

# Estudio por dinámica molecular de la localización de la benzocaína dentro de una membrana celular.

Sara Dinisa Oliveira Costa, José Javier López Cascales  
 Grupo de Bioinformática y Macromoléculas (BioMac), Área de Química Física,  
 Universidad Politécnica de Cartagena,  
 Aulario II, Campus de Alfonso XIII, 30203 Cartagena, Murcia, Spain  
 E-mail: [sara.costa@upct.es](mailto:sara.costa@upct.es), [javier.lopez@upct.es](mailto:javier.lopez@upct.es)

**Resumen.** *El mecanismo por el cual las moléculas con propiedades anestésicas interactúan con la membrana celular permanece aún bajo discusión. En este sentido, se ha realizado un estudio, mediante dinámica molecular con el objetivo de determinar la variación de la energía libre de una molécula anestésica (benzocaína) tras su paso a través de un modelo de membrana biológica. Con tal fin, se ha considerado un modelo de bicapa lipídica formado por DPPC con DPPS, donde el DPPS ha sido distribuido asimétricamente entre ambas capas de la bicapa lipídica. A partir del perfil de energía libre obtenido, ha sido posible determinar que la benzocaína, se localiza principalmente en la región de la cadena carbonada de los fosfolípidos, o en una zona más cercana al final de la región de las cabezas lipídicas en el interior de la membrana, en función de la presencia o no de DPPS.*

## 1 Introducción

Los compuestos con propiedades anestésicas son utilizados clínicamente desde hace más de 150 años debido a que inducen procesos reversibles como son la pérdida de conocimiento y alivio del dolor. Además, estos compuestos inducen a la relajación muscular y a la amnesia. Aunque sus efectos son ampliamente conocidos, aún no ha podido ser definido el mecanismo molecular de actuación de estas sustancias sobre sistema nervioso central [1]. En estudios previos se propusieron dos teorías según las cuales se explica el mecanismo de acción de una anestesia. La primera, propone que las moléculas anestésicas interactúan directamente con las proteínas que forman el canal iónico, bloqueando de esta forma la difusión de iones  $\text{Na}^+$ . Al impedir el paso de estos iones se bloquean los impulsos eléctricos y se verifican los efectos anestésicos [2]. La segunda teoría estableció que la potencia de la anestesia está relacionada con su coeficiente de partición entre agua y aceite de oliva (ley de Meyer-Overton) y que las propiedades estructurales de la membrana lipídica se ven afectadas por la presencia de la anestesia en su interior [3] y como consecuencia de una perturbación de las interacciones lipid-proteína, se ve afectado el canal de sodio..

A pesar de que varios estudios experimentales [4] y teóricos [5] se han centrado en el mecanismo de acción de sustancias anestésicas, todavía se mantiene la discusión sobre la localización de dichas sustancias en el interior de una membrana biológica. Para profundizar en este tema, se ha realizado un estudio, mediante dinámica molecular, sobre la transferencia de una molécula anestésica desde una disolución acuosa hasta el interior de una membrana celular. La molécula anestésica estudiada fue la benzocaína, que es un componente anestésico de tipo éster, ampliamente utilizado en tratamientos tópicos

debido a su baja solubilidad en agua [6]. Además, a pH fisiológico, la benzocaína, a diferencia de otras anestésicas locales usadas clínicamente como la lidocaína, se encuentra siempre en su forma neutra [7]. Para realizar este estudio, se ha utilizado un modelo de membrana celular asimétrica, propuesto anteriormente por Cascales *et al.* [8], con el objeto de reproducir una membrana biológica real. La membrana asimétrica se asemeja a la membrana celular de las células eucariotas, donde los fosfolípidos cargados (PS) se distribuyen asimétricamente en la capa más externa de sus membranas. Mediante la aplicación de técnicas de dinámica molecular, se ha determinado el potencial de fuerza media (PMF) para una molécula de benzocaína cuando ésta se mueve desde el seno de una disolución acuosa hasta el interior de una membrana fosfolipídica. El PMF aporta información termodinámica relacionada con las barreras energéticas y las zonas de localización favorable de la benzocaína dentro de la membrana.

## 2 Métodos y Modelos

### 2.1 Configuración del sistema

El sistema en estudio fue confinado en el interior de una caja de simulación tridimensional. Para ello se utilizó una molécula de DPPC que fue replicada 72 veces. Para generar una bicapa fosfolipídica se ubicaron 72 moléculas de DPPC distribuidas en 2 capas paralelas de 36 DPPC cada una, en el plano X-Y. Además, se añadió agua para rellenar los huecos a ambos lados de la bicapa. La asimetría en la bicapa se generó por sustitución de 12 DPPC de una de las capas por 12 DPPS. Además, para reproducir el área por lípido de una bicapa de DPPC, se retiraron 6 DPPC de la capa opuesta [8]. Debido a que las moléculas de DPPS presentan una carga negativa, se añadieron 12 iones sodio para mantener la

electroneutralidad del sistema. Finalmente, se añadieron 2 moléculas de benzocaína al sistema. De esta forma, se constituyó un sistema formado por 54 DPPC, 12 DPPS, 12 Na<sup>+</sup>, 2 benzocaínas y 2477 moléculas de agua.

## 2.2 Parámetros de simulación

Para llevar a cabo las simulaciones mediante dinámica molecular se utilizó el paquete GROMACS [9]. El intervalo de tiempo de integración fue de 2 fs. Para calcular las interacciones de Lennard-Jones se usó un *cutoff* de 1nm y las interacciones electrostáticas de largo alcance fueron evaluadas mediante el método de partículas en malla de Ewald. Antes del inicio de las simulaciones, se aplicó un proceso de minimización de energía para remover el exceso de energía o las tensiones provocadas por solapamiento de átomos vecinos. El sistema fue acoplado a una temperatura de 350K y una presión de 1atm, mediante un algoritmo de acoplamiento. La temperatura debe ser tal que el sistema permanece en un estado de líquido cristalino. Los parámetros de simulación están descritos en más detalle en las referencias [8,10].

## 2.3 Potencial de Fuerza Media y Energía libre

La variación de energía libre de la molécula de benzocaína desde la disolución acuosa hasta el interior de la bicapa puede ser calculada a través de la siguiente ecuación:

$$\Delta G_b(z) = -RT \ln \frac{C_b^{eq}}{C_b} = -RT (PMF)$$

donde R es la constante de los gases, T la temperatura, C<sub>b</sub><sup>eq</sup> el perfil de concentración de la benzocaína a lo largo de la membrana y C<sub>b</sub> la concentración de la benzocaína en la disolución acuosa.

Para el cálculo de esta propiedad, la alta hidrofobicidad de la molécula anestésica en agua se reveló como un problema, una vez que proporciona resultados con una estadística muy pobre. Para aumentar la estadística de los resultados obtenidos se utilizó el método de muestreo de umbrela. De esta forma, se determinó el PMF en una determinada región de interés, tal y como lo hicieron antes MacCallum *et al* [11].

De esta forma, a partir del sistema descrito anteriormente se realizaron 36 simulaciones independientes de 40 ns cada una. En cada una de estas simulaciones, las moléculas de benzocaína fueron restringidas a una determinada distancia del centro de la bicapa por un potencial armónico de 3000 kJmol<sup>-1</sup> a lo largo del eje Z (dejándolas libre en los ejes X-Y). Para cada una de las simulaciones, las dos moléculas de benzocaína estaban separadas entre

si por una distancia de 3,5 nm a lo largo del eje Z de forma a evitar cualquier posibilidad de interacción entre ambas. Dichas moléculas fueron movidas 0,1 nm en cada una de las simulaciones consecutivas, dentro de una ventana de posiciones de interés. El PMF se calculó entre -3,5 nm y 3,5 nm a lo largo del eje Z, considerando la origen de éste en la zona central de la membrana.

## 3 Resultados y discusión

La Fig.1(b) representa el perfil de variación de energía libre de la benzocaína a través de la membrana. Se consideró el valor de energía libre en el seno de la disolución acuosa (Z=-3,5nm) igual a cero. Entre la diferencia de valores de energía libre obtenidos a ambos lados de la bicapa se estimó un error de 0,34 kJmol<sup>-1</sup>. A partir de la Fig.1 se puede observar que la variación de la energía libre en la membrana asimétrica presenta dos máximos en la interfase lípido/agua. A partir de la altura de dichos picos se determina la barrera de energía que la molécula de benzocaína debe sobrepasar para penetrar en el interior de la membrana lipídica. Esta barrera está localizada en posiciones de Z iguales a -2,21 y 2,72 nm y presenta valores de energía libre de 4,42 y 1,51 kJmol<sup>-1</sup> en ausencia y en presencia de DPPS, respectivamente.

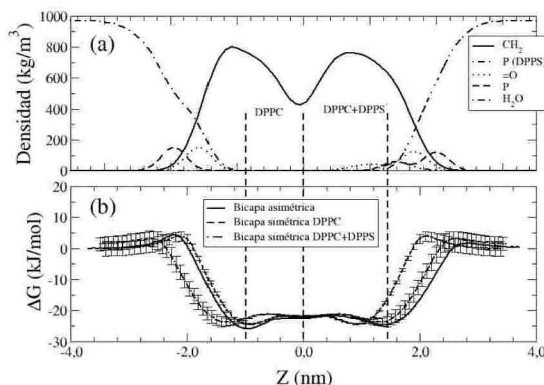


Figura 1. (a) Densidades atómicas de los componentes del sistema y (b) perfil de energía libre de la benzocaína a través de la membrana.

Por otro lado, el valor mínimo de la variación de la energía ocurre en posiciones Z=-0,98 y 1,37 nm, con valores de -25,9 y -24,6 kJmol<sup>-1</sup>, para las capas en ausencia y en presencia de DPPS, respectivamente. Éstos valores coinciden con el rango de valores experimentales entre 25-30 kJmol<sup>-1</sup>, medido por Hata *et al* [12] para anestésicos neutros en bicapas de DPPC. La localización del mínimo de energía libre está fuertemente afectada por la asimetría de la bicapa. Así, en la capa solo con DPPC el mínimo de energía libre coincide claramente con la densidad máxima del grupo metileno de las colas lipídicas (véase Fig.1(a)). Por otro lado, en la capa con DPPC+DPPS el mínimo se sitúa desplazado hacia la región ocupada por los grupos carbonilo y fósforo de los lípidos. Los resultados obtenidos por dinámica

molecular están correlacionados con los resultados experimentales obtenidos por Kuroda *et al* [4] para bicapas de PC y bicapas mixtas de PC y PS, PE.

En la Fig.1(b) también se puede observar el perfil de energía libre de la benzocaína a través de dos membranas celulares simétricas, una constituida por 36 DPPC en cada capa y otra por 24 DPPC+12DPPS en cada capa. En la Fig.1 se puede observar una gran correlación entre cada uno de los perfiles de energía libre de las membranas simétricas y su respectiva capa de la membrana asimétrica.

A partir de los resultados termodinámicos obtenidos es posible calcular la probabilidad de encontrar la benzocaína en uno u otro lado de la membrana celular. Para ello se puede utilizar la siguiente ecuación:

$$\Delta G_l = -K_B T \ln \kappa_l$$

donde  $\Delta G_l$  es el valor del mínimo de energía libre en cada una de las capas,  $K_B$  es la constante de Boltzman, T la temperatura y  $\kappa_l$  la probabilidad de encontrar la benzocaína a uno u otro lado de la bicapa. A partir de los valores representados en la Fig.1, haciendo uso de la ecuación anterior se ha

calculado que  $\frac{\kappa_1}{\kappa_2} = 0,92$ . Este resultado implica

que la probabilidad de encontrar la benzocaína a uno u otro lado de la bicapa es prácticamente la misma, esto es, 48% de probabilidad para la capa constituida por DPPC puro y 52% de probabilidad para la capa mixta de DPPC+DPPS.

## 4 Conclusiones

La variación de la energía libre es una propiedad termodinámica muy relevante en el estudio de los estados más estables de un sistema. Se ha determinado el perfil de la energía libre de una molécula de benzocaína cuando ésta difunde desde la disolución acuosa hasta el interior de una bicapa lipídica mediante técnicas computacionales.

A partir del perfil de energía libre se demostró que la localización más probable de la benzocaína en el interior de la bicapa depende en gran medida de la composición fosfolipídica de la membrana. Así, se concluye que la benzocaína se localiza en el centro de las colas lipídicas en la capa solo con DPPC. Por el contrario, en la capa mixta DPPC y DPPS (cargado negativamente) la benzocaína se encuentra en la interfase entre el fin de las cabezas lipídicas y el comienzo de las cadenas carbonadas de las colas.

Además se determinó que la probabilidad de encontrar la benzocaína a uno u otro lado de la bicapa asimétrica es sensiblemente la misma.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo de la Fundación Séneca de la Región de Murcia, a través del proyecto 08647/PPC/08.

## Referencias

- [1] Thompson, S., Wafford, K. "Mechanism of action of general anaesthetics - new information from molecular pharmacology" in *Curr. Opin. Pharmacol.* vol. 1, pp.78-83 (2001)
- [2] A. Scholz. "Mechanism of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels" in *British J. Anaesthesia*, pp. 52-61, vol 89, (2002).
- [3] D.C. Mitchell, J.T.R. Lawrence, and B.J. Litman. "Primary alcohols modulate the activation of the g protein-coupled receptor rhodopsin by a lipid-mediated mechanism" in *J. Biol. Chem.*, pp. 19033-19036, vol. 271, (1996).
- [4] Y. Kuroda, H. Nasu, Y. Fujiwara, and T. Nakagawa. "Orientation and location of local anaesthetic benzocaine and butamben in phospholipid membranes as studied by h-nmr spectroscopy" in *J. Membrane Biology*, pp. : 117-128, vol. 117, (2000).
- [5] J.J.L. Cascales, J.G.H. Cifre, and J.G. de la Torre. "Anaesthetic mechanism on a model biological membrane: A molecular dynamics simulation study" in *J. Phys. Chem. B*, pp. 625-631, vol. 102, (1998).
- [6] J.F. Butterworth and G.R. Strichartz. "Molecular mechanisms of local- anesthesia - a review" in *Anesthesiology*, pp. 711-734, vol. 72, (1990).
- [7] L.M.A. Pinto, D.K Yokaichiya, L.F. Fraceto, and E. de Paula. "Interaction of benzocaine with model membranes" in *Biophys. Chem.*, pp. 213-223, vol. 87, (2000).
- [8] J.J.L. Cascales, T.F. Otero, B.D. Smith, C. Gonzalez, and M. Marquez. "Model of an asymmetric dppc/dpps membrane: Effect of asymmetry on the lipid properties. a molecular dynamics simulation study" in *J. Phys. Chem. B*, pp. 2358-2363, vol. 110, (2006).
- [9] E. Lindahl, B. Hess, and D. van der Spoel. "Gromacs 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis" in *J. Mol. Model.*, pp. 306-317, vol. 7, (2001).
- [10] R. D. Porasso, W. F. D. Bennett, S. D. Oliveira-Costa, and J.J. López Cascales. "Study of the benzocaine transfer from aqueous solution to the interior of a biological membrane" in *J. Phys. Chem. B*, pp.9988- 9994, vol. 113, (2009).
- [11] J.L. Maccallum, W.F. Drew Bennett, and D.P. Tieleman. in *Biophys. J.*, pp. 3393-3404, vol. 94, (2008).
- [12] T. Hata, T. Sakamoto, H. Matsuki, and S. Kaneshima. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, pp. 77-84, vol.22, (2000).