio por su cuenta logra disminuir significativamente la repulsión electrostática entre las cabezas de los fosfolípidos de la bicapa produciendo en consecuencia un apantallamiento, reflejado en el aumento de la temperatura de transición del sistema liposomas- $CaCl_2$  [92]. De otro modo, también encontramos que el calcio tiene un efecto antagonista sobre el efecto producido por la tetracaína, reflejado en el incremento de la temperatura de transición del sistema liposomas-tetracaína-calcio respecto al sistema liposomas-tetracaína.

En resumen, podemos concluir que cualquier alteración en el medio iónico de las bicapas lipídicas, en nuestro caso, adición de agentes externos, tales como la tetracaína, la cafeína, el calcio y combinaciones entre ellos, afectan directamente las propiedades físicas de las membranas lipídicas. Este efecto se observa claramente reflejado en la variación de su comportamiento termodinámico, evidenciando cambios en las temperaturas de transición, capacidad calorífica, entalpía y entropía del sistema.



# Perspectivas

Una de las motivaciones del presente proyecto ha sido comprender los efectos de la anestesia en las membranas lipídicas y la capacidad que poseen ciertas moléculas para revertir su efecto. Comprobamos mediante la técnica de microcalorimetría que los puntos de fusión de las membranas disminuían o aumentaban de acuerdo a una fluidización o rigidización del sistema. Lo anterior indica un cambio en las propiedades físicas de las bicapas, tales como la elasticidad, incremento de la superficie y disminución del grosor de la membrana. Sería muy interesante estudiar estas características a través de técnicas reológicas o por medio de la balanza de Langmuir, tal como se ha hecho para otro tipo de membranas lipídicas en otras interacciones [93], [94].

Por otro lado, la técnica de (BLM) Black Lipid Membrane permite medir las fluctuaciones de corriente en la membrana cuando la permeabilidad iónica varía. Este efecto es mediado por cambios en la configuración de la bicapa en las transiciones de fase. De acuerdo al curioso comportamiento que presentó la cafeína, valdría la pena corroborar su interacción con la bicapa a través de esta técnica.

Un efecto interesante a estudiar de una manera más visual es la manera en que las moléculas anestésicas y aquellas que revierten su efecto interactúan con la bicapa. Es decir, establecer la estructura de los liposomas y quizás de un modo más ambicioso algunas membranas biológicas, antes y después de su interacción con dichas moléculas. Una técnica que sería de gran utilidad para tales fines es la dispersión de rayos X de ángulo bajo (SAXS), que ya ha sido usada para establecer estructuras de autoensambles lípido/agua cuando éstos sufren cambios en su estructura, como hinchazón. Una muestra de lo anterior es el trabajo de Angelova A. *et al.* [95].

Para finalizar, una de las preguntas que queda abierta para trabajos futuros corresponde al comportamiento y efecto que tienen sobre las bicapas lipídicas moléculas que son capaces de estimular el SNC, tales como la cafeína o la teobromina, entre otros, considerando el curioso comportamiento de la cafeína en el presente proyecto. Este estudio podría realizarse a través de cualquiera de las técnicas mencionadas anteriormente, incluyendo la microcalorimetría.

# Bibliografía

- [1] F. Sierra. Estudio fenomenológico de la motilidad espermática en búsqueda del mecanismo correcto de la anestesia. *Biblioteca Cinvestav-Unidad Monterrey*, 2011.
- [2] Geoffrey M. Cooper and Robert E. Hausman. *The Cell: A Molecular Approach*. ASM Press, March 2009.
- [3] A. Hodgkin and A. Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Bulletin of Mathematical Biology*, 52(1):25–71, 1990.
- [4] V. F. Antonov, V. V. Petrov, A. A. Molnar, D. A. Predvoditelev, and A. S. Ivanov. The appearance of single-ion channels in unmodified lipid bilayer membranes at the phase transition temperature. *Published online: 07 February 1980; doi:10.1038/283585a0*, 283(5747):585–586, February 1980.
- [5] Thomas Heimburg. Front matter. In *Thermal Biophysics of Membranes*, pages I–XV. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, September 2007.
- [6] S. J. Singer and Garth L. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023):720–731, February 1972.
- [7] H. Ti Tien and Angelica Ottova-Leitmannova. *Membrane Biophysics: As Viewed from Experimental Bilayer Lipid Membranes (Planar Lipid Bilayers and Spherical Liposomes)*. Elsevier, November 2000.
- [8] Erwin Neher and Bert Sakmann. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Published online: 29 April 1976; | doi:10.1038/260799a0*, 260(5554):799–802, April 1976.

- [9] James Kew and Ceri Davies, editors. *Ion Channels: From Structure to Function*. Oxford University Press, USA, 1 edition, November 2009.
- [10] Marcelo O. Ortells and George G. Lunt. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends in Neurosciences*, 18(3):121–127, March 1995.
- [11] Catherine E. Morris. Mechanosensitive ion channels. *Journal of Membrane Biology*, 113(2):93–107, 1990.
- [12] Bertil Hille. Modulation of ion-channel function by g-protein-coupled receptors. *Trends in Neurosciences*, 17(12):531–536, 1994.
- [13] V. C. Revealed, V. G. M. Permeabilities, C. M. Armstrong, and B. Hille. Voltage-Gated ion channels review and electrical excitability. *Neuron*, 20:371–380, 1998.
- [14] Michael R. Rose. Neurological channelopathies. *BMJ : British Medical Journal*, 316(7138):1104–1105, April 1998. PMID: 9552942 PMCID: PMC1112934.
- [15] R. S. Kass. The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease. *Journal of Clinical Investigation*, 115(8):1986–1989, August 2005.
- [16] Dimitri M. Kullmann. Neurological channelopathies. *Annual Review of Neuroscience*, 33(1):151–172, 2010.
- [17] Nicholas P. Franks. Molecular targets underlying general anaesthesia. *British Journal of Pharmacology*, 147(S1):S72–S81, January 2006. PMID: 16402123 PMCID: PMC1760740.
- [18] Bernd W. Urban, Christian Frenkel, Daniel S. Duch, and Audrey B. Kauff. Molecular models of anesthetic action on sodium channels, including those from human brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 625(1):327–343, 1991.
- [19] Uwe Rudolph and Bernd Antkowiak. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(9):709–720, September 2004.

- [20] Keith W. Miller, John R. Smythies, and Ronald J. Bradley. The nature of the site of general anesthesia. In *International Review of Neurobiology*, volume Volume 27, pages 1–61. Academic Press, 1985.
- [21] Hilary J. Little. How has molecular pharmacology contributed to our understanding of the mechanism(s) of general anesthesia? *Pharmacology & Therapeutics*, 69(1):37–58, 1996.
- [22] B. W. Urban. The site of anesthetic action. In Jurgen Schuttler and Helmut Schwilden, editors, *Modern Anesthetics*, volume 182 of *Handbook of Experimental Pharmacology*, pages 3–29. Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- [23] Philip Seeman. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacological Reviews*, 24(4):583–655, January 1972.
- [24] Masao Yafuso, Stephen J. Kennedy, and Alan R. Freeman. Spontaneous conductance changes, multilevel conductance states and negative differential resistance in oxidized cholesterol black lipid membranes. *Journal of Membrane Biology*, 17(1):201–212, 1974.
- [25] David L. Nelson and Michael M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition*. W. H. Freeman, 4th edition, April 2004.
- [26] Anthony A. Fodor, Sharona E. Gordon, and William N. Zagotta. Mechanism of tetracaine block of cyclic Nucleotide-Gated channels. *The Journal of General Physiology*, 109(1):3–14, January 1997.
- [27] E. Neher and J. H. Steinbach. Local anaesthetics transiently block currents through single Acetylcholine-Receptor channels. *The Journal of Physiology*, 277(1):153–176, January 1978.
- [28] H L Li, A Galue, L Meadows, and D S Ragsdale. A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channel. *Molecular pharmacology*, 55(1):134–141, January 1999. PMID: 9882707.
- [29] Martin-Eauclaire M.-F. Swartz K.J. Bosmans, F. Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels. *Nature*, 2008.

- [30] Yosef Graziani and Avinoam Livne. Water permeability of bilayer lipid membranes: Sterol-lipid interaction. *Journal of Membrane Biology*, 7(1):275–284, 1972.
- [31] D. Huster, A.J. Jin, K. Arnold, and K. Gawrisch. Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by  $^{17}\text{O}$  NMR. *Biophysical Journal*, 73(2):855–864, August 1997.
- [32] K. Olbrich, W. Rawicz, D. Needham, and E. Evans. Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 79(1):321–327, July 2000.
- [33] M C Blok, L L van Deenen, and J De Gier. Effect of the gel to liquid crystalline phase transition on the osmotic behaviour of phosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et biophysica acta*, 433(1):1–12, April 1976. PMID: 1260054.
- [34] Andrey A. Gurtovenko and Ilpo Vattulainen. Pore formation coupled to ion transport through lipid membranes as induced by transmembrane ionic charge imbalance: an atomistic molecular dynamics study. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(50):17570–17571, 2005.
- [35] Valerij F Antonov, Andrej A Anosov, Vladimir P Norik, and Elena Yu Smirnova. Soft perforation of planar bilayer lipid membranes of dipalmitoylphosphatidylcholine at the temperature of the phase transition from the liquid crystalline to the gel state. *European biophysics journal: EBJ*, 34(2):155–162, March 2005. PMID: 15480622.
- [36] D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, S. Nir, and I. Isac. Phase transitions in phospholipid vesicles fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 311(3):330–348, July 1973.
- [37] G. Boheim, W. Hanke, and H. Eibl. Lipid phase transition in planar bilayer membrane and its effect on carrier- and Pore-Mediated ion transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(6):3403–3407, January 1980.
- [38] Leonor Cruzeiro-Hansson and Ole G. Mouritsen. Passive ion permeability of lipid membranes modelled via lipid-domain interfacial area. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 944(1):63–72, September 1988.

- [39] J.F. Nagle and H.L. Scott Jr. Lateral compressibility of lipid mono- and bilayers. theory of membrane permeability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 513(2):236–243, November 1978.
- [40] M. Montal and P. Mueller. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(12):3561–3566, January 1972.
- [41] Valerij F. Antonov, Andrej A. Anosov, Vladimir P. Norik, Evgenija A. Korepanova, and Elena Y. Smirnova. Electrical capacitance of lipid bilayer membranes of hydrogenated egg lecithin at the temperature phase transition. *European Biophysics Journal*, 32(1):55–59, 2003.
- [42] B. Wunderlich, C. Leirer, A.-L. Idzko, U.F. Keyser, A. Wixforth, V.M. Myles, T. Heimburg, and M.F. Schneider. Phase-State dependent current fluctuations in pure lipid membranes. *Biophysical Journal*, 96(11):4592–4597, June 2009.
- [43] Klaus Turnheim, Johannes Gruber, Christoph Wachter, and Valentina Ruiz-Gutiérrez. Membrane phospholipid composition affects function of potassium channels from rabbit colon epithelium. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 277(1):C83–C90, January 1999.
- [44] Daniel Schmidt, Qiu-Xing Jiang, and Roderick MacKinnon. Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature*, 444(7120):775–779, November 2006.
- [45] Gregor Cevc. How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of unsaturation: an effective chain-length model. *Biochemistry*, 30(29):7186–7193, 1991.
- [46] Rumiana Koynova and Martin Caffrey. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1376(1):91–145, June 1998.
- [47] R. E. Pagano, R. J. Cherry, and D. Chapman. Phase transitions and heterogeneity in lipid bilayers. *Science*, 181(4099):557–559, October 1973.

- [48] S H White. Formation of “solvent-free” black lipid bilayer membranes from glyceryl monooleate dispersed in squalene. *Biophysical Journal*, 23(3):337–347, September 1978. PMID: 698340 PMCID: PMC1473540.
- [49] B. Hille. Local anesthetics: Hydrophilic and hydrophobic pathways for the Drug-Receptor reaction. *The Journal of General Physiology*, 69(4):497–515, January 1977.
- [50] Anthony A. Fodor, Sharona E. Gordon, and William N. Zagotta. Mechanism of tetracaine block of cyclic Nucleotide-Gated channels. *The Journal of General Physiology*, 109(1):3–14, January 1997.
- [51] Thomas Heimburg and Andrew D. Jackson. The thermodynamics of general anesthesia. *Biophysical Journal*, 92(9):3159–3165, May 2007.
- [52] K. Wodzinska. Pores in lipid membranes and the effect of anaesthetics. *Reproduction*, 2008.
- [53] Anne Walter and John Gutknecht. Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes. *Journal of Membrane Biology*, 90(3):207–217, 1986.
- [54] D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, G. Poste, and G. Shepherd. Effects of local anesthetics on membrane properties i. changes in the fluidity of phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 394(4):504–519, July 1975.
- [55] T Hata, H Matsuki, and S Kaneshina. Effect of local anesthetics on the bilayer membrane of dipalmitoylphosphatidylcholine: interdigitation of lipid bilayer and vesicle-micelle transition. *Biophysical chemistry*, 87(1):25–36, September 2000. PMID: 11036967.
- [56] 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*, 5(17):3319, 2009.
- [57] Graham Hocking Hilary Edgcombe. local anaesthetic pharmacology. *Anaesthesia Tutorial of the Week*, 2005.
- [58] *Basic of Anesthesia*. publisher, 2007.



- [59] V F Antonov, E V Shevchenko, E T Kozhomkulov, A A Molñar, and Smirnova EYu. Capacitive and ionic currents in BLM from phosphatidic acid in  $Ca^{2+}$ -induced phase transition. *Biochemical and biophysical research communications*, 133(3):1098–1103, December 1985. PMID: 4084304.
- [60] M. Bottner and R. Winter. Influence of the local anesthetic tetracaine on the phase behavior and the thermodynamic properties of phospholipid bilayers. *Biophysical Journal*, 65(5):2041–2046, November 1993.
- [61] Gérard Debray Astrid Nehlig, Jean-Luc Daval. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*, 1992.
- [62] D D Lasic. The mechanism of vesicle formation. *Biochemical Journal*, 256(1):1–11, November 1988. PMID: 3066342 PMCID: PMC1135360.
- [63] A. D. Bangham and R. W. Horne. Negative stainint of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of molecular biology*, 8:660–668, May 1964. PMID: 14187392.
- [64] F Szoka and D Papahadjopoulos. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(9):4194–4198, September 1978. PMID: 279908 PMCID: PMC336078.
- [65] L. Saunders, J. Perrin, and D. Gammack. Ultrasonic irradiation of some phospholipids sols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 14(1):567–572, April 2011.
- [66] Ching-Hsien Huang. Phosphatidylcholine vesicles. formation and physical characteristics. *Biochemistry*, 8(1):344–352, 1969.
- [67] Robert C. MacDonald, Ruby I. MacDonald, Bert Ph.M. Menco, Keizo Takeshita, Nanda K. Subbarao, and Lan-rong Hu. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1061(2):297–303, January 1991.

- [68] Jean Rouquerol and Wojciech Zielenkiewicz. Suggested practice for classification of calorimeters. *Thermochimica Acta*, 109(1):121–137, December 1986.
- [69] Heiko Heerklotz. The microcalorimetry of lipid membranes. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 16(15):R441–R467, April 2004.
- [70] P.L. Privalov and N.N. Khechinashvili. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study. *Journal of Molecular Biology*, 86(3):665–684, July 1974.
- [71] Peter L. Privalov, Sergey A. Potekhin, and Serge N. Timasheff C. H. W. Hirs. [2]Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. In *Enzyme Structure Part L*, volume Volume 131, pages 4–51. Academic Press, 1986.
- [72] Kenneth J. Breslauer and Julian M. Sturtevant. A calorimetric investigation of single stranded base stacking in the ribo-oligonucleotide a7. *Biophysical Chemistry*, 7(3):205–209, November 1977.
- [73] Peter L Privalov and Anatoly I. Dragan. Microcalorimetry of biological macromolecules. *Biophysical Chemistry*, 126(1-3):16–24, 2007.
- [74] J M Sturtevant. Biochemical applications of differential scanning calorimetry. *Annual Review of Physical Chemistry*, 38(1):463–488, 1987.
- [75] Rodney L. Biltonen, Ernesto Freire, and John F. Brandts. Thermodynamic characterization of conformational states of biological macromolecules using differential scanning calorimetry. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 5(2):85–124, January 1978.
- [76] George P. Privalov, Peter L. Privalov, and Gary K. Ackers Michael L. Johnson. Problems and prospects in microcalorimetry of biological macromolecules. In *Part C: Energetics of Biological Macromolecules*, volume Volume 323, pages 31–62. Academic Press, 2000.
- [77] H. J. Hinz and F. P. Schwarz. Measurement and analysis of results obtained on biological substances with differential scanning calorimetry. *Pure Appl. Chem*, 73(4):745–759, 2001.

- [78] G. Della Gatta, M. J. Richardson, S. M. Sarge, and S. StÅlen. Standards, calibration, and guidelines in microcalorimetry. part 2. calibration standards for differential scanning calorimetry (IUPAC technical report). *Pure and applied chemistry*, 78(7):1455, 2006.
- [79] F. J. Sierra-Valdez, A. J. Cisneros-Mejorado, D. P. Sánchez Herrera, and J. C. Ruiz-Suárez. A thermal study of cellular motility by optical time-resolved correlation. *Review of Scientific Instruments*, 83(4):044302–044302–4, April 2012.
- [80] K Jorgensen, J H Ipsen, O G Mouritsen, D Bennett, and M J Zuckermann. A general model for the interaction of foreign molecules with lipid membranes: drugs and anaesthetics. *Biochimica et biophysica acta*, 1062(2):227–238, February 1991. PMID: 2004109.
- [81] D. B. Mountcastle, R. L. Biltonen, and M. J. Halsey. Effect of anesthetics and pressure on the thermotropic behavior of multilamellar dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(10):4906–4910, January 1978.
- [82] S Maruyama, T Hata, H Matsuki, and S Kaneshina. Effects of pressure and local anesthetic tetracaine on dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et biophysica acta*, 1325(2):272–280, April 1997. PMID: 9168152.
- [83] Takashi Shimooka, Akira Shibata, and Terada Hiroshi. The local anesthetic tetracaine destabilizes membrane structure by interaction with polar headgroups of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1104(2):261–268, March 1992.
- [84] Yvan Boulanger, Shirley Schreier, and Ian C. P. Smith. Molecular details of anesthetic-lipid interaction as seen by deuterium and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 20(24):6824–6830, 1981.
- [85] J.M. Vanderkooi, R. Landesberg, H. Selick II, and G.G. McDonald. Interaction of general anesthetics with phospholipid vesicles and biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 464(1):1–16, January 1977.

- [86] Vesselka P. Ivanova and Thomas Heimburg. Histogram method to obtain heat capacities in lipid monolayers, curved bilayers, and membranes containing peptides. *Physical Review E*, 63(4):041914, March 2001.
- [87] N. Chu, N. Kucerka, Y. Liu, S. Tristram-Nagle, and J. F. Nagle. Anomalous swelling of lipid bilayer stacks is caused by softening of the bending modulus. *Physical Review E*, 71(4):041904, 2005.
- [88] Andreas Blicher, Katarzyna Wodzinska, Matthias Fidorra, Mathias Winterhalter, and Thomas Heimburg. The temperature dependence of lipid membrane permeability, its quantized nature, and the influence of anesthetics. *Biophysical journal*, 96(11):4581–4591, June 2009. PMID: 19486680.
- [89] Thomas Heimburg. Mechanical aspects of membrane thermodynamics. estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1415(1):147–162, December 1998.
- [90] W. Schrader, H. Ebel, P. Grabitz, E. Hanke, T. Heimburg, M. Hoeckel, M. Kahle, F. Wentz, and U. Kaatz. Compressibility of lipid mixtures studied by calorimetry and ultrasonic velocity measurements. *J. Phys. Chem. B*, 106(25):6581–6586, 2002.
- [91] Thomas Heimburg and Andrew D. Jackson. The thermodynamics of general anesthesia. *Biophysical Journal*, 92(9):3159–3165, May 2007.
- [92] T. Heimburg. Lipid ion channels. *Biophysical Chemistry*, 150(1&3):2–22, August 2010.
- [93] Elisa R. Catapano, Laura R. Arriaga, Gabriel Espinosa, Francisco Monroy, Dominique Langevin, and Iván López-Montero. Solid character of membrane ceramides: A surface rheology study of their mixtures with sphingomyelin. *Biophysical Journal*, 101(11):2721–2730, December 2011.
- [94] Chiranjeevi Peetla, Andrew Stine, and Vinod Labhasetwar. Biophysical interactions with model lipid membranes: Applications in drug discovery and drug delivery. *Mol. Pharmaceutics*, 6(5):1264–1276, 2009.

- [95] Angelina Angelova, Borislav Angelov, Rada Mutafchieva, Vasil Garamus, Sylviane Lesieur, Sergio Funari, Regine Willumeit, and Patrick Couvreur. Swelling of a sponge lipid phase via incorporation of a nonionic amphiphile: SANS and SAXS studies. In Victor Starov and Karel Procházka, editors, *Trends in Colloid and Interface Science XXIV*, volume 138 of *Progress in Colloid and Polymer Science*, pages 1–6. Springer Berlin / Heidelberg, 2011.