



“Caracterización estructural de liposomas y su interacción con moléculas anfifílicas de interés farmacológico”

Tesis Doctoral en Ciencias Químicas Biol. Francesca Giudice

Departamento de Química Biológica
CIQUIBIC- Centro de Investigación en Química Biológica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

CONICET



Universidad
Nacional
de Córdoba

C I Q U I B I C

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección de la Dra. Maria Laura Fanani, y se presenta a consideración de dicha Facultad para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Dra. Maria Laura Fanani

Comisión Evaluadora:

Dr. Bruno Maggio

Dra. Nancy Ferreyra

Dr. Santiago Palma

Dra. Mónica Andrea Pickholz
(Evaluador Externo)

Dedico esta tesis a este país y a mi familia

Abreviaturas

a_o : Área óptima

ASCn: Alquíl ésteres del ácido L-ascorbico

ASC12: Laurato de ascorbilo

ASC14: Miristato de ascorbilo

ASC16: Palmitato de ascorbilo

Cer: Ceramida

Col: Colesterol

CF: Carboxifluoresceina

DIC: Microscopía de interferencia diferencial

DLS: Dispersión dinámica de la luz

DPH: 1,6-difenil-1,3,5 hexatrieno

F: Fase fluida

G: Fase gel

GP: Polarización generalizada

GUVs: Vesículas unilamelares gigantes

H: Estructura hexagonal

ITO: Óxido de indio y estaño

L: Estructura lamelar

Laurdan: 6-dodecabnoil-2-dimetilaminonaftaleno

L_α : Fase líquido-desordenada

L_β Fase líquido-ordenada

l_c : Longitud crítica de la cadena

L_d: Fase líquido-desordenada

L_o: Fase líquido-ordenada

LUVs: Vesículas unilamelares grandes

MLVs: Vesículas multilamelares

P_c: Parámetro crítico de empaquetamiento

PCs: Fosfatidilcolinas/ lecitinas

POPC: 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina

Q: Estructura cúbica

R: Liberación

Rho-Pe: Rhodamina-fosfatidiletanolamina

SAXs: Dispersión rayos-X a bajo ángulo

SEM: Error estándar de la media

SM: Esfingomielina

TX-100: Tritón X-100

v: Volumen de la cadena hidrocarbonada

Índice

RESUMEN 3

OBJETIVOS..... 8

1 INTRODUCCIÓN 9

- 1.1 Biomembranas.....9
- 1.2 Polimorfismo lipídico10
- 1.3 Fosfolípidos, Ceramida y Colesterol.....14
- 1.4 Membranas modelo con coexistencia de fases: mezclas ternarias.....18
- 1.5 Anfífilos solubles con interés farmacológico20
- 1.6 Los alquil ésteres del ácido L-ascórbico22

2 MATERIALES Y METODOS 25

- 2.1 Síntesis del laurato y miristato de ascorbilo25
- 2.2 Preparación de vesículas modelo26
- 2.3 Análisis de la distribución de tamaño de vesículas unilamelares grandes por dispersión dinámica de la luz28
- 2.4 Análisis estructural de agregados lipídicos mediante dispersión de rayos X a bajo ángulo ..29
- 2.5 Determinación de actividad detergente de fármacos anfifílicos32
- 2.6 Estudios de la polaridad de la superficie de vesículas unilamelares grandes mediante el análisis de la polarización generalizada del Laurdan33
- 2.7 Análisis de la microviscosidad de las membranas de vesículas unilamelares grandes mediante anisotropía de 1,6-difenil-1,3,5,hexatrieno35
- 2.8 Ensayos de liberación de contenido vesicular36
- 2.9 Microscopia confocal de vesículas unilamelares gigantes37

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 39

| | |
|---|----|
| 3.1 Reactividad estructural de membranas lipídicas conteniendo dominios enriquecidos en colesterol y ceramida | 39 |
| 3.1.1 Racionalización de las membranas complejas a analizar: distribución en el diagrama de fases de 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina, colesterol y ceramida..... | 39 |
| 3.1.2 Análisis del tamaño y distribución poblacional de liposomas ternarios por dispersión dinámica de la luz | 40 |
| 3.1.3 Análisis estructural de agregados ternarios por dispersión de rayos X a bajo ángulo | 44 |
| 3.1.4 Ensayos de estabilidad estructural de vesículas unilamelares grandes sometidos a la acción de un detergente no iónico | 46 |
| 3.2 Reorganización de las vesículas de fosfolípidos inducida por los alquil ésteres del ácido L-ascorbico | 49 |
| 3.2.1 Los alquil ésteres del ácido L-ascorbico inducen reorganización estructural de liposomas de 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina | 49 |
| 3.2.2 Análisis de la polaridad de la superficie de las membranas de vesículas unilamelares grandes de 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina tratadas con los alquil ésteres del ácido L-ascorbico mediante la polarización generalizada del Laurdan. | 54 |
| 3.2.3 Análisis de la microviscosidad de bicapas de vesículas unilamelares grande de 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina incubadas con los alquil ésteres del ácido L-ascorbico, mediante anisotropía del 1,6-difenil-1,3,5 hexatrieno | 56 |
| 3.2.4 Observación en tiempo real, de vesículas unilamelares gigantes de 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina bajo la acción de los alquil ésteres del ácido L-ascorbico por microscopia confocal..... | 59 |
| 3.2.5 Capacidad antioxidante de los alquil ésteres del ácido L-ascorbico sobre componentes de membrana..... | 62 |
| 3.2.6 Polarización generalizada del Laurdan en vesículas unilamelares grandes con distintas composición lipídica luego del enfrentamiento a los alquil ésteres del ácido L-ascórbico..... | 64 |

4 CONCLUSIONES 66

5 REFERENCIAS..... 71

6 TRABAJO PUBLICADO..... 78

RESUMEN

Esta tesis se focalizó en la caracterización estructural de liposomas conteniendo componentes de interés biológico como colesterol y la ceramida y su interacción con moléculas anfifílicas de interés farmacológico, como lo son los alquil ésteres del ácido L-Ascórbico con distintos largos de su cadena hidrocarbonada.

En una primera etapa investigamos las propiedades estructurales y reológicas de membranas modelos que contienen 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina y sus modificaciones en presencia de colesterol y ceramida. Estos lípidos han sido objeto de renovado interés desde que se propusiera la existencia de entidades lípido-proteicas, bautizadas como “rafts” o balsas lipídicas ricas en esteroides y esfingolípidos como centros de alta actividad de enzimas involucradas en transducción de señales celulares.

Se analizó la estructura adquirida de dispersiones lipídicas de composiciones binarias y ternarias de 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina, colesterol y ceramida, sobre la base de los estudios previos. Sometimos las dispersiones lipídicas a estudios estructurales para determinar la distribución de tamaño de las vesículas formadas. A pesar de que las vesículas fueron forzadas a adoptar estructuras pequeñas al ser extruidas por un filtro de policarbonato con poros de 100 nm en algunos casos no se obtuvieron poblaciones con una distribución de tamaño homogénea. Los resultados logrados sugieren que la presencia de colesterol y ceramida inducen reestructuración de las bicapas estudiadas. En particular las mezclas que presentan coexistencia de fase Líquido desordenada - Líquido ordenada, y Líquido desordenada - Gel mostraron la presencia de estructuras más grandes, probablemente debido a fenómenos de agregación. Esta hipótesis fue confirmada por estudios de dispersión de rayos X de bajo ángulo. El análisis mostró que la mitad de las estructuras corresponden a bicapas interaccionando con regularidad estructural, lo cual se correlaciona con fenómenos de aposición y agregación parcial de las vesículas. La heterogeneidad observada en las

poblaciones con bajo contenido de 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina puede deberse a que los lípidos no se distribuyeron homogéneamente en las vesículas produciendo variaciones de composición entre las distintas poblaciones.

Adicionalmente a los estudios estructurales de las vesículas lipídicas, nos interesó evaluar la estabilidad de estas estructuras con respecto a algún perturbante de membrana. El agente elegido fue el detergente no iónico Tritón X-100 que en concentraciones subléxicas induce la pérdida del contenido acuoso en vesículas de 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina. La presencia de colesterol introdujo una protección de la membrana al efecto del detergente proporcional a su contenido, el cual fue contrarrestado proporcionalmente por la presencia de ceramida. Esto puede deberse a que colesterol induce cambios de las propiedades reológicas de las membranas produciendo la aparición de la fase Líquido ordenada, con una estructura más compacta y resistente. Por otro lado la presencia de ceramida induce la formación de dominios en estado Gel que forman interfaces laterales (peridominio) entre esta fase rígida y una fluida, lo que tiene la potencialidad de favorecer los defectos laterales y permitir la salida de componentes del compartimiento intravesicular.

En nuestros estudios utilizamos el detergente Tritón X-100 como agente desestabilizante, pero en un entorno biológico dicho desestabilizante puede ser cualquier molécula anfipática natural, como es el caso de otros actores en la señalización celular, o sintética como distintos fármacos anfipáticos con capacidad de integrarse y cambiar las propiedades fisicoquímicas de las membranas lipídicas. En este contexto, en una segunda etapa del desarrollo de esta tesis, focalizamos nuestra atención al efecto que tiene sobre las membranas biológicas la incorporación de fármacos de la familia de los alquil ésteres del ácido L-ascórbico. Se pretendió profundizar en el entendimiento de los mecanismos de acción de los fármacos en estudio y el efecto del largo de su cadena hidrocarbonada.

Se estudió el eventual efecto solubilizante del laurato de ascorbilo, miristato de ascorbilo y palmitato de ascorbilo en liposoma multilamelares de 1-palmitoil 2-

oleoil fosfatidilcolina. En ninguno de estos casos se observaron que fueran capaces de solubilizar los sistemas lipídicos en estudio. Seguimos investigando otros fenómenos que pudieran producir los alquil ésteres del ácido L-ascorbico sobre las membranas y que evidencien su integración a los agregados lipídicos. Al enfrentar vesículas lipídicas de 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina con suspensiones de alquil ésteres del ácido L-ascórbico observamos cambios en la distribución del tamaño de vesículas y reestructuración de las membranas con aparición de poblaciones grandes, que evidencian la integración de los alquil ésteres del ácido L-ascórbico a las vesículas y que resultó dependiente de la longitud de la cadena alquílica de los fármacos.

Estos resultados nos condujeron a evaluar la integridad de la membrana y / o la formación de poros concomitante a la reestructuración de la membrana inducida por los alquil ésteres del ácido L-ascórbico. Por esta razón, se realizaron ensayos de liberación de carboxifluoresceína desde el compartimento intravesicular tras la adición de los alquil ésteres del ácido L-ascórbico. Sólo el miristato de ascorbilo indujo una liberación significativa de contenido. Este resultado inesperado revela que la capacidad de alteración de la membrana o formación de poros no es lineal con la longitud de la cadena alquílica de los alquil ésteres del ácido L-ascórbico, y que probablemente dependa de efectos concertados y complementarios, relacionados a las diferentes propiedades de los agregados de alquil ésteres del ácido L-ascórbico y a las distintas propiedades reológicas de las membranas producidas por la inserción de los fármacos.

Se estudiaron cambios en las propiedades de membrana inducidos por los alquil ésteres de ácido L-ascórbico en hidratación de la superficie y en la microviscosidad del ambiente hidrofóbico de la membrana. Mediante mediciones fluorimétricas de la polarización generalizada del Laurdan y de la anisotropía de fluorescencia del difenil hexatrieno. El miristato de ascorbilo resultó ser el modulador más eficiente de ambos parámetros, seguido por el laurato de ascorbilo en el caso de la hidratación de superficie o por el palmitato de ascorbilo en las

mediciones de la microviscosidad de la membrana. El considerable aumento de la polarización generalizada del Laurdan y el pobre efecto que tiene en la anisotropía la incorporación del laurato de ascorbilo puede reflejar una inserción más superficial de este fármaco en la bicapa. Por otro lado el comportamiento del palmitato de ascorbilo puede estar relacionado con la tendencia de este compuesto a segregarse lateralmente en dominios de tipo geles enriquecidos en el fármaco, previamente observados en sistemas de monocapa lipídica.

Para una visualización directa y en tiempo real de los efectos de los alquil esterios del ácido L-ascórbico, utilizamos vesículas unilamelares gigantes y las observamos por microscopia confocal de fluorescencia. La adición de alquil ésteres del ácido L-ascórbico a las vesículas indujo una disminución de tensión de la membrana en diferente medida en todos los sistemas estudiados, la cual se evidencia por las deformaciones de las membranas y desestabilización de su integridad con liberación de contenido intravesicular. En este sentido, el miristato de ascorbilo resultó ser el compuesto más activo, induciendo el estiramiento de las vesículas en la dirección del flujo del medio. El laurato de ascorbilo mostró un comportamiento similar, pero de manera moderada mientras que el palmitato de ascorbilo solamente indujo un aumento en la rugosidad de la membrana. Además el palmitato de ascorbilo indujo la segregación de dominios de fase Gel enriquecido en el fármaco. Estos experimentos de microscopía confocal también mostraron una disminución notable de la intensidad de fluorescencia causada por reducción química del grupo rodamina del fluoróforo utilizado. Esta pérdida de fluorescencia no fue reproducida por el ácido ascórbico soluble, lo cual indicaría su inserción en las membranas para que puedan ejercer su función antioxidante. Considerando que los tres compuestos tienen una capacidad reductora similar, estos cambios pueden estar directamente relacionados a la capacidad de inserción de cada uno de ellos.

La información bibliográfica revela que los derivados alquílicos del ácido L-ascórbico que poseen cadenas alquílicas de distintos largos utilizados en diferentes preparaciones farmacológicas tienen sutiles diferencias en la eficacia terapéutica.

Estas diferencias pueden estar relacionadas a las diferentes interacciones de los alquil ésteres del ácido L-ascórbico con las membranas celulares. La diferente actividad encontrada para cada uno de ellos en el presente trabajo puede dar cuenta de un potencial uso farmacológico característico de cada derivado, y contribuir al diseño de nuevas aplicaciones que tengan interfaces biológicas como destino principal.

OBJETIVOS

1. *Comparar la reactividad estructural de membranas conteniendo dominios líquido-condensados de ceramida o dominios líquido-ordenados enriquecidos en ceramida y colesterol.*
2. *Estudiar los cambios de la dinámica estructural inducidos por los alquil ésteres del ácido L-ascórbico en membranas fosfolipídicas.*

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Biomembranas

El estudio estructural de biomembranas a través de nuevos métodos y técnicas biomiméticas representa una frontera interdisciplinaria del conocimiento, donde se conjugan conceptos provenientes del área fisicoquímica con la interpretación y perspectiva biológica. No es posible explicar el comportamiento de un ensamble supramolecular solamente en base a propiedades de moléculas individuales ya que emergen nuevas propiedades que pertenecen al sistema en su conjunto. Durante esta tesis resultó interesante el análisis de interacciones moleculares en estado de equilibrio y fue importante complementar nuestros estudios con enfoques que contemplen la evolución cinética de procesos y estructuras del sistema en estudio, los cuales condicionan diferentes niveles espacio-temporales que se influyen y regulan mutuamente (Maggio et al. 2006; Fanani et al. 2010).

Durante el siglo pasado diversos estudios se focalizaron en las propiedades mecano-químicas de las membranas de eritrocitos como por ejemplo densidad, módulo elástico, viscosidad, energía libre superficial y módulo de deformación. Dichos estudios mostraban en los resultados diferencias significativas y difíciles de reproducir, problemas que se adjudicaron, en gran medida, a la variabilidad entre las membranas celulares (Mesa et al. 2010). Una estrategia alternativa para el estudio antes mencionado consistió en caracterizar las fases lipídicas en equilibrio en modelos de membrana generados a partir de mezclas definidas de lípidos (por ejemplo de 2 o 3 componentes), asumiendo que dichas fases, representaban estructuras análogas a las presentes en las células. Este interés llevó a la caracterización de estas fases en monocapas y bicapas sintéticas (Córsico et al.

2013) y permitió establecer los principios termodinámicos que subyacen a la segregación de fases inter e intramonocapas.

El entendimiento de la estructura adquirida en estos sistemas artificiales de membranas autoorganizadas con coexistencia de fases, la dinámica y la comunicación entre ellas ha demostrado ser de utilidad al sentar las bases de las características biofísicas de dominios lípido-proteicos segregados lateralmente en biomembranas. La coexistencia de fases lipídicas, conocida por décadas en sistemas artificiales, ha sido objeto de renovado interés desde que se propusiera la existencia de entidades lípido-proteicas, bautizadas como “rafts”, como centros de alta actividad de enzimas involucradas en transducción de señales celulares (Brown & London 1998). Su existencia, su composición y estructura, han estado en cuestionamiento en los últimos años (Maggio et al. 2006). Uno de los grandes problemas en esta temática consiste en que la regulación molecular y supramolecular de estas estructuras autoorganizadas es altamente dinámica y se realiza en diferentes niveles de complejidad (Maggio et al. 2006; Fanani & Maggio 2010). Por ello nuestros estudios utilizando membranas modelo apuntan a proveer una interpretación con una nueva perspectiva sobre los fenómenos de reestructuración de membranas.

1.2 Polimorfismo lipídico

Aunque tengan una considerable variación en su estructura molecular (Heimburg 2007) todos los lípidos de las membranas biológicas tienen una característica común, son anfifílos, es decir una parte de la molécula es hidrofóbica (en general las cadenas hidrocarbonadas) y la otra parte es hidrofílica (la cabeza polar). Cuando moléculas anfifílicas son dispersadas en solución acuosa se autoorganizan en respuesta al efecto hidrofóbico de forma tal que la “cabeza” hidrofílica se expone al contacto con el agua y las “colas” hidrofóbicas se orientan alejadas del agua en los diferentes agregados como micelas, liposomas u otras

fases no-bicapa. De esta forma el sistema autoestructurado en suspensión acuosa aumenta su entropía debido a un incremento del desorden de las moléculas de agua (Heimburg 2007; Israelachvili 1991).

Las dispersiones de lípidos en agua resultan en sistemas polimórficos. Incluso para los lípidos purificados individuales hay más de un tipo de estructura organizada cuando se hidratan (Seddon & Templer 1995; Córscico et al. 2013). La forma particular que predomina depende de parámetros tales como la concentración de lípidos, la temperatura, la presión, la fuerza iónica y pH.

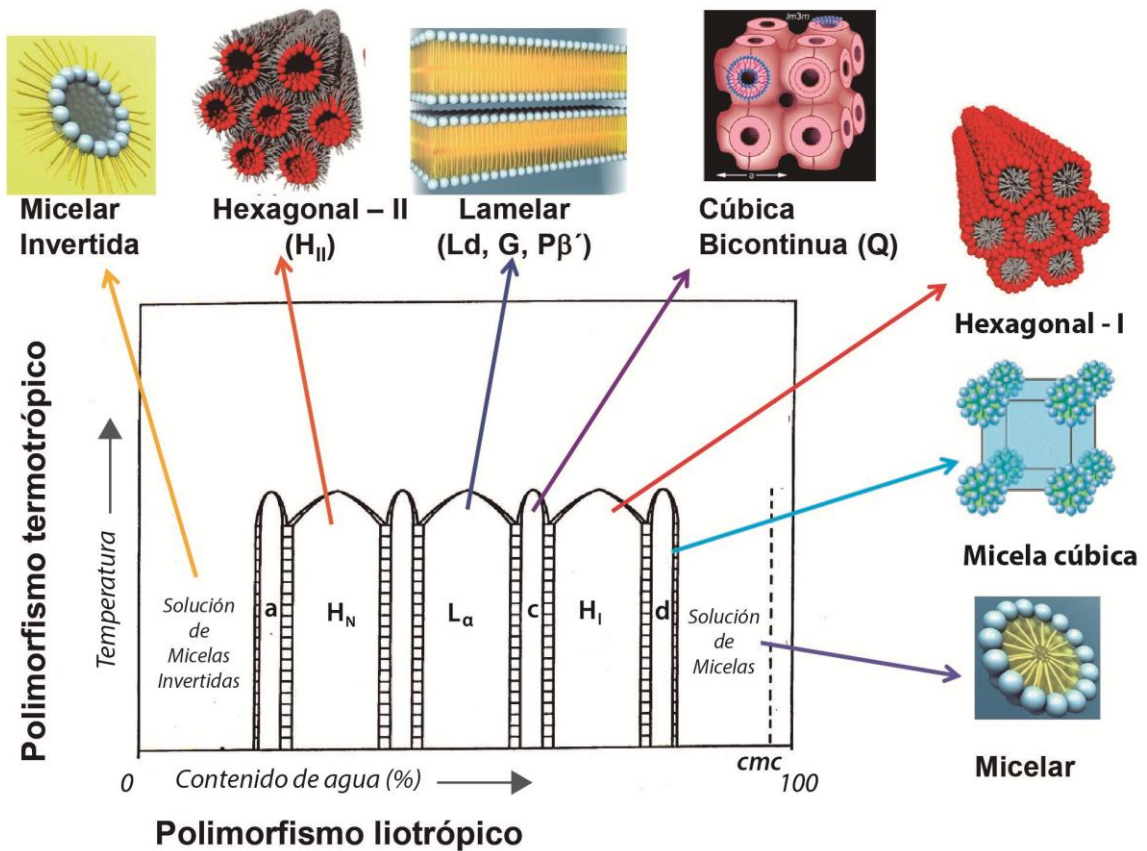


Figura 1. Diagrama de fases lípido / agua hipotético, para las transiciones impulsadas mediante la variación del contenido de agua. Las Regiones designadas a, b, c y d contienen fases intermedias, muchos de los cuales son cúbicas. Adaptado de (Seddon & Templer 1995).

Las técnicas de calorimetría diferencial de barrido y difracción de rayos X se utilizan a menudo juntas para definir los límites de fase en los diagramas de fases lípido-agua (Seddon & Templer 1995). Así, se pueden describir el comportamiento de un sistema lipídico con respecto a la temperatura (comportamiento termotrópico) o con respecto al contenido de agua (comportamiento liotrópico).

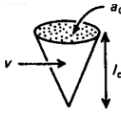




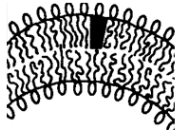

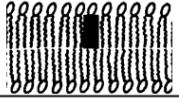

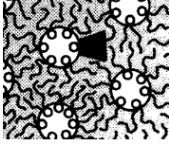
La Figura 1 muestra áreas en el diagrama de fases donde predominan estructuras hexagonales (H) cúbicas (Q) o lamelares (L). Dentro de éstas últimas se ubican las fases que típicamente forman los fosfolípidos al dispersarse en agua y que a su vez se diferencian según la dinámica de las cadenas hidrocarbonadas. Así, a bajas temperaturas los fosfolípidos se organizan en lamelas cuyas cadenas están principalmente, en conformación elongada (*all-trans*) y las cabezas polares se organizan alrededor de una red hexagonal en el plano de la lamela. Dicha fase se conoce como L_{β} o gel (en este trabajo se abreviará G). Si las suspensiones de fosfolípidos son calentadas ocurrirá un cambio de fase en las cadenas hidrocarbonadas, las cuales aumenta la dinámica de isomerización *trans-gauche* y las interacciones intermoleculares se debilitarán. Esta fase llamada L_{α} o líquido desordenada (L_d , nomenclatura que se tomará en este trabajo) muestra una mayor difusión en el plano de la lamela, mayores áreas por molécula y menor espesor de las lamelas (Seddon & Templer 1995).

La geometría o propiedades de empaquetamiento de los lípidos determinan la interacción entre moléculas en el agregado lipídico. Una geometría complementaria optimiza las interacciones intermoleculares de corto alcance del tipo van der Waals en estructuras de distintas curvaturas, como se describe en la Tabla 1. Dichos factores moleculares geométricos dependen de su área óptima (a_0), el volumen de su cadena o cadenas hidrocarbonada (v), y la longitud máxima que las cadenas pueden presentar (longitud crítica de la cadena l_c). La relación de estos parámetros moleculares semiempíricos (sus valores se basan en compilaciones de datos

experimentales) determinan el “parámetro crítico de empaquetamiento” (P_c) según la siguiente relación (Israelachvili 1991; Córscico et al. 2013):

$$P_c = \frac{v}{a_0 l_c} \quad (\text{Ec. 1})$$

Tabla 1: Formas de empaquetamiento de los lípidos y estructuras que forman. Extraído de Ref. (Israelachvili 1991)

| Lípidos | Parámetro crítico (P_c) | Forma crítica de empaquetamiento | Estructuras formadas |
|--|-----------------------------|---|---|
| Lípidos de una cadena (surfactantes) con cabezas polares grandes | $< 1/3$ | Cono  | Micelas esféricas  |
| Lípidos de una cadena con cabeza polar pequeña | $1/3 - 1/2$ | Cono truncado  | Micelas cilíndricas  |
| Lípidos con doble cadena y cabezas polares grandes. Ejemplo: PC, SM | $1/2 - 1$ | Cono truncado  | Bicapas curvas  |
| Lípidos con doble cadena y cabezas polares pequeñas | ~ 1 | Cilindro  | Bicapas planas  |
| Lípidos con doble cadena (insaturadas) y cabezas polares pequeñas o esteroides | > 1 | Cono truncado invertido  | Micelas invertidas  |

Por lo tanto conociendo los parámetros geométricos de cada lípido se puede predecir la estructura que formará al agregarse en medio acuoso. Asimismo una molécula con un P_c , por ejemplo > 1 y que está formando parte de una bicapa

plana contribuye a lo que se denomina “frustración topológica” (Seddon & Templer 1995). Ésta última representa una energía potencial que sería liberada si dicha membrana sufriera una transición hacia una estructura donde la mayoría de las moléculas estén en el mínimo energético, es decir donde la estructura corresponda a su P_c .

Relacionado a estos conceptos se desprende que una determinada membrana compleja (con varias especies moleculares) tendrá una energía mínima en una estructura con una curvatura definida. Dicha curvatura se denomina la “curvatura espontánea” de la membrana y es una propiedad de conjunto de todos los componentes de membrana. Si ambas hemicapas de una bicapa tienen alguna diferencia de composición entonces podrán tener diferente curvatura espontánea y por lo tanto estabilizarán una bicapa curva. Asimismo, cambios en la composición de las membranas, (incorporación de anfifilos, reacciones enzimáticas que involucran lípidos), tienen la potencialidad de cambiar la estructura espontánea de la membrana e inducir un cambio morfológico de la estructura lipídica (Seifert & Lipowsky 1995).

1.3 Fosfolípidos, Ceramida y Colesterol

Las fosfatidilcolinas (PCs), llamadas también lecitinas, se encuentran entre los lípidos más abundantes en las membranas celulares. Las PCs son fosfolípidos zwitteriónicos (Figura 2) que cuando se suspenden en soluciones acuosas forman bicapas lipídicas, las cuales corresponden a la estructura básica de las membranas celulares. Estos lípidos pueden contener cadenas hidrocarbonadas de distintos largos y grados de insaturación, lo que influye en sus propiedades termotrópicas (Heimburg 2007).

Los esfingolípidos son una clase importante de lípidos de las membranas celulares animales y vegetales y son los más abundantes en los tejidos de los organismos más complejos. Son lípidos derivados del aminoalcohol insaturado

esfingosina y pueden o no contener fosfato. Así podemos dividirlos en los fosfoesfingolípidos de los cuales el más abundante es la esfingomielina (SM), y glucoesfingolípidos, los cuales contienen cabezas polares con hidratos de carbono. En todos los esfingolípidos la esfingosina se halla unida a un ácido graso de cadena larga mediante un enlace amida formando la ceramida (Cer) (Heimburg 2007). La mayoría de los tejidos de mamíferos contienen Cer con típicamente cadenas alquílicas de C14 a C24, saturadas y monoinsaturadas, siendo la que contiene C16 la más abundante. Cer representa un esfingolípidos sencillo conteniendo un grupo polar muy pequeño compuesto por un hidroxilo acompañado por un grupo amida y un doble enlace (Figura 2) por lo tanto es un lípido altamente hidrofóbico y presenta un $Pc > 1$.

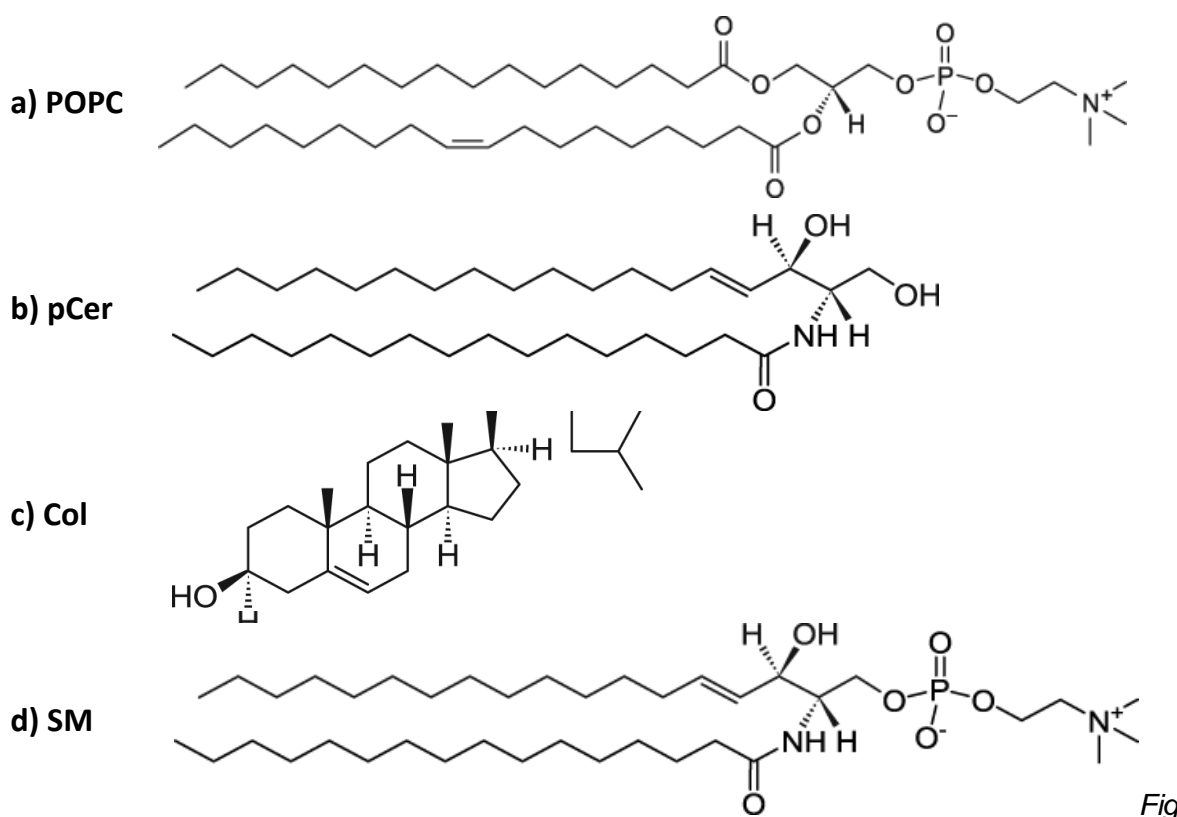


Figura 2. Estructura química de los principales lípidos relevantes a esta Tesis. a) 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina o POPC; b) palmitoilceramida o pCer; c) colesterol o Col y d) esfingomielina o SM.

Durante años se pensó que el papel de los esfingolípidos y por extensión de Cer, en la bicapa lipídica era puramente estructural. Más tarde se descubrió que los esfingolípidos de la superficie celular pueden actuar como moléculas de reconocimiento o señalización celular. Entre las funciones de señalización celular mejor conocidas de las Cer se encuentran la regulación de la diferenciación y proliferación celular y de la apoptosis (Wu et al. 2010; Horres & Hannun 2012; Morad & Cabot 2013; Castro et al. 2014). Por ello su mecanismo de acción es un tema actual de intensa investigación. En una célula la cantidad de Cer en las membranas celulares es extremadamente bajo, sin embargo, puede aumentar rápidamente bajo unas variedades de estímulos como por ejemplo citoquinas, ligandos de los receptores de la muerte celular o fármacos anticancerígenos (van Blitterswijk et al. 2003, Canals D et al. 2013), generando de esta forma diferentes respuestas. Varios estudios sugieren que la base de su mecanismos de acción comprende cambios en la propiedades biofísicas en las membranas como consecuencia de la acumulación de Cer (Carpinteiro et al. 2008; Zhang et al. 2009; Bollinger et al. 2005; Becker et al. 2008). Este fenómeno en la actualidad se atribuye casi exclusivamente a la formación de dominios condensados de Cer (van Blitterswijk et al. 2003) generados enzimáticamente por la acción hidrolítica de la enzima Esfingomielinasa (Fanani et al. 2010). Además, se ha informado que la formación enzimática de Cer en sistemas modelo de membranas induce la reestructuración de la bicapa y conduce a la agregación y fusión de vesículas (Holopainen et al. 2000; Montes et al. 2002; Veiga et al. 1999). Este efecto regulador de la estructura tridimensional de las membranas podría tener importantes consecuencias en muchos eventos celulares, como ha sido sugerido para la reacción acrosomal de espermatozoides (Peñalva et al. 2014).

El colesterol (Col), Figura 2, es un esteroles abundante en las membranas de células animales que se destaca por su capacidad de aumentar la dinámica molecular de la fase gel (G) y de disminuir la de la fase líquida cristalina de fosfolípidos (Ld). Cuando se encuentra en concentraciones entre 25-50 mol %

(Stottrup & Keller 2006; Fanani & Maggio 2011) forma una fase lipídica conocida como fase líquido ordenada (Lo). En esta fase las moléculas se comportan como un fluido en dos dimensiones, es decir las moléculas difunden y se reorientan sobre la orientación normal a la bicapa pero al mismo tiempo las cadenas de acilo están estructuradas orientacionalmente como en la fase G de fosfolípidos puros (Mouritsen & Bloom 1995). Éste efecto está relacionado con que Col tiene una estructura de anillo rígido y una cara (cara- α) ultra suave, sin grupos químicos que perturben su plano. Esta característica permite que las moléculas de lípidos en sus proximidades puedan girar rápidamente y proporcionar alta fluidez a la membrana (Martinez-Seara et al. 2010).

Se ha encontrado Col y otros esteroides estructuralmente equivalentes en prácticamente todas las células eucariotas; sin embargo sólo unas pocas células procariotas pueden sintetizar esteroides. Konrad Bloch sugirió en 1965 que la evolución de los esteroides estaba íntimamente relacionada con los requisitos físicos impuestas a las membranas plasmáticas de las células eucarióticas, presumiblemente debido a su mayor tamaño y complejidad. Por ello propone la aparición de Col como consecuencia de cierta presión selectiva relacionado a la aparición del O₂ atmosférico de la tierra (Mouritsen & Bloom 1995).

Una propiedad importante de la fase Lo es el enorme aumento de la resistencia mecánica con respecto a la fase Ld de fosfolípidos, que debe ser al menos en parte debido a la creciente importancia de la interacción de van der Waals para las cadenas ordenadas en la molécula lipídica en presencia de Col. Este aumento de la resistencia se establece mientras se mantiene la fluidez de la membrana eliminando la transición de fase G – Ld de fosfolípidos. Esto último, en combinación con el aumento de espesor de la bicapa, reduce la permeabilidad de la membrana enormemente (Mouritsen & Bloom 1995).

1.4 Membranas modelo con coexistencia de fases: mezclas ternarias

La manipulación controlada de la composición lipídica de las membranas modelo permite el estudio tanto de las propiedades biofísicas de continuo como de su microestructura. Entre los sistemas artificiales utilizados, los liposomas, de diferentes tamaño y composición química constituyen el modelo de membrana más cercano a la estructura de la membrana celular (Mesa et al. 2010; Córscico et al. 2013). Los liposomas unilamelares grandes (LUVs) permiten estudiar fenómenos de permeabilización de membranas y restructuración tridimensional: agregación y fusión. En el caso de los liposomas gigantes (GUVs), su gran tamaño les confiere el atractivo adicional de ser similares en dimensiones a las membranas plasmáticas de células y visualizables por microscopía confocal (Córscico et al. 2013). Esto permite la exploración visual de coexistencia de fases y presencia de dominios lipídicos segregados lateralmente en bicapas.

Las PCs, como fue mencionado anteriormente, son lípidos abundantes en las membranas celulares y son la familia de los lípidos más estudiada (Heimburg 2007). Entre ellos un lípido generalmente utilizado en los sistemas de membrana que imitan monocapas y bicapas lipídicas es POPC (1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilicolina) que a temperatura ambiente aparece en fase Ld en bicapas y en fase líquida expandida en monocapas. Se propone que estas fases líquidas son el estado de fase más frecuente en las membranas celulares (Mesa et al. 2010). El agregado de otros componentes mayoritarios de membrana plasmática como el Col provoca la formación de fases en estado Lo en especial si está acompañado de cierta proporción de SM (ver Figura 2). Membranas lipídicas ternarias de composición PC/Col/SM han sido extensivamente estudiadas en sistemas modelo debido a la particularidad de mostrar coexistencia de dominios de fases líquidas (Marsh 2009; Fanani & Maggio 2011).

En la primera parte de esta Tesis analizamos la estructura adquirida de dispersiones lipídicas de composiciones binarias y ternarias de POPC, Col y Cer,

las cuales han sido estudiadas anteriormente por el grupo de Prieto (Castro et al. 2009). En el mencionado trabajo exploraron liposomas con un amplio rango de composiciones por fluorimetría y microscopía confocal de GUVs, con el propósito de identificar coexistencia de fases. Dichos resultados están resumidos en el diagrama de fases mostrado en la Figura 3.

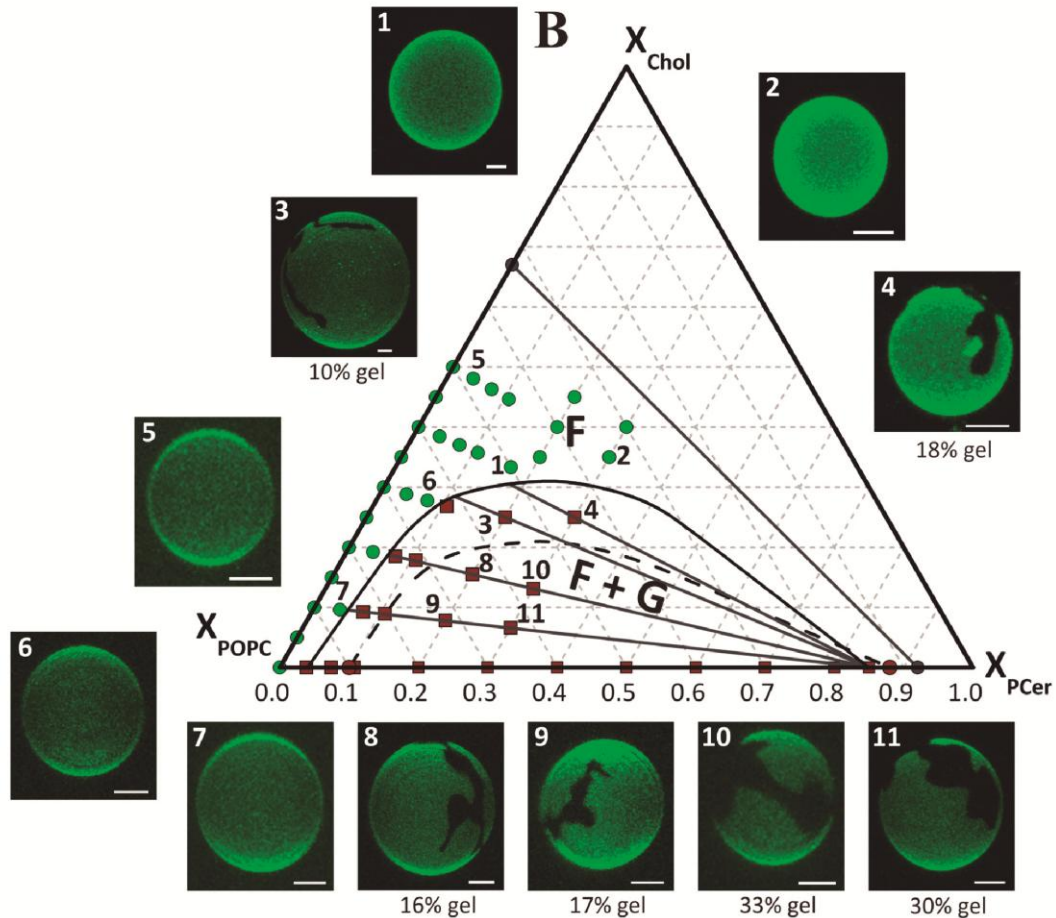


Figura 3. Diagrama de fases ternario de liposomas compuestos por POPC / Col / pCer. Los círculos verdes representan las composiciones de las membranas que mostraron sólo una fase de tipo fluida (F), mientras los cuadrados rojos presentaron coexistencia de fases F y gel (G). La línea continua de color gris muestra el límite de solubilidad de Col más Cer en bicapas. Las imágenes muestran secciones de microscopía de fluorescencia confocal de GUVs (la barra de escala es de 5 μm). Extraído de Ref. (Castro et al. 2009).

Se puede observar que el diagrama está dividido en tres zonas, una donde el sistema lipídico muestra una fase fluida homogénea (F) compuesta por las membranas con bajo contenido de Cer; otra amplia zona de coexistencia de fase F con G, correspondiente a las membranas con un bajo contenido de Col y un intermedio de Cer (F+G) y una tercer zona con bajo contenido de POPC que resulta inexplorable por los métodos utilizados ya que no forman bicapas lipídicas (Ali et al. 2006).

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que la formación enzimática de Cer en membranas con alto contenido en Col resulta en la formación de dominios Lo enriquecidos en Col y Cer y no en dominios condensados de Cer (Ale et al. 2012). La alta solubilidad de Cer en dominios de Col (Castro et al. 2009) plantea la incógnita de cómo estos dos lípidos, altamente hidrofóbicos y con una cabeza polar pequeña, pueden coexistir establemente en una bicapa plana. Por lo tanto, resulta de interés la exploración de la reactividad estructural de biomembranas conteniendo dominios lipídicos enriquecidos en Col y Cer. Este estudio contribuye a profundizar el entendimiento de los cambios estructurales a los cuales son sometidas las membranas celulares donde Cer es producida y que estarían involucrados en las funciones de Cer como mediador lipídico de señalización celular.

1.5 Anfifilos solubles con interés farmacológico

Si tenemos en cuenta que en el entorno biológico la densidad de macromoléculas y estructuras autoorganizadas es tal que esencialmente nada de agua se encuentra en condiciones de agua libre, no es de extrañar que la interacción de moléculas de moderada solubilidad en soluciones acuosas con las superficies hidrofóbicas que ofrecen las membranas biológicas sea determinante de

una extensa cantidad de procesos importantes para la función celular y el reconocimiento e incorporación de moléculas circulantes en tejidos celulares (Mesa et al. 2010). Estos procesos muchas veces se establecen en situaciones fuera del equilibrio y son disparadores de efectos que se amplifican a escalas mayores influenciando la existencia y regulación de eventos de bioreconocimiento, catalíticos y de transducción de información en procesos celulares (Fanani et al. 2010).

Muchos fármacos tienen destinos intracelulares, y por lo tanto deben pasar a través de una o más bicapas de lípidos para alcanzar los objetivos intracelulares y producir una respuesta a su acción farmacológica; por lo tanto, las interacciones lípido-fármaco son inevitables. Los estudios en cultivo celular e *in vivo* han demostrado que las interacciones de los lípidos con los fármacos juegan un papel importante en las propiedades farmacocinéticas de los mismos, tales como transporte, distribución y acumulación y su eficacia (Peetla et al. 2009).

La incorporación de fármacos anfitrópicos a membranas biológicas es la primera condición para la selección y/o uso racional de nuevos compuestos con características deseadas para una determinada función farmacológica. A diferencia de los fármacos que interactúan específicamente con receptores proteicos, los compuestos que los hacen con las membranas biológicas pocas veces presentan interacciones específicas de alta afinidad, en cambio presentan una sumatoria de interacciones débiles y factores entrópicos que conllevan a su función. Por lo tanto, la comprensión del papel de estas interacciones sobre las propiedades farmacocinéticas de los medicamentos es fundamental en el desarrollo de fármacos potentes.

Las bases fisicoquímicas que rigen el fenómeno de inserción de moléculas anfitrópicas de moderada solubilidad en agua, incluido los fármacos anfifílicos no están claramente dilucidadas en la actualidad. En los últimos años se ha valorizado la utilización de sistemas modelo de membranas lipídicas para evaluar y caracterizar la interacción fármacos-membranas (Peetla et al. 2009). Los liposomas son ampliamente utilizados como sistemas de membrana modelo para estimar la

eficacia de los fármacos. En general, la eficacia del fármaco se mide determinando su coeficiente de reparto, que es la medida de la cantidad de fármaco que entra a través de una membrana de lípidos en el sistema biológico (Danelian et al. 2000). Los liposomas son mejores sistemas para medir los coeficientes de reparto que el tradicional método basado en dos fases isotrópicas tales como una mezcla de octanol-agua, debido a que los liposomas imitan la parte hidrofóbica y la superficie polar exterior de los lípidos de las membranas naturales.

En esta Tesis estudiamos un aspecto diferente y poco explorado de la interacción fármaco-membrana focalizándonos en los efectos que la incorporación de fármacos anfifílicos produce sobre las propiedades estructurales y mecánicas de las membranas dianas. De esta forma pretendemos profundizar en el entendimiento de los mecanismos de acción de los fármacos en estudio y por extensión de las formas de manipulación y controlar sus efectos a través de cambios en su estructura química.

1.6 Los alquil ésteres del ácido L-ascórbico

El ácido L-ascórbico (vitamina C) ha sido ampliamente estudiado en particular por su fuerte capacidad antioxidante, solubilidad en agua y su actividad protectora contra la degradación oxidativa de moléculas biológicas. Sin embargo, debido a su pobre solubilidad en medios hidrófobos, su utilidad está limitada a ambientes acuosos. Una estrategia para superar esta limitación ha sido la generación de derivados anfifílicos como ésteres alquílicos - 6 - O - del ácido ascórbico (ASCn, Figura 4), que son conocidos por mantener el carácter antioxidante del ácido ascórbico y particionar en medios no polares (Capuzzi et al. 1996; Palma et al. 2007). Otra ventaja del carácter anfipático de los ASCn es su capacidad de formar agregados en soluciones acuosas o de integrarse en vesículas lipídicas que ofrecen un entorno adecuado para el almacenamiento y transporte de sustancias hidrófobas susceptibles a la oxidación (Palma et al. 2002; Benedini et al. 2014). De

hecho, algunos ASCn tales como el laurato de ascorbilo (ASC12), miristato de ascorbilo (ASC14) y palmitato de ascorbilo, (ASC16) se auto-organizan como coageles a una relación ASCn / agua relativamente alta (Palma et al. 2007).

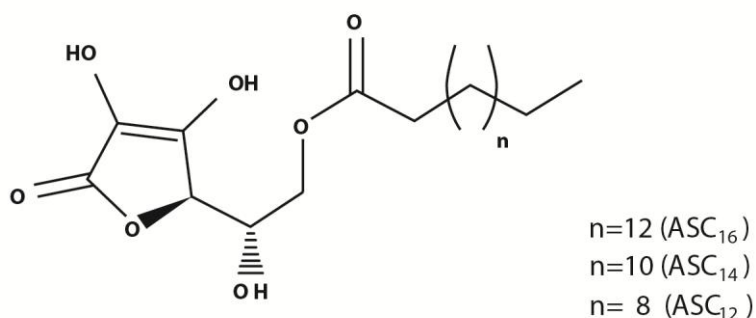


Figura 4. Esquema de la estructura química de los ésteres alquílicos del ácido L-ascórbico (ASCn) relevantes para esta Tesis.

Todas estas características hacen de los ASCn una herramienta prometedora como vehículos de fármacos para formulaciones farmacéuticas. Por ejemplo, ASC12, que entre los fármacos estudiados en este trabajo contiene la cadena alquílica más corta, mejora la permeación oftalmológica de otros fármacos hidrófobos (Tártara et al. 2012). Por otro lado, el coagel formado por ASC16 actúa como un buen adyuvante en la inmunización en modelos animales (Sánchez Vallecillo et al. 2014), debido a alguna actividad inflamatoria de tipo citotóxica. Además, se ha informado recientemente de que algunos miembros de esta familia de fármacos demuestran acción bactericida y contra la leishmania (Kharrat et al. 2014). Todas estas aplicaciones implican indirectamente la interacción de los ASCn con las membranas biológicas, que constituye la primera barrera celular. A partir de los datos bibliográficos mencionados podemos concluir que la longitud de la cadena alquílica de los compuestos ASCn regula sutilmente la eficacia en aplicaciones farmacológicas.

A pesar del uso generalizado de ASCn como fármacos, todavía es notable la falta de información sobre las bases fisicoquímicas de su interacción con las

membranas lipídicas. Recientemente en nuestro laboratorio se ha estudiado el comportamiento superficial de los ASCn con cadenas alquílicas de diferentes longitudes, los cuales mostraron una alta actividad superficial siendo capaces de formar monocapas de Gibbs y de Langmuir (Mottola et al. 2015). Diferencias químicas sutiles en los compuestos que contienen cadenas alquílicas de C16, C14 y C12, muestran grandes implicancia en la organización en el plano de las películas formadas por los ASCn en interfaces agua/aire, así como en su capacidad para ser integrados en monocapas de lípidos altamente empaquetadas (Mottola et al. 2013; Mottola et al. 2015; Zulueta Diaz et al. 2016). Se demostró además que estos compuestos inducen cambios diferentes de las propiedades fisicoquímicas de la membrana lipídica, tanto en la extensión de la incorporación de los fármacos como en la cinética del proceso de penetración (Zulueta Diaz et al. 2016).

Por otra parte, existen estudios previos sobre la interacción de ASCn con bicapas de fosfolípidos. Un ejemplo es el trabajo de Casal et al. en el que se muestra que la adición de ASC16 estabiliza la fase G de PC (Köhler et al. 1988). Los objetivos del presente trabajo de Tesis son profundizar la comprensión de las consecuencias de la incorporación de ASCn en bicapas lipídicas mediante la exposición de suspensiones de liposomas a los compuestos ASC14 y ASC12, sintetizados en nuestro laboratorio (Mottola et al. 2015) y comparar sus efectos con los observados para el compuesto comercial ASC16.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Síntesis del laurato y miristato de ascorbilo

Los derivados anfífilos del ácido ascórbico, ASC12 y ASC14, fueron sintetizados en nuestro laboratorio por la Lic. Milagro Mottola (Mottola et al. 2015). Se sintetizaron a través de un procedimiento modificado respecto al descrito en la literatura (Capuzzi et al. 1996). El mismo involucra una reacción entre el ácido láurico o ácido mirístico y el grupo OH primario en la posición 6 del ácido L-ascórbico en una solución de ácido sulfúrico concentrada. Se colocó en un balón de dos bocas 100 mL de ácido sulfúrico al 97,8% junto con tamices moleculares (Merck, perlas 0,4 nm - 2 mm, Reag. PhEur) para favorecer la formación de ASCn por desplazamiento de agua del medio de reacción. Con el fin de quitar el oxígeno presente en el medio, el sistema se sometió a una corriente suave de nitrógeno durante 40 min bajo agitación magnética constante a temperatura ambiente. Luego, se añadieron 25 mmol de (+) L - ascorbato de sodio (4,95 g) hasta alcanzar su completa disolución, seguido por 25 mmoles del ácido carboxílico correspondiente (5,31 g de ácido láurico para la síntesis del ASC12 y 6,26 g de miristato de sodio para la síntesis del ASC14). El balón se mantuvo a una temperatura de 45 °C bajo flujo de nitrógeno constante hasta que se completó la reacción. Luego de 18 h, la mezcla se trasvasó lentamente a un vaso de precipitado que contenía hielo y agua Milli-Q y se mantuvo una agitación constante hasta que el sistema alcanzó temperatura ambiente, formándose un precipitado blanco.

Posteriormente, se trasvasó la solución a una ampolla de separación y se trató varias veces con éter dietílico para poder extraer el compuesto de interés, añadiéndose además una solución saturada de NaCl para romper la emulsión. La fase orgánica fue separada y se trató con sulfato sódico anhidro, se filtró y se evaporó en vacío. A partir de la muestra sólida obtenida se procedió a la

purificación de los derivados de ASC_n, para ello se tomó una cantidad de aproximadamente 0,6 g del sólido, se disolvió en n-hexano y se mezcló con sílica gel 60 (aproximadamente 1,6 g). Esta mezcla se secó en un evaporador rotatorio y se colocó en embudo Büchner de disco de vidrio integral de una porosidad Grado 3 (Pyrex), y se enjuagó repetidas veces con n-hexano (Volumen final = 400 ml) y luego con una mezcla de n - hexano: acetato de etilo 99: 1 (Volumen final = 400 ml) hasta que por cromatografía en capa fina (CCF) no se detectó presencia del ácido carboxílico correspondiente según la síntesis realizada (la CCF mostró la presencia de un solo punto). Se extrajo el producto final ASC_n purificado del gel de sílice mediante su dilución en éter dietílico. La muestra se secó nuevamente utilizando un evaporador rotatorio y el compuesto obtenido se almacenó en un frasco bajo flujo de nitrógeno. El ASC16 comercial se purificó posteriormente para eliminar los residuos de ácido palmítico utilizando el proceso de purificación descrito anteriormente para ASC12 y ASC14.

Se utilizaron técnicas de espectroscopia infrarroja FT-IR y de resonancia magnética nuclear de ¹H, ¹³C y HSQC–DEPT para realizar la caracterización estructural de los compuestos sintetizados y así corroborar la obtención de ASC12, ASC14 y ASC16 purificados (Mottola et al. 2015).

2.2 Preparación de vesículas modelo

Los liposomas nanométricos se formaron secando una cantidad de lípidos (puros o mezclas) a partir de soluciones clorofórmicas y depositándola en las paredes de un tubo por evaporación del disolvente bajo una corriente de N₂ (Basu & Basu 2002). Los residuos de solvente orgánico se eliminaron con incubación (1h) en una cámara de alto vacío. Se formaron vesículas multilamelares (MLVs) por hidratación de la película de lípidos anteriormente generada con una solución tampón de pH 7.5 que contiene HEPES 10 mM, NaCl 269 mM y EDTA 1 mM. Se

agitó la suspensión lipídica vigorosamente y después se sometió a cinco ciclos de frío y calor (-195 °C y 40 °C respectivamente).

A partir de las suspensiones de MLVs se prepararon LUVs con un diámetro promedio de 100 nm por extrusión (20 veces) a través de filtros de policarbonato con poros de 100 nm de tamaño a temperatura mayor a la de transición ($G - L_d$) de los componentes lipídicos puros. Para las mediciones de fluorescencia, se añadieron alícuotas apropiadas de la sonda fluorescente 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno (Laurdan) o del 1,6-difenil-1,3,5 hexatrieno (DPH), disueltos en sulfóxido de dimetilo, (0,5% en moles) a la suspensión clorofórmica de lípidos previo a la formación de LUVs.

Las GUVs fueron generadas por electroformación (Ambroggio et al. 2010) en una solución de sacarosa. Las GUVs fueron posteriormente diluidas en una solución reguladora isosmótica, la cual contiene HEPES- NaCl EDTA 1mM, a pH 7,2. Brevemente, 10 μ L de una solución de stock POPC (0,5 mg / mL en cloroformo: metanol 2: 1, v / v) marcada con 0,5 mol % de la sonda fluorescente Rhodamina-fosfatidiletanolamina (Rho- PE) se extendieron sobre dos placas de vidrio que están recubiertas con óxido de indio y estaño (ITO). Éste es uno de los óxidos conductores más usados para la electroformación de GUVs debido a su alta conductividad eléctrica, transparencia óptica y su alta facilidad para su deposición como una capa delgada.

Los electrodos con los lípidos depositados se dejaron en alto vacío a fin de eliminar cualquier traza restante de disolvente orgánico. Luego, los lípidos fueron hidratados con una solución de sacarosa (269 mM) y los electrodos se conectaron a un generador de corriente alterna (UNI-T UTG9002C, Uni-Trend Group Limited, Hong Kong). Se aplicó durante 5 horas un campo alterno de baja frecuencia (función sinusoidal de 10 Hz y una tensión eficaz de 1 V) (Ambroggio et al. 2005). La diferente composición de los medios internos y externos de la GUVs, sacarosa y solución salina respectivamente, posibilita la visualización de las mismas por microscopía de contraste de fases debido a la diferencia del índice de refracción de

la sacarosa con respecto a la solución salina. A su vez, la incorporación de la sonda liposoluble Rho-PE en la bicapa permitió su observación por microscopía confocal de fluorescencia.

2.3 Análisis de la distribución de tamaño de vesículas unilamelares grandes por dispersión dinámica de la luz

Analizamos el tamaño de las vesículas obtenidas por el método de Dispersión dinámica de la luz (DLS por su nombre en inglés: Dynamic Light Scattering). Esta técnica permite averiguar el tamaño promedio y la distribución poblacional de las vesículas (Basu & Basu 2002) a través del cálculo del radio hidrodinámico de las partículas utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta D_H} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde D es el coeficiente de difusión, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, η es la viscosidad del fluido y D_H es el diámetro hidrodinámico de la partícula.

La técnica consiste en irradiar la suspensión con un láser de $\lambda = 500$ nm. La luz dispersada es recolectada por un detector y analizada por un correlador. Dicha luz presenta fluctuaciones en la intensidad debida al movimiento Browniano de las vesículas en suspensión (Figura 5). Las fluctuaciones generadas en la intensidad de la luz dispersada son traducidas por una función de correlación a medidas de D , que es inversamente proporcional al D_H .

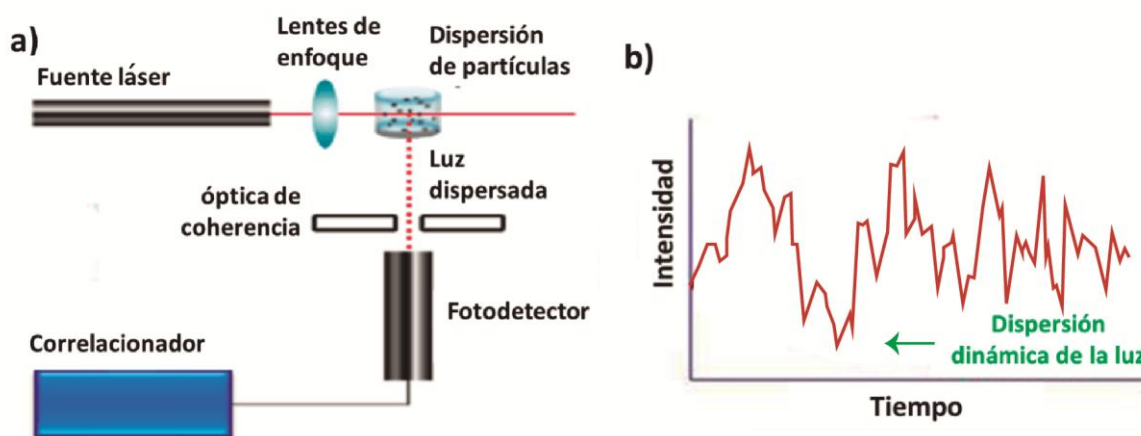


Figura 5. Ejemplo de dispersión dinámica de la luz (DLS). a) Esquema de las partes de un equipo de DLS y b) ejemplo de un registro de intensidad de luz dispersada por una muestra.

Los resultados de distribución poblacional de liposomas mostrados en la Tabla 1 (sección 3.1.2) fueron calculados a través del análisis de los distintos picos de distribución de tamaño con funciones de tipo gaussiana, hecha con el programa Fit Multi-Peaks del programa OriginPro 8.

2.4 Análisis estructural de agregados lipídicos mediante dispersión de rayos X a bajo ángulo

Exploramos las estructuras adquiridas por las suspensiones lipídicas por la técnica de SAXS (Small Angle X-ray Scattering). Esta técnica es ampliamente usada en el estudio de materiales con inhomogeneidades estructurales o electrónicas (Oliveira et al. 2010). En particular permite determinar parámetros estructurales a un nivel nanométrico (Figura 6). El principio físico se basa en la dispersión de Thompson (elástica) de fotones, los cuales son dispersados por los electrones del material de manera elástica (es decir conservando la energía del

fotón). Cuando un fotón impacta proveniente de un rayo X a alta energía, este última se transforma en una fuente coherente de emisión de ondas secundarias dirigidas hacia todas las direcciones (Córsico et al. 2013). En un material este proceso tiene lugar sobre una gran cantidad de electrones presentes en átomos que se encuentran en distintas posiciones, por lo que las ondas secundarias generadas pueden sufrir interferencias de tipo constructivas y destructivas al llegar al plano del detector generando así lo que se conoce como patrón de dispersión. Como en cualquier proceso de interferencia existe una relación inversa entre el tamaño de las partículas y el ángulo de dispersión (es decir, partículas grandes producen mayor dispersión a bajo ángulo y viceversa). Cualquier material ya sea un sólido, una suspensión líquida o gaseosa que presentan inhomogeneidades en la densidad electrónica presentarán un patrón de dispersión característico de rayos X a bajo ángulo. En particular para que suspensiones coloidales produzcan un patrón de dispersión deberán tener densidades electrónicas distintas en el caso del coloide y del solvente respectivamente. La medición consiste en hacer interaccionar un haz de rayos X monocromático con la muestra, que producirá una dispersión del haz incidente, la cual es registrada por un detector.

El patrón de dispersión se construye como la intensidad de la radiación dispersada en función del ángulo de detección. Dato que el proceso de dispersión elástica está caracterizado por el intercambio de impulso entre el fotón incidente y la distribución electrónica del material, es común expresar la dependencia angular como:

$$q = \left(4 \frac{\pi}{\lambda}\right) \sin \Theta \quad (\text{Ec.3})$$

donde q es el vector de dispersión, λ es la longitud de onda del haz utilizado y 2Θ el ángulo de dispersión. Por lo tanto, un patrón de dispersión, se construye como $I(q)$ vs q .

Esto nos permite además de obtener el espaciamiento (d) entre las membranas aplicando la Ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin \Theta \quad (\text{Ec.4})$$

donde, n es un número entero (ver Figura 6). La distribución de la intensidad difractada en función de q describe picos cuya frecuencia de aparición nos permite discriminar si las estructuras son de tipo lamelar, hexagonal de tipo I/ II o de tipo cubica bicontinua (Heimburg 2007). Además, esto permite estudiar la simetría y organización entre planos de bicapas y estimar la fracción correlacionada de bicapas que forman multicapas es decir la fracción que se encuentra “apilada” con respecto a las que se encuentra descorrelacionadas y “separadas” por una gran cantidad de fase acuosa (bicapas aisladas).

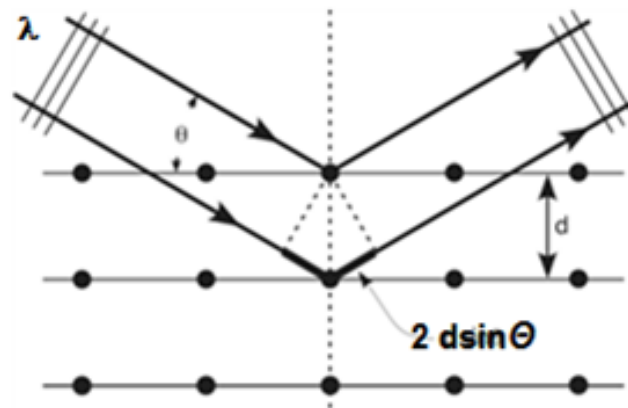
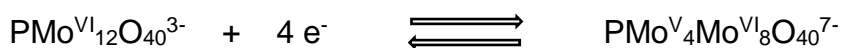
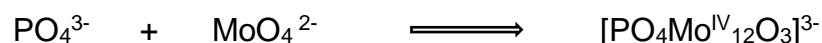


Figura 6. Esquema del fenómeno de interferencia por diferencia de camino óptico. La reflexión a pequeños ángulos Θ corresponde a planos a distancias del orden de nanómetros. Si $2 d \sin \Theta$ es múltiplo de λ , aparecerá un pico de difracción debido a interferencia constructiva.

2.5 Determinación de actividad detergente de fármacos anfílicos

Para evaluar un posible efecto detergente de los ASCn cuantificamos el fósforo inorgánico libre en la fracción soluble en equilibrio con la suspensión de MLVs compuestos por fosfolípidos por el método de Bartlett modificado (Bartlett 1958). Brevemente, una solución etanólica de los ASCn se añadió a la suspensión de MLVs (1.3 mM total de fosfolípidos), hasta alcanzar una relación molar fármaco: lípido de 1:2. La cantidad de etanol agregado no superó el 2% v/v. cabe destacar que dicho porcentaje en volumen no afecta la solubilidad ni la estructura de las vesículas en estudio.

Se procedió a separar la fracción acuosa de la fracción que contiene membranas por centrifugación a 16000 r.p.m. durante 1 h y a 4 °C. Cada fracción se sometió a una mineralización en presencia de ácido perclórico al 70%, 1h, 180°C y luego se le midió la concentración de fósforo inorgánico con una reacción colorimétrica (Bartlett 1958), según el siguiente esquema:



El fósforo inorgánico reacciona con el ácido molíbdico formando un complejo fosfomolíbdico. La subsiguiente reducción del complejo en medio alcalino origina un compuesto de color azul (azul de molibdeno) cuya intensidad es proporcional a la cantidad de fósforo presente en la muestra. La absorbancia de cada muestra se midió con un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu, Biospec-mini) a $\lambda = 830 \text{ nm}$. El límite de detección del ensayo de fosforo fue 50 μM , que representa el 3.8 mol% del total de fosfolípido usado.

2.6 Estudios de la polaridad de la superficie de vesículas unilamelares grandes mediante el análisis de la polarización generalizada del Laurdan

El 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno o Laurdan (ver Figura 7.a) es un fluoróforo anfifílico que se particiona espontáneamente cerca de las cabezas polares de los lípidos autorganizados en bicapas. Su fotofísica se ve fuertemente influenciada por la polaridad del ambiente en el que se encuentra ubicado, lo que permite hacer una relación directa de su perfil de emisión con el grado de empaquetamiento de los lípidos. En solventes de alta polaridad, el máximo de emisión del Laurdan presenta un considerable desplazamiento batocrómico, explicado fundamentalmente por la reorientación de los dipolos de las moléculas de solvente alrededor de la sonda durante el tiempo de vida de su estado excitado lo cual depende de la movilidad de las moléculas de agua en su entorno, la bicapa lipídica en este caso.

Para cuantificar los cambios espectrales descriptos, se ha definido el parámetro de Polarización Generalizada, GP, que se define de forma análoga a la función de polarización de la fluorescencia con la siguiente ecuación:

$$GP = \frac{(I_{434} - I_{490})}{(I_{434} + I_{490})} \quad (\text{Ec.5})$$

Donde I_{434} y I_{490} corresponden a las intensidades en las regiones azul y verde del espectro de emisión respectivamente, utilizando una longitud de onda de excitación fija de 360 nm. La GP está relacionada con el empaquetamiento lateral de las bicapas lipídicas permitiendo diferenciar los estados de fase de las membranas lipídicas (Parasassi et al. 1990). El grado de relajación dipolar del agua observada en la fase de G es muy baja en comparación con la observada en la fase Ld por lo tanto valores altos de GP (0.4-0.6) corresponden a una fase G, mientras que valores bajos (por debajo de 0.2) corresponden a las fases más fluidas. Como

consecuencia la emisión de la sonda es predominantemente de color azul en la fase de G y verde en la fase Ld.

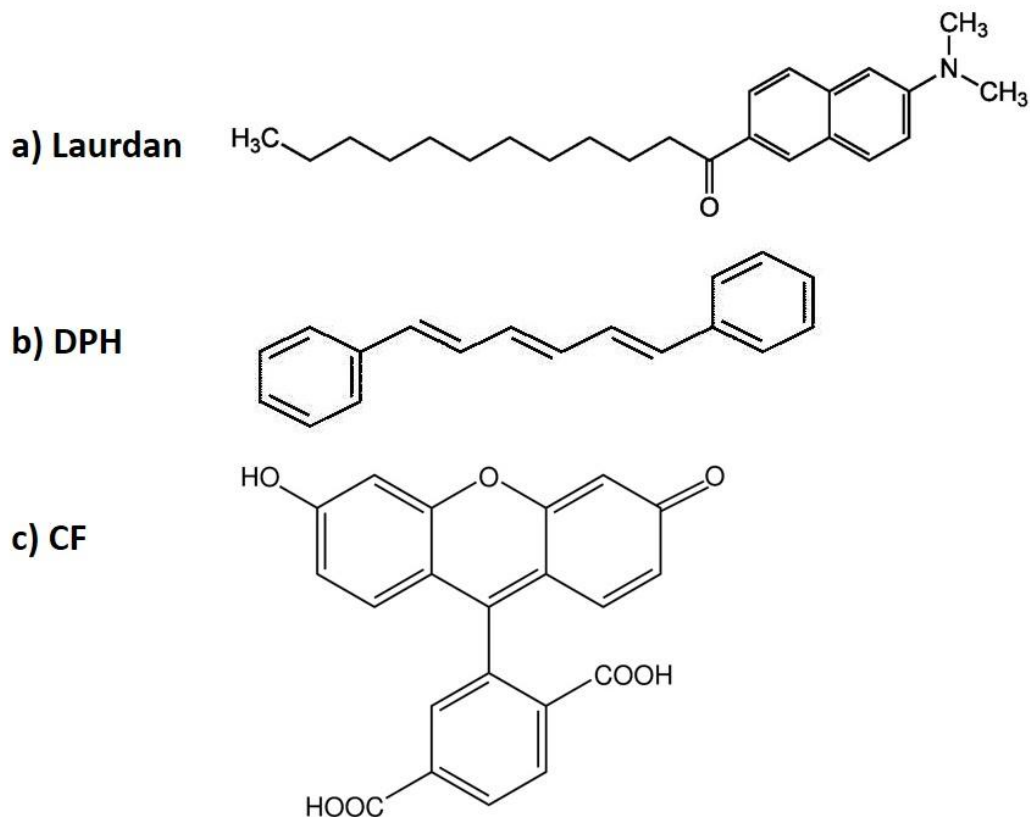


Figura 7. Estructura química de las sondas fluorescentes utilizadas en este trabajo de Tesis: a) 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno o Laurdan, b) 1,6-difenil- 1,3,5 hexatrieno o DPH y c) 6-carboxifluoresceína o CF.

En la presente tesis se midió la GP del Laurdan de liposomas a los que se les añadió 0.5 mol% de Laurdan antes y después de la incubación con ASCn. En todos estos experimentos, el fármaco se añadió a partir de una solución etanólica concentrada hasta alcanzar la relación molar deseada de fármaco: lípido.

2.7 Análisis de la microviscosidad de las membranas de vesículas unilamelares grandes mediante anisotropía de 1,6-difenil-1,3,5, hexatrieno

Para evaluar posibles cambios en la microviscosidad del interior hidrófobo de la membranas de liposomas se analizó la anisotropía de fluorescencia de la sonda 1,6-difenil- 1,3,5 hexatrieno (DPH, Figura 7b). El DPH por sus características fisicoquímicas particiona en el interior de la bicapa lipídica intercalándose entre las colas hidrófobas de los lípidos. Cuando se ilumina con luz polarizada, adsorbe un fotón que es emitido con una longitud de onda mayor pero similar plano de polarización. La luz emitida puede sufrir procesos de depolarización relacionados a la difusión rotacional de la molécula de DPH, es decir durante la vida media del estado excitado. Éste fenómeno depende de la viscosidad del medio y del tamaño de la especie fluorescente (Lakowicz & J.R. 2006).

La anisotropía de fluorescencia del DPH se midió excitando con luz linealmente polarizada de longitud de onda 365 nm y se detectó la intensidad de la luz emitida a 428 nm después de pasar a través de un polarizador de retención vertical (v) u horizontal (h) a la dirección del vector eléctrico de polarización de la luz de excitación. El valor de anisotropía r se calculó según la siguiente ecuación (Lakowicz & J.R. 2006):

$$r = \frac{\left(\frac{I_v}{I_h}\right)_v - \left(\frac{I_v}{I_h}\right)_h}{\left(\frac{I_v}{I_h}\right)_v + 2\left(\frac{I_v}{I_h}\right)_h} \quad (\text{Ec. 6})$$

Se midió la anisotropía de fluorescencia de DPH de vesículas lipídicas conteniendo 0.5 mol% de DPH antes y después de enfrentarlas a los ASCn a distintas proporciones fármaco: lípidos (1:2; 1:1; 2:1). En todos los casos los fármacos se añadieron a partir de una solución etanólica concentrada hasta alcanzar la relación molar deseada fármaco: lípido.

2.8 Ensayos de liberación de contenido vesicular

Con el objetivo de investigar la integridad de la membrana vesicular con respecto al flujo de pequeñas moléculas se realizaron ensayos de liberación de contenido del fluoróforo 6-carboxifluoresceína (CF, ver Figura 7c). Se prepararon LUVs de 100 nm de diámetro según lo descrito en el punto 2.1, hidratándolos y filtrándolos en un buffer con CF 50 mM (Tris 10 mM, pH 7.5). A la concentración utilizada este fluoróforo está en un estado auto-apagado. Para eliminar la CF no atrapada intravesicularmente se filtraron las muestras por cromatografía de exclusión por tamaño con Sephadex G-25. El tamaño de los liposomas recuperados fue corroborado por DLS. Los liposomas obtenidos se sometieron a la presencia de un anfifilo desestabilizante (ASCn; Tritón X-100).

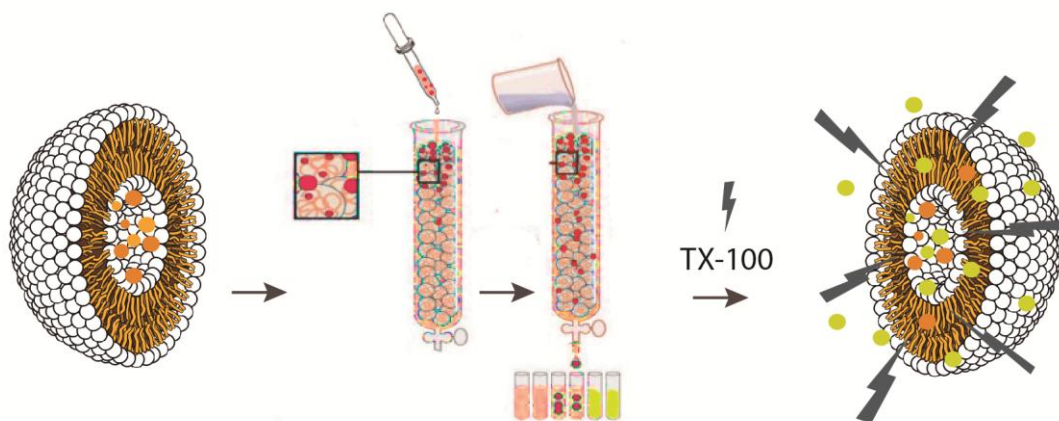


Figura 8. Esquema ilustrativo del método de análisis de liberación de contenido vesicular.

La liberación de CF de los LUVs fue detectada a través de medidas de intensidad de fluorescencia de CF (λ_{ex} 490 nm, λ_{em} 513 nm). La CF autoapagada contenida en las vesículas mostró una fluorescencia mínima (I_0). Luego de la adición de una alícuota de ASCn en solución etanólica para llegar a una relación molar de fármaco/lípido 1:1 la fluorescencia aumentó en función del tiempo (I_t),

analizado típicamente a los 45 min luego del enfrentamiento a los fármacos. El porcentaje de fluorescente liberado en el tiempo se calculó con la siguiente ecuación descrita por (Maggio & Yu 1989):

$$R\% = 100 \left[\frac{(I_t - I_0)}{(I_\infty - I_0)} \right] \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde I_∞ es la intensidad de fluorescencia después de la liberación máxima de CF inducida por Tritón X-100 (concentración final 10 mM). Todas las mediciones de fluorescencia se adquirieron con un espectro fluorómetro Cary Eclipse (Agilent Technologies) equipado con un soporte de multi-cubeta controlada térmicamente (21 °C), con una ranura de longitud de onda de 5nm y un camino óptico de 2 mm.

2.9 Microscopia confocal de vesículas unilamelares gigantes

Una pequeña alícuota de la suspensión de GUVs (20 μ L) formadas como se detalló en el apartado 2.1 se transfirió a una celda de observación de 8 pocillos, conteniendo una solución reguladora (HEPES-NaCl; 1 mM de EDTA; pH 7,2) isosmótica a la solución de sacarosa intravesicular (ver detalles técnicos en Figura 9). El cristal de la celda de observación se trató con una solución de caseína 10 mg / mL, para impedir la ruptura de las GUVs sobre el cristal. Los liposomas gigantes fueron observados con un microscopio confocal de fluorescencia (Olympus FV 300, Tokio, Japón). Para la identificación de los diferentes dominios y la asignación del estado de fase de los mismos se utilizó Rho-PE como marcador fluorescente, ya que se excluye de fases condensadas (Mangiarotti et al. 2014). Para controlar el efecto en el tiempo de interacción de los ASCn sobre las membranas de las GUVs, adquirimos imágenes, con un intervalo de tiempo de 15 s por un máximo de tiempo de 45 minutos o hasta la total pérdida de fluorescencia.

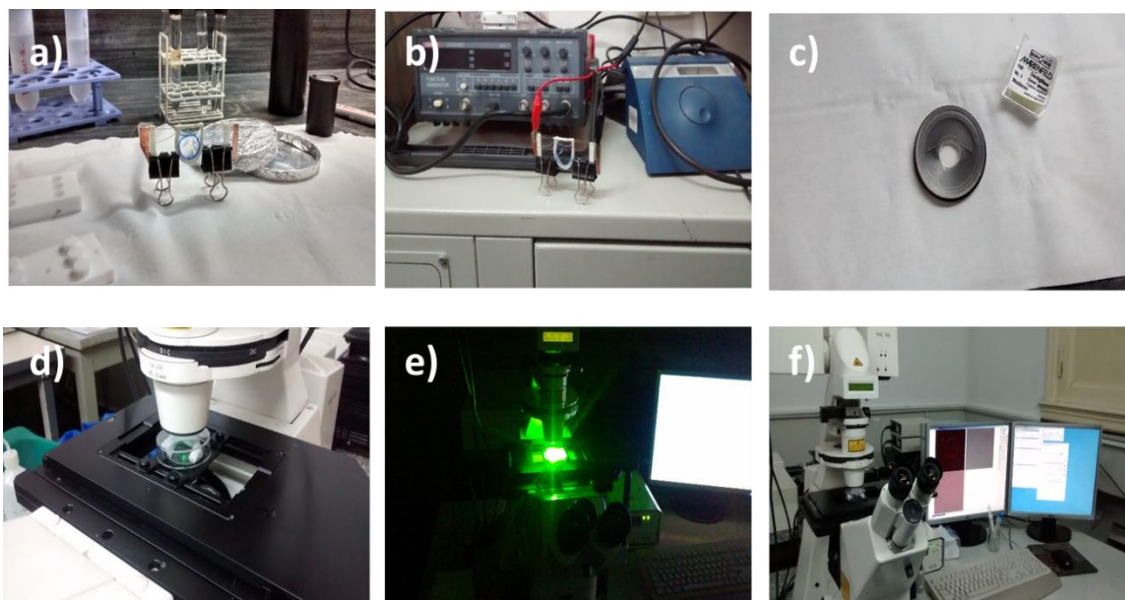


Figura 9. Detalles técnicos de la electroformación de GUVs y su visualización por microscopía confocal. La electroformación se lleva a cabo en el espacio circunscrito por dos vidrios conductores recubiertos con óxido de indio y estaño (ITO) y masilla especial (a), el que es sometido a corriente alterna con función sinusoidal inducido por un generador de ondas (b). El preparado es trasladado a una cuba circular con base de vidrio calidad óptica (c) y visualizado por microscopía confocal (d-f).

Dado que las soluciones reguladora y de sacarosa utilizadas tienen diferentes índices de refracción, la liberación de contenido vesicular fue supervisada por microscopía de interferencia diferencial de contraste (DIC). Los cambios en la intensidad de fluorescencia en la membranas de las GUVs se cuantificó con el software ImageJ 1.43u (NIH, EE.UU.).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Reactividad estructural de membranas lipídicas conteniendo dominios enriquecidos en colesterol y ceramida

3.1.1 Racionalización de las membranas complejas a analizar: distribución en el diagrama de fases de 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina, colesterol y ceramida.

Para evaluar las características estructurales de vesículas de composición compleja analizamos LUVs de composiciones lipídicas binarias y ternarias conteniendo POPC, Col y Cer (Figura 10), elegidas a partir de los datos reportados en (Castro et al. 2009, ver también Figura 3). De esta forma se eligieron vesículas con alto (80 mol%) o bajo (64 mol%) contenido de POPC, las cuales presentaran tanto una sola fase fluida (F) o coexistencia de fase F + G.

La fase G esta reportada como enriquecida en Cer, mientras que POPC y Col se encuentra enriquecidos en las fases F. Cabe destacar que la fase F podría tener características de fases Lo o Ld según su contenido en Col (ver secciones 1.3 y 1.4). Otros datos bibliográficos discriminan las fases fluidas e informan coexistencia de fases Lo + Ld para mezclas binarias de POPC / Col con contenidos de Col entre 10 y 43 mol%, a 23 °C (de Almeida et al. 2003).

| NOMBRE | COMPOSICIÓN |
|-------------|--------------------------|
| A (control) | POPC 100% |
| B | POPC 80% Col 20% |
| C | POPC 80% Col 15% Cer 5% |
| D | POPC 80% Col 10% Cer 10% |
| E | POPC 80% Col 5% Cer 15% |
| F | POPC 80% Cer 20% |
| G | POPC 64% Col 36% |
| H | POPC 64% Col 27% Cer 9% |
| I | POPC 64% Col 18% Cer 18% |
| L | POPC 64% Col 9% Cer 27% |
| M | POPC 64% Cer 36% |

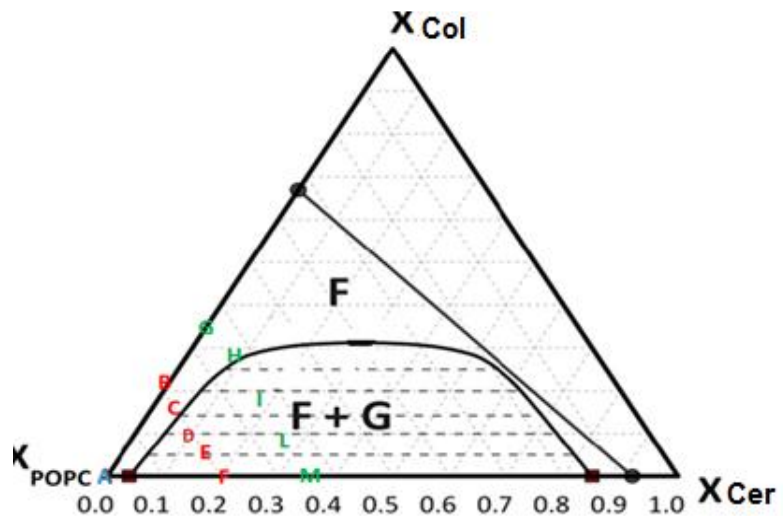


Figura 10. Composición lipídica de las vesículas estudiadas. La tabla muestra la composición de las vesículas control de POPC (azul), con 80 mol% (rojo) o 64 mol% (verde) de contenido de POPC y el diagrama triangular representa dichas composiciones en el diagrama de fases reportado en Ref. (Castro et al. 2009). F y G denotan fase fluida y gel.

3.1.2 Análisis del tamaño y distribución poblacional de liposomas ternarios por dispersión dinámica de la luz

A pesar de que todas las muestras han sido procesadas de igual manera por extrusión por filtros de policarbonato de poro promedio uniforme de 100 nm, las muestras no resultaron en poblaciones homogéneas de dicho diámetro en todos los casos. El análisis por DLS de suspensiones lipídicas de distinta composición muestra excepciones a la distribución monodispersa esperada.

Las suspensiones lipídicas que contienen sólo fases F mostraron mayoritariamente una población homogénea con máximo alrededor de 100 nm, como es esperado según el método de preparación. La muestra binaria B, conteniendo 20 mol% de Col y que presenta coexistencia de fases Ld + Lo muestra

además una importante población con diámetro mayor a 300 nm (Figura 11 y Tabla 2).

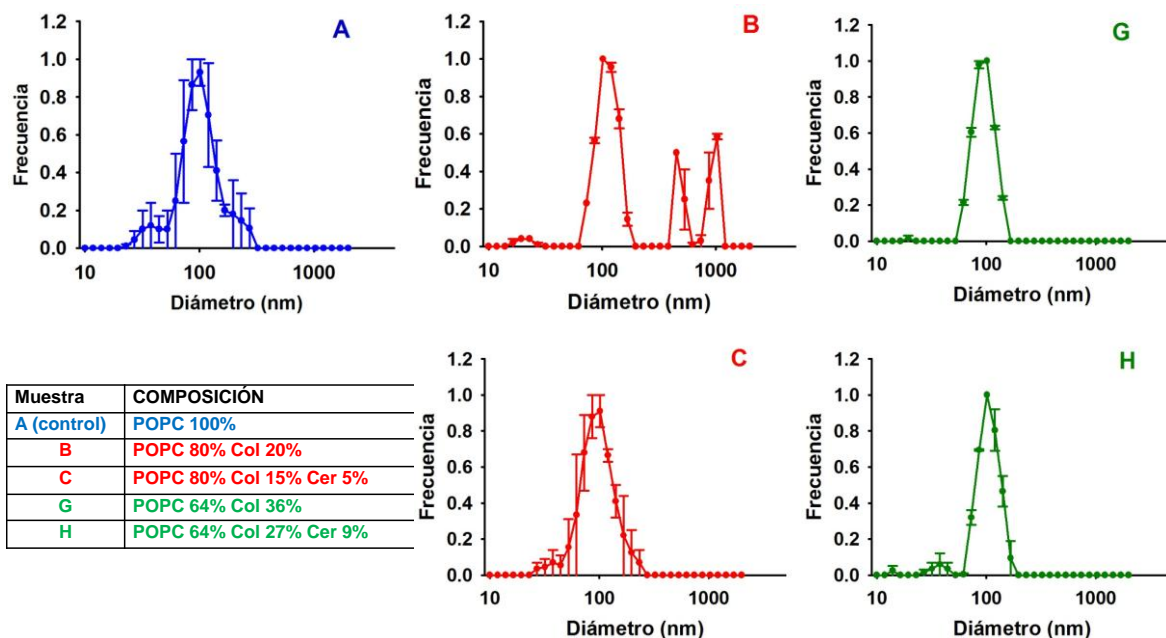


Figura 11. Análisis de la distribución de tamaño por DLS de suspensiones lipídica extruidas por un filtro de 100nm presentan sólo fases fluidas (Lo o Ld) según datos bibliográficos (Castro et al. 2009; de Almeida et al. 2003). La tabla muestra la composición de las vesículas control de POPC (azul), con 80 mol% (rojo) o 64mol% (verde) contenido de POPC. Los resultados del análisis de DLS son promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden al error estándar de la media (SEM), que se calcula según $SEM = DS/\sqrt{n}$, donde DS es la desviación estándar y n es el total de los experimentos promediado, tres experimentos independientes en este caso.

En los sistemas con presencia de una fase G se identificó una población homogénea para vesículas con 80 mol% de POPC. Sin embargo cuando la cantidad de PC es sólo de 64 mol% hay una mayor tendencia a la aparición de una población importante de partículas lipídicas grandes como se muestra en la Figura 12 y Tabla 2. La muestra binaria (M) que contiene una alta cantidad de Cer y no contiene Col muestra un perfil bimodal con alta frecuencia de estructuras más

grandes, como lo observado también para las muestras (I) y vesículas chicas con una media menor a los 100 nm esperados por el tamaño del filtro usado (ver Tabla 2).

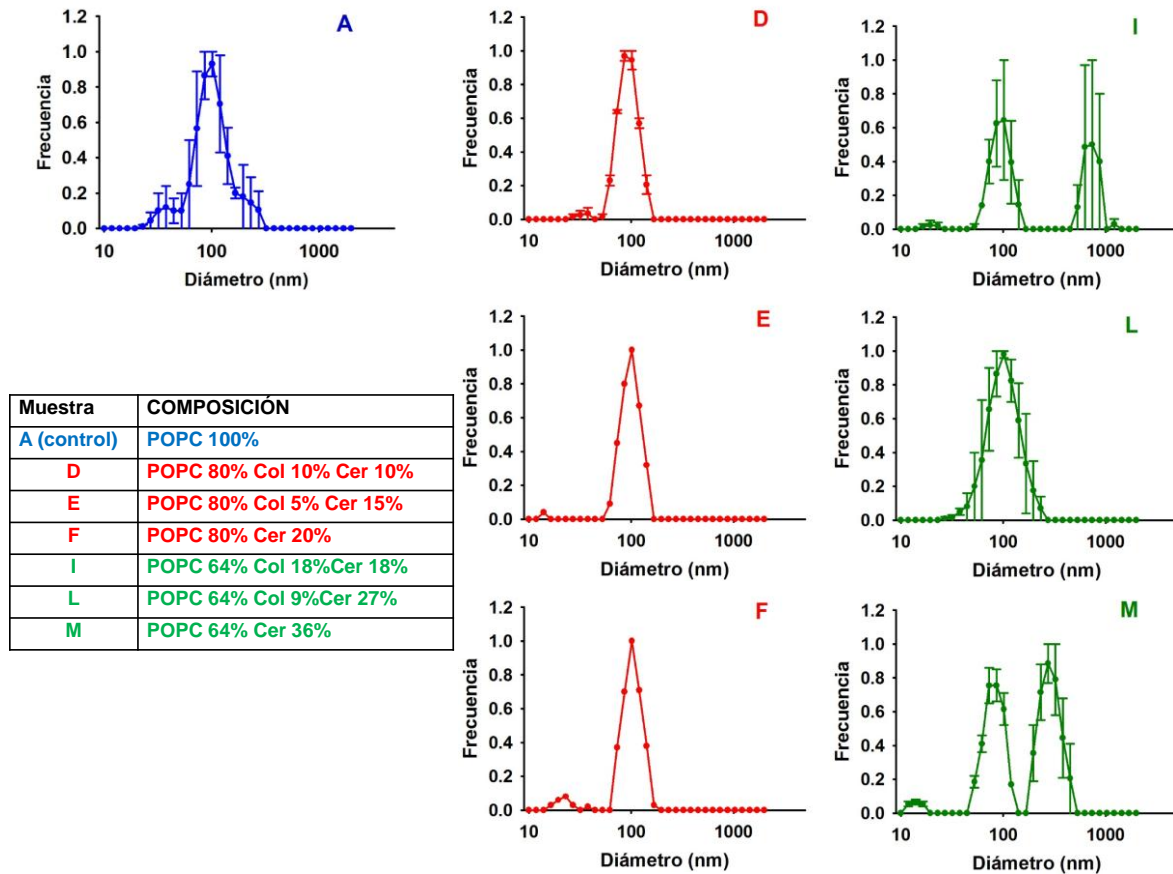


Figura 12. Análisis de la distribución de tamaño por DLS de suspensiones lipídica extruidas por un filtro de 100 nm que presentan coexistencia de fases fluidas (Lo o Ld) con fase G rica en Cer, según datos bibliográficos (Castro et al. 2009; de Almeida et al. 2003). La tabla muestra la composición de las vesículas control de POPC (azul), con 80 mol% (rojo) o 64 mol% (verde) de POPC. Las barras corresponden al error estándar de la media (SEM) (ver fig 11)

Esta heterogeneidad en las poblaciones con bajo contenido de PC nos indujo a pensar que los lípidos pueden no están equitativamente distribuidos en las

vesículas pudiendo haber entonces variaciones de composición entre las distintas poblaciones. Dichas variaciones pueden resultar en membranas altamente cargadas en Col y/o Cer, ambos lípidos reportados como inductores de fases curvas, no bicapa (Chen & Rand 1997; Gallay & De Kruijff 1982). Éstas estructuras se proponen como intermediarios del proceso de fusión de membranas y por lo tanto serían responsables de la agregación de vesículas observada en distintos sistemas lipídicos (Veiga et al. 1999).

Tabla 2: Resumen de los datos obtenidos de la distribución de tamaño de suspensiones de LUVs binarios y ternarios comparados con el control de POPC puro.

| MUESTRA | 80-120nm | >120 | Estado de fase **** |
|---|------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| A) POPC 100% | 103*±1nm**; 100%*** | | Ld |
| B) POPC: Col 80 : 20 | 115 ±1nm;23% | (49±4)x10nm;2% (98±2)x10 nm;52% | Ld |
| C) POPC: Col: Cer 80:15: 5 | 101±1nm;100% | | Ld |
| D) POPC: Col: Cer 80:10:10 | 96±1nm;100% | | Ld + Gel |
| E) POPC: Col: Cer 80:5:15 | 102±1nm;100% | | Ld + Gel |
| F) POPC: Cer 80: 20 | 106±1nm;100% | | Ld + Gel |
| G) POPC: Col 64:36 | 98±1nm;100% | | Lo |
| H) POPC: Col: Cer 64: 27: 9 | 109±1nm;100% | | Lo |
| I) POPC: Col: Cer 64: 18: 18 | 97±1nm;16% | (74±1)x10nm; 84% | Lo + Gel |
| L) POPC: Col: Cer 64: 9: 27 | 108±1nm;100% | | Lo + Gel |
| M) POPC: Cer 64: 36 | 85±1nm;19% | (30±0.4)x10nm; 81% | Lo + Gel |

^a Centro del área del pico de una gaussiana que representa la frecuencia de vesículas con un determinado diámetro.

^b Error estándar de la media para cada curva gaussiana.

^c Porcentaje de área de la gaussiana dado por cada población con un determinado diámetro con respecto al total del área bajo la curva. Las poblaciones que representaron menos del 5% del total del área bajo las curvas de distribución fueron desestimadas.

^d Estado de fase extraído de Ref. (Castro et al. 2009). Las mezclas binarias POPC + Col presentan coexistencia de fase Ld + Lo en el rango de contenido de Col de 10 a 43 mol% (de Almeida et al. 2003). Las fases fluidas con contenido de Chol > 15 mol% Col fueron consideradas en fase Lo mientras que por debajo de dicha cota es considerada fase Ld.

Estos resultados demuestran que los denominados operacionalmente LUVs debido a su forma de preparación no obedecen como una generalidad las características esperadas para estas vesículas. Cuando el contenido de POPC es bajo, la presencia de lípidos con forma molecular de conos invertidos ($P_c > 1$) y que se ubican con menor estrés en superficies curvas tales como Col y Cer favorecen procesos de restructuración de las bicapas planas. Este efecto puede estar incrementado por la presencia de dominios lipídicos de diferente fases (Lo/G; Ld/G o Lo/Ld, ver Tabla 2), lo que resulta en interfaces laterales que representan puntos de discontinuidad de las membranas y favorece interacciones estructurales entre vesículas. Esto resulta en partículas grandes probablemente como consecuencia de formación de agregados vesiculares. En dichos agregados es probable que una sección importante de los lípidos se encuentren formando estructuras no-bicapa de alta curvatura tales como núcleos de fases HIII y/o Q (ver sección 1.2).

3.1.3 Análisis estructural de agregados ternarios por dispersión de rayos X a bajo ángulo

Los resultados anteriores muestran que algunas dispersiones lipídicas que contiene Col y/o Cer se estructuran parcialmente en partículas grandes que pueden ser consecuencia de agregación de liposomas o corresponder a una fase lipídica no-bicapa. En colaboración con el Dr. Rafael Oliveira, Investigador del CIQUIBIC, se analizaron una selección de muestras por difracción de rayos X de ángulo bajo o SAXS en el Laboratorio LNLS - Brazilian Synchrotron Light Laboratory-CNPEM. Se estudiaron las muestras de composición E, que contiene Col /Cer (1:3), y la muestra I con una relación (1:1) de Col/Cer y menor cantidad de POPC (ver figura 10) junto con el control de POPC puro. Las muestras presentan coexistencia de fases Ld/G (E) y Lo/G (I) según bibliografía, pero sólo en la muestra (I) ocurre la aparición de partículas grandes (Tabla 2).

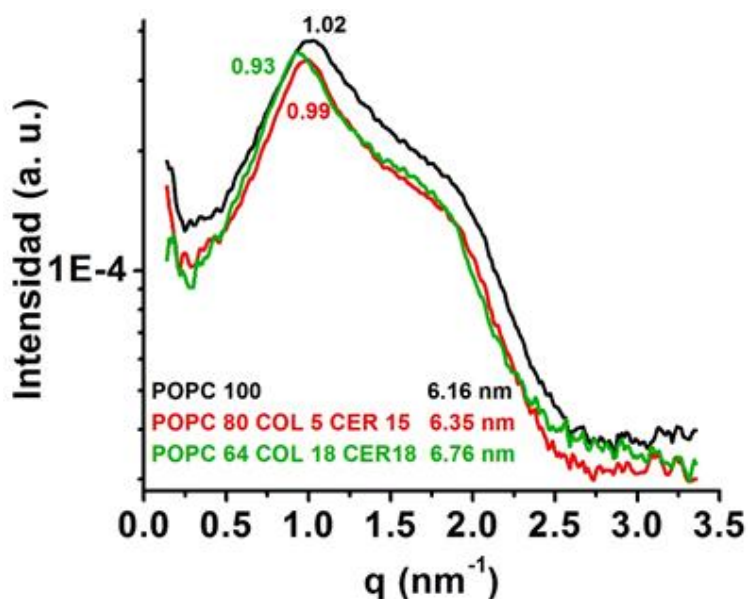


Figura 13. Dispersión de rayos X de ángulo bajo (SAXS) de suspensiones lipídicas. Valores de la intensidad de luz dispersada versus el vector de dispersión (q) calculado según Ec.3. Las curvas muestran los resultados para las muestras A control (azul), E (rojo) e I (verde), según la nomenclatura seguida en la Figuras 10 a 12 y Tabla 2. la resolución en q está es de $0,005 \text{ nm}^{-1}$.

El análisis de la intensidad vs. vector de dispersión (q) muestra para los tres casos dos picos a $\sim 1 \text{ nm}^{-1}$ y a $\sim 2 \text{ nm}^{-1}$ (Figura 13). La regularidad tipo 1, 2, 3, etc...

de los picos es característica de una estructura repetitiva del tipo de lamelas apiladas y descarta una contribución importante de una estructura no-bicapa tipo HII o Q (dichas estructuras muestran picos con regularidad $1, \sqrt{3}, 2$ etc.. o $1, \sqrt{2}, \sqrt{3}$, etc..., respectivamente, (Seddon & Templer 1995). Además, esta técnica permite modelar la curva que debiera obtenerse con liposomas que no interaccionan entre sí (llamado factor de forma) con respecto a los liposomas formando estructuras con regularidad estructural (lamelas apiladas) para obtener un parámetro llamado grado de correlación). Los resultados de la Figura 13 arrojan un grado de correlación del 50%, es decir la mitad de las estructuras de las muestras corresponden a bicapas interaccionando con regularidad estructural, lo cual se correlaciona con aposición y agregación parcial de vesículas.

La posición de los picos, arroja información sobre la distancia (d) característica de las estructuras repetitivas de la muestra lipídica. El espaciamiento entre capas dio un valor de 6.16 nm para el control de POPC y espesores progresivamente mayores para las muestras a medida que contienen menor cantidad de POPC (6.36 y 6.76 nm para las muestras (E) e (I), respectivamente. Esto indica que a medida que las muestras se enriquecen en Col y Cer el apilamiento en su conjunto aumenta su espesor, presumiblemente al formarse fases más condensadas donde los lípidos se encuentran en una conformación más extendida en el eje normal a la interface. Este comportamiento ha sido descrito para otras muestras de fosfolípidos en distintas fases lamelares (Marsh 1990).

3.1.4 Ensayos de estabilidad estructural de vesículas unilamelares grandes sometidos a la acción de un detergente no iónico

Nos interesó evaluar la estabilidad de estas estructuras vesiculares con respecto a algún perturbante de membrana. El agente elegido fue el detergente no iónico Tritón X-100 (TX-100). Éste detergente perturba la permeabilidad de las

bicapas lipídicas a concentraciones sublíricas (Ahyayauch et al. 2010), menores a la concentración necesaria para solubilizar los componentes de membrana (~1mM).

La estabilidad estructural de la bicapa lipídica fue evaluada a través de ensayos de liberación de contenido vesicular acuoso utilizando vesículas que encierran al fluoróforo CF en condiciones de autoapagamiento. De todas las muestras con composiciones lipídicas exploradas al momento se seleccionaron aquellas que exhibieron una distribución de tamaño homogénea, muestras D,F,G,H,L, (Tabla 2) para poder discriminar eventos de agregación vesicular de los de aumento de la permeabilidad de la membrana.

Al agregar concentraciones crecientes de TX-100 aumentó la intensidad de fluorescencia de CF. Tomando en cuenta la intensidad de fluorescencia inicial de la muestra (sin TX-100) y la obtenida luego de un exceso de detergente, condición de máxima permeabilidad, calculamos el porcentaje de fluoróforo liberado en el medio extra vesicular R% aplicando la Ec. 7. R% tiene una dependencia sigmoidea con la concentración del detergente (Figura 14b), obteniendo el 50% de liberación (R_{50}) para vesículas de POPC a una concentración de TX-100 de 0.5×10^{-4} M (Figura 14c). Los resultados muestran que todas las vesículas que contienen Col se ven estabilizadas con respecto al control de POPC puro, y sólo la muestra que contiene Cer pero no Col se ve desestabilizada frente a TX-100.

Estos resultados pueden ser interpretados con mayor facilidad normalizando los valores obtenidos de R_{50} con los obtenidos para el control de POPC ($R_{50\text{ctrl}}$). En la Figura 15 se puede visualizar que la protección ejercida por Col sobre las bicapas lipídicas es proporcional a su contenido y es contrarrestado al incrementar el porcentaje de Cer. Esto se correlaciona con el rol propuesto para Col en las membranas celulares. Como se discutió en la sección 1.3, Col provocaría cambios de las propiedades reológicas de las membranas proporcionando una estructura más compacta y con mayores interacciones intermoleculares, sin disminuir la fluidez de los componentes en el plano de la bicapa (Mouritsen & Bloom 1995). Por otro lado, la presencia de Cer en una membrana sin Col induce la formación de

dominios en estado G que forman interfaces laterales (peridominios) entre esta fase rígida y una fluida, con potencialidad de favorecer los defectos laterales (Castro et al. 2009) y permitir la salida de componentes del compartimiento intravesicular (Veiga et al. 1999).

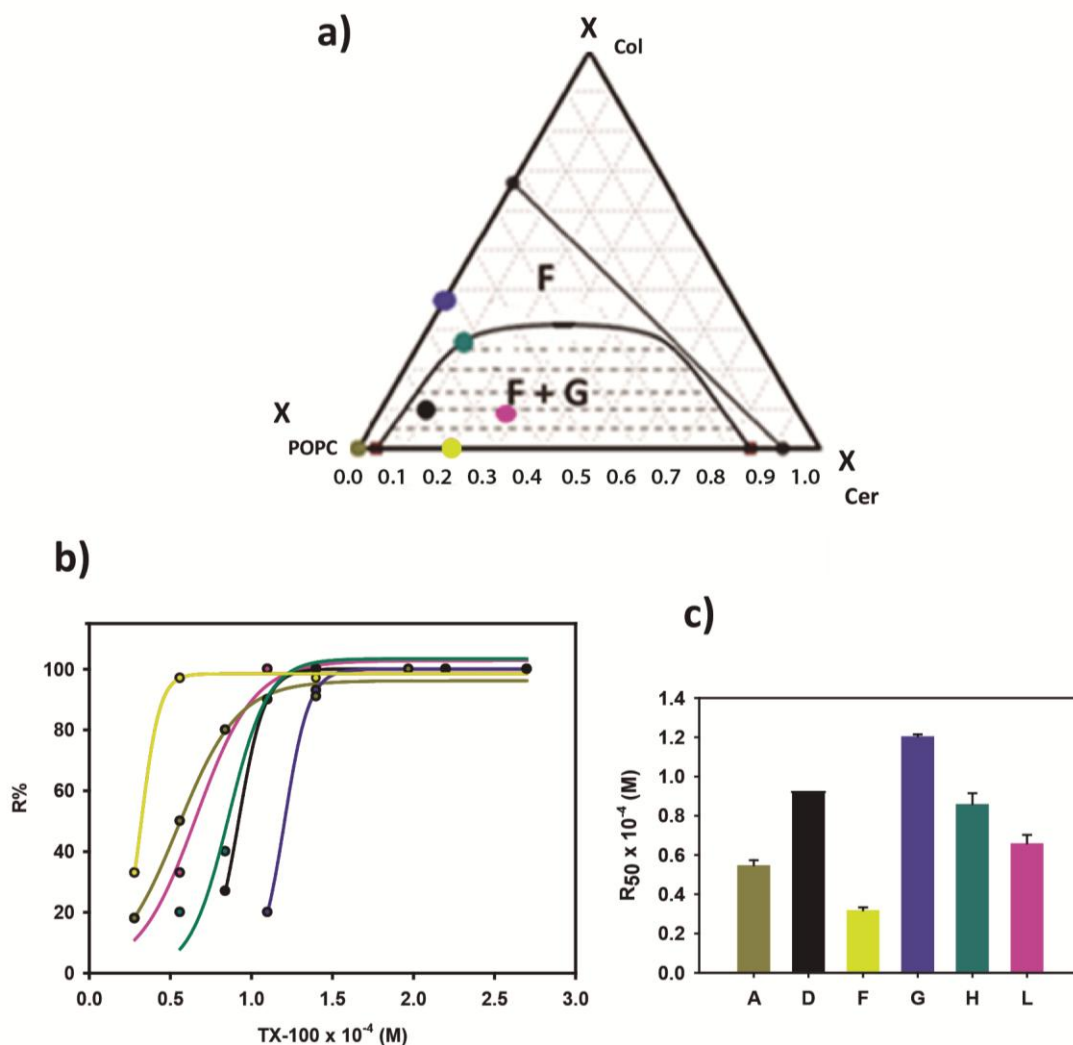


Figura 14. Ensayos de estabilidad estructural de LUVs. a): Diagrama de fase detallando la composición lipídica de las muestras sometidas a ensayos de liberación de CF contenido en liposomas, b) Experimentos de liberación de contenido de liposomas de distinta composición ante el agregado del detergente no iónico TX-100. El R% fue calculado según

la Ec. 7. (c) Análisis de la concentración de TX-100 necesaria para liberar el 50% de CF del interior de las vesículas lipídicas (R_{50}).

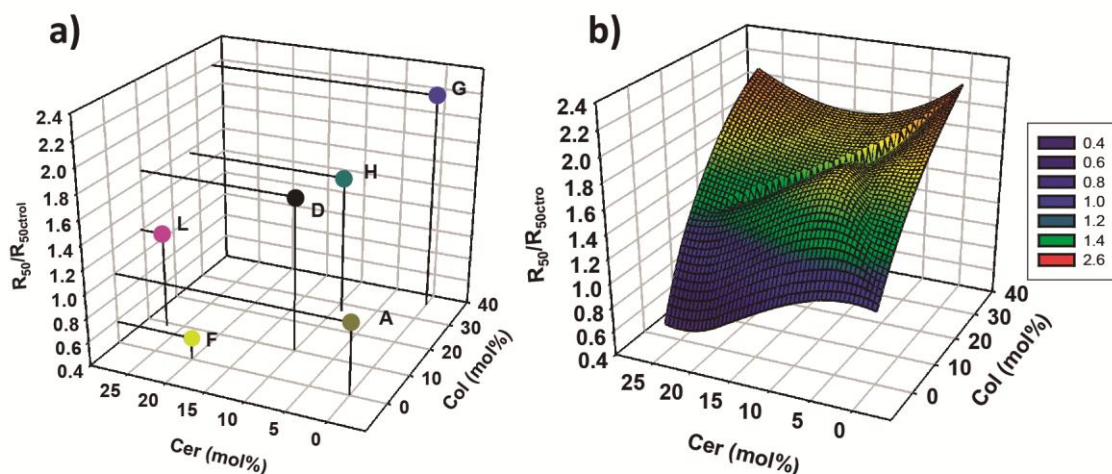


Figura 15. (a) R_{50} normalizados al valor de R_{50} del control de POPC puro ($R_{50}/R_{50control}$) expresada según la composición de Cer y Col y b) según el ajuste de una superficie tridimensional.

3.2 Reorganización de las vesículas de fosfolípidos inducida por los alquil ésteres del ácido L-ascorbico

3.2.1 Los alquil ésteres del ácido L-ascorbico inducen reorganización estructural de liposomas de 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina.

Nos interesó estudiar los efectos que tiene la incubación de los ASCn con las bicapas lipídicas. Como se describió en la sección 1.6 los ASCn que poseen alquiles de entre 12 y 16 átomos de carbonos que permiten a estos compuestos forman en suspensión acuosa estructuras lamelares llamados coagel (Mottola et al. 2013; Palma et al. 2007). Estos anfifilos están entonces en equilibrio entre sus formas agregadas y monoméricas. Debido a que la estructura química de los ASCn imita la conformación de un detergente, nos interesó evaluar si los ASCn en

contacto con las bicapas lipídicas podrían incorporarse a las mismas como monómeros y posteriormente solubilizarlas formando micelas mixtas tipo lípido / detergente.

Con el dicho fin se incubaron MLV de POPC con los tres fármacos, ASC12, ASC14 y ASC16, por distintos tiempos (30, 60, 120 min). Las muestras se centrifugaron y se les midió el contenido de fósforo presente en el sobrenadante y precipitado según el método de Barlett. La Figura 16 muestra los resultados obtenidos. Luego de haber incubado las MLVs con los ASCn no se detectó una cantidad significativa de fósforo en el sobrenadante durante el tiempo evaluado. Estos resultados indican que ASCn no actúan como detergentes, es decir no solubilizan los componentes de las membranas en estudio.

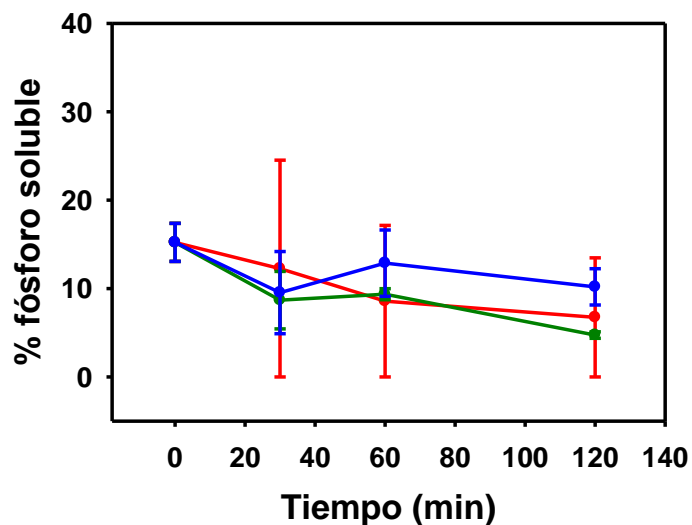


Figura 16. Cuantificación de fósforo presente en el sobrenadante luego de la centrifugación de MLVS de POPC (1,3mM) incubados por distintos tiempos con ASC12 (rojo), ASC14 (verde) y ASC16 (azul) en una relación molar final de 1:2 lípido: fármaco.

Se investigó la capacidad de ASCn de inducir agregación / fusión de vesículas lipídicas midiendo eventuales cambios en la distribución del tamaño de los liposomas luego de la incubación con los fármacos. Llevamos a cabo estos

experimentos utilizando la técnica de DLS en LUVs de POPC a las cuales se les agregó los ASCn y se los dejó interactuar por distintos tiempos (Figura 17).

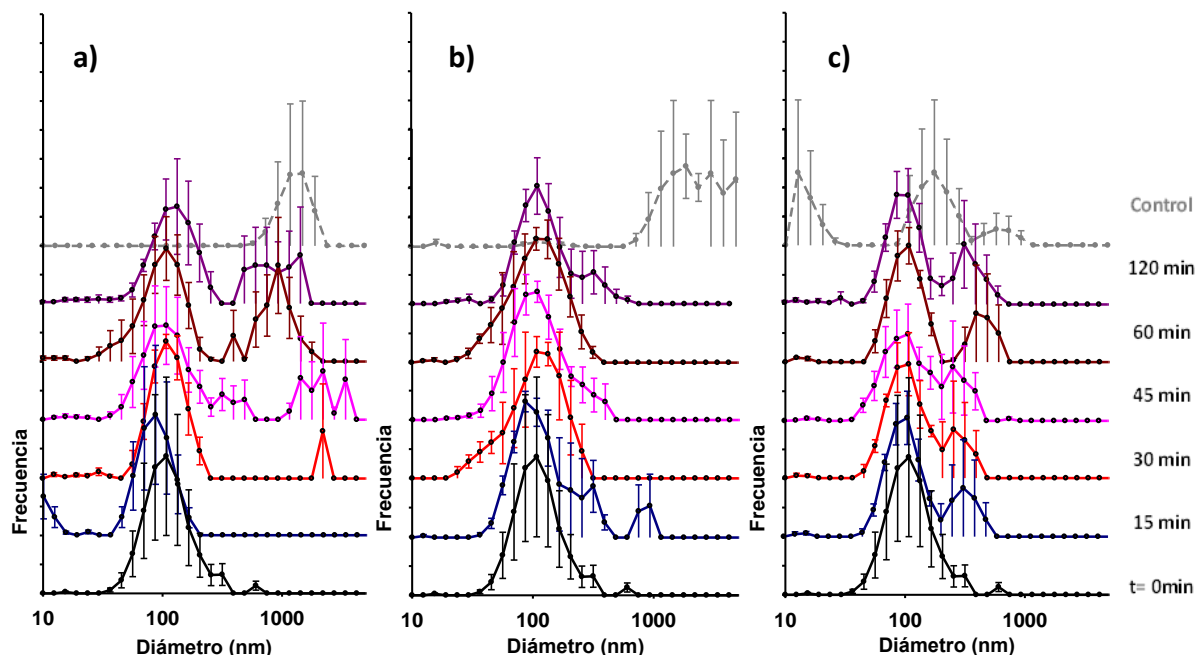


Figura 17. Distribución de tamaño en el tiempo de LUVS de POPC analizada por DLS antes ($t=0$) y después de su interacción con ASC16 (a), ASC14 (b), ASC12 (c) a una relación molar de 1:1 fármaco: lípido. Las líneas de trazos grises representan la distribución del tamaño de la suspensión acuosa de los ASCn correspondientes. Los ejes de frecuencias indican la distribución relativa que varía de 0 a 1 para todos los casos. Las barras de error corresponden al SEM de seis experimentos independientes.

Las LUVs presentaron una distribución de diámetro de tipo Gaussiana, monodisperso con un máximo centrado a 100 nm. La adición de ASCn induce reestructuración de las partículas y detectando cambios en la distribución de tamaños. La concentración del fármaco elegido para este estudio ($100\mu\text{M}$) es mayor a las concentraciones micelares críticas de los ASCn, ASC12 ($33\mu\text{M}$), ASC14 ($9\mu\text{M}$) y ASC16 ($8\mu\text{M}$) (Mottola et al. 2015). Basándonos en datos bibliográficos podemos estimar que la forma monomérica del anfífilo es la responsable de su interacción con la membrana (Mottola et al. 2013), por lo tanto

se requiere una alta concentración de fármaco total para mantener una concentración de monómero constante en equilibrio con la membrana, incluso luego de su depleción debido a su integración en la membrana. En este caso los agregados de ASCn en la subfase actúan como reservorios de fármacos.

El efecto de reestructuración de la membrana depende de la longitud de la cadena de acilo de los ASCn. ASC16 indujo la aparición de estructuras grandes en un intervalo de diámetros de 700 - 4000 nm después de 45 min de incubación (Figura 17a). Se puede observar también que cuando se dispersa ASC16 en un medio acuoso (en ausencia de lípidos) resulta la formación de partículas grandes (Figura 17a control) correspondientes a estructuras de tipo lamelares (Mottola et al. 2013). Estas partículas grandes no se observaron en presencia de las vesículas lipídicas hasta un tiempo de incubación considerablemente prolongado. Esto sugiere que se está llevando a cabo una inserción de los ASC16 y una lenta reestructuración de la vesícula en un sistema binario lípido - ASC16.

Por otro lado ASC14, el cual en solución pura forma estructuras grandes, induce la aparición de un hombro moderado en la campana de la distribución de diámetros (Figura 17b). La adición de ASC12 a la preparación de vesículas resultó en la aparición de una segunda población con una distribución de tamaños en el rango de 400-800 nm, lo que evidencia la presencia de estructuras ASC12 puros y / o LUVs cargadas con ASC12. La suspensión de ASC12 (en ausencia de lípidos) mostró la aparición de una población de tamaño chico y una grande (véase el control en la Figura 17c). La presencia de las micelas en suspensiones puras de ASC12 se reportó en trabajos previos del grupo de (Palma et al. 2002). Estos autores no midieron directamente el tamaño de las suspensiones pero si calcularon el parámetro crítico (P_c) para ASC12, el cual arroja un valor de 0,57.

Como se describió en la sección 1.2 y Tabla 1, según el trabajo de Israelachvili, anfifilos con un $0,33 < P_c < 0,5$ se organizan en micelas cilíndricas, mientras que aquellas con un $0,5 < P_c < 1$ se espera que formen lamelas planas (Israelachvili 1991). El P_c reportado para ASC12 está cerca del límite entre estas dos cotas. Este aspecto geométrico puede explicar nuestra observación

experimental de pequeñas estructuras de 20-40 nm en coexistencia con agregados de más de 100 nm para suspensiones de ASC12 puras. Cabe destacar que la población de partículas de pequeño diámetro (20 - 40 nm) observado en la suspensión acuosa de ASC12 desaparece después de la incubación con LUVs de POPC (Figura 17c), probablemente como consecuencia de una incorporación de ASC12 más favorable o rápido en las vesículas lipídicas desde esas pequeñas estructuras respecto a las más grandes. Estos resultados nos condujeron a evaluar la integridad de la membrana y la formación de poros, quizás de tipo transientes, concomitante a la reestructuración de la membrana inducida por ASCn en las LUV de POPC. Por ello, realizamos ensayos de liberación de CF desde el compartimento intravesicular tras la adición de los ASCn.

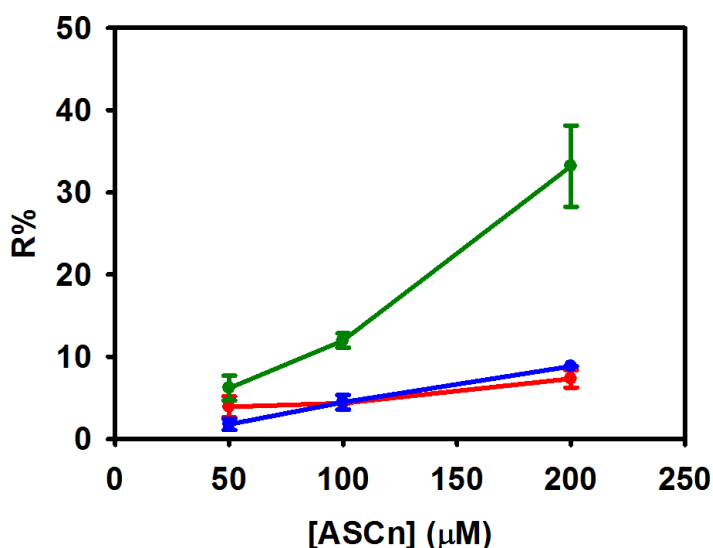


Figura 18. Porcentaje de liberación de la carboxifluoresceína, de LUVs de POPC luego de 45 min de incubación con los ASCn: ASC12 (rojo), ASC14 (verde) o ASC16 (azul). La concentración final de lípidos fue de 100 μM. R%, calculado según Ec.7.

La Figura 18 muestra que sólo ASC14 induce una liberación significativa de contenido, a una relación molar de fármaco: lípido por encima de 1: 1. Este resultado revela que la capacidad de alteración de la membrana o formación de poros no es lineal con la longitud de la cadena alquílica de los ASCn y puede ser la

consecuencia de efectos concertados y complementarios, algunos de los cuales pueden estar relacionados con las diferentes propiedades de los agregados de ASCn. Las micelas y lamelas pueden tener diferente cinética de interacción o capacidad de partición a las membranas lipídicas. Otros factores reguladores de este efecto pueden estar relacionados con cambios en la reología y en la estructura lateral de las membranas cargadas con ASCn, algunos de los cuales fueron estudiados y se discuten a continuación.

3.2.2 Análisis de la polaridad de la superficie de las membranas de vesículas unilamelares grandes de 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina tratadas con los alquil ésteres del ácido L-ascórbico mediante la polarización generalizada del Laurdan.

Con el fin de esclarecer el efecto de los ASCn en las membranas tomamos ventaja de las propiedades fluorescentes del Laurdan, una sonda fluorescente sensible al estado de hidratación de las interfaces lipídicas (Parasassi et al. 1990), y del DPH, el cual permite monitorear los cambios en la rigidez de las membranas, a través de la medición de su anisotropía de fluorescencia (Lakowicz & J.R. 2006).

El Laurdan particiona espontáneamente en la región interfacial donde están ubicadas las cabezas polares de los fosfolípidos y su fluorescencia está fuertemente influenciada por la relajación dipolar de las moléculas de agua en esta región (Parasassi et al. 1990). La función de GP para Laurdan (Ec.5), permite inferir si la presencia de los derivados de ASCn pueden alterar las propiedades interfaciales de las LUVs de POPC. El valor de GP aumenta significativamente cuando las LUVs interaccionan a ASCn (Figura 19), incluso en la relación molar más baja ensayada (1:2 de fármaco: lípido).

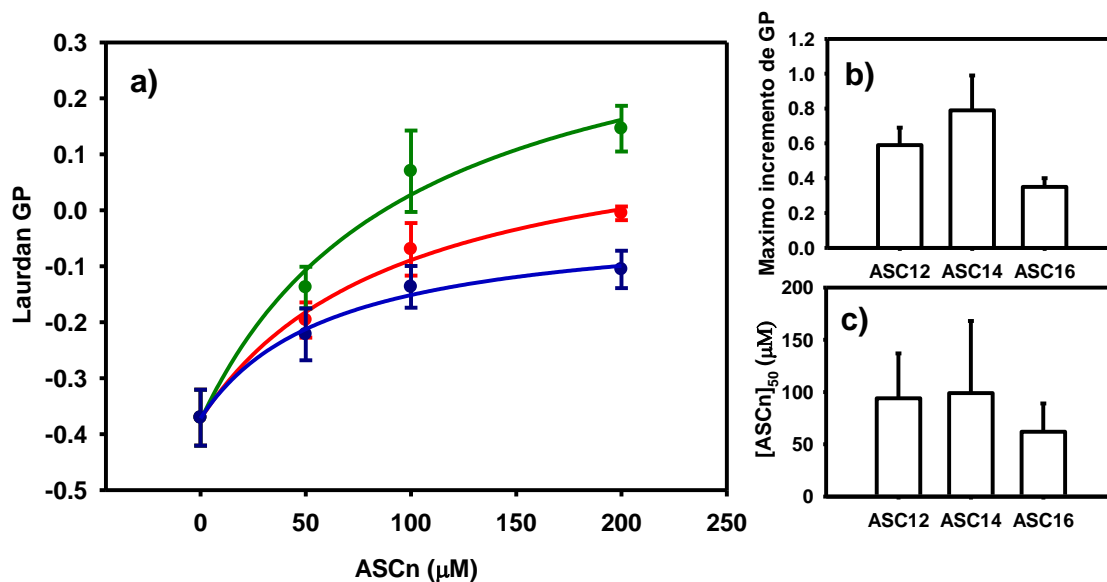


Figura 19. Cambios en la generalización polarizada de Laurdan (GP) inducida por ASCn. LUVs de POPC (100 μM) conteniendo laurdan (0.5 mol%) se incubaron por 45 minutos con ASC12 (rojo), ASC14 (verde) y ASC16 (azul). a) GP (Ec. 5) en función de la concentración final de ASCn, b) muestra el máximo aumento teórico de la GP luego de la incorporación de ASCn y (c) la concentración teórica necesaria para alcanzar el 50% del aumento, obtenido por ajuste de una función hiperbólica a los datos experimentales: $y = \text{máx. GP} \times ([\text{ASCn}]_{50} + x)$.

Los datos ponen de manifiesto que la incorporación de los ASCn en la membrana, restringe la relajación dipolar del agua superficial. ASC14 resultó ser el modulador más eficiente de la hidratación de la superficie de las membranas lipídicas seguido por ASC12 y ASC16. El ajuste de los datos según una función hiperbólica no reveló diferencias significativas en la concentración necesaria para alcanzar un aumento del 50% en la GP (Figura 19b). Como control se midió la GP de los agregados de ASCn en ausencia de las vesículas lipídicas. La GP del Laurdan en estas condiciones reveló unas superficies más estructuradas que las de bicapas lipídicas, en el orden ASC16 > ASC12 > ASC14 (Figura 20).

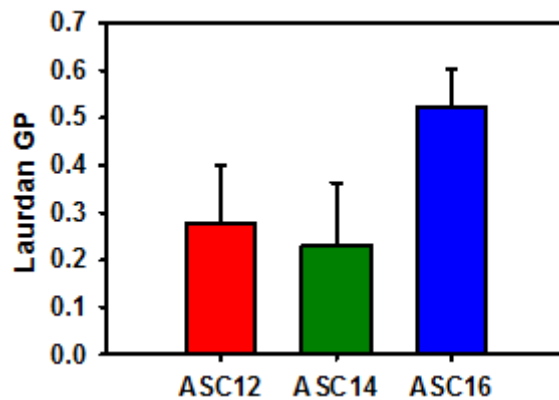


Figura 20. Laurdan GP de suspensiones acuosas de ASC12, ASC14 and ASC16. Las barras de los errores representa el SEM de dos experimentos independientes.

3.2.3 Análisis de la microviscosidad de bicapas de vesículas unilamelares grande de 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina incubadas con los alquil ésteres del ácido L-ascórbico, mediante anisotropía del 1,6-difenil-1,3,5 hexatrieno.

Los cambios en la microviscosidad del corazón hidrofóbico de las membranas se evaluaron a través de la medición de la anisotropía de fluorescencia del DPH, fluoróforo que se localiza en la porción hidrofóbica de las bicapas y se orienta predominantemente paralelo a las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos. La figura 21 muestra un aumento de la anisotropía DPH en LUVs incubadas con ASC14 y ASC16 mientras que ASC12 indujo poco efecto. Estos resultados evidencian un aumento de la microviscosidad del corazón hidrofóbico de la bicapa para los ASCn con cadena alquílica más largas.

En la Figura 20 se mostró un considerable aumento de la GP del Laurdan en el caso de ASC12, por lo tanto el pobre efecto de este fármaco sobre la anisotropía del DPH puede reflejar una integración superficial de este fármaco en la bicapa lipídica.

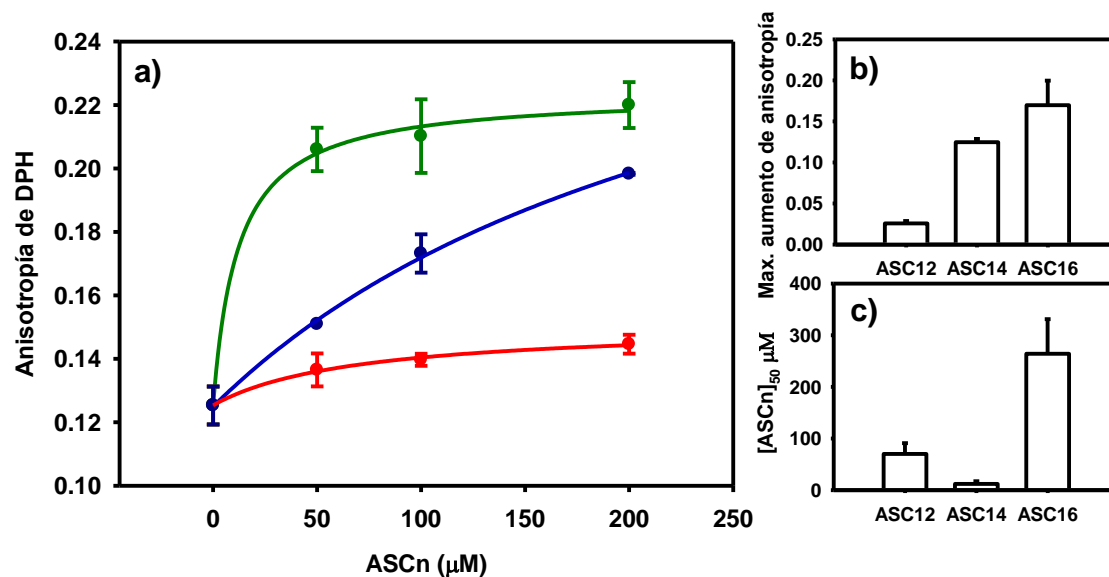


Figura 21. Cambios en la anisotropía del DPH inducidos por ASCn. LUVs de POPC marcadas con DPH (0.5 mol%), fueron incubados con ASC12 (rojo), ASC14 (verde) o ASC16 (azul) durante 45 minutos. La anisotropía del DPH se calculó según la Ec. 6 y se graficó en función de la concentración final de ASCn, (a). El panel (b) muestra el aumento máximo de la anisotropía luego de la incorporación de los ASCn y en (c) se muestra la concentración de ASCn necesaria para llegar a un aumento de la anisotropía del 50% del máximo, obtenida aplicando el ajuste de una función hiperbólica a los datos experimentales mostrados en (a) del tipo $y = \text{Anisotropía máx.} \cdot x / ([\text{ASCn}]_{50} + x)$. Las barras de errores representan el SEM de dos experimentos independientes.

Vale señalar que la ley semiempírica reportada en la Ref. (Israelachvili 1991) permite la estimación del largo de una cadena de acilo cuando está en una conformación extendida, la cual resulta en una longitud de cadena de 11,3 Å para el C12 y de 15,4 Å para el C16. Si tenemos en cuenta que una hemicapa de una membrana compuesta de POPC en estado Ld tiene un espesor de 15 a 16 Å (Ducharme et al. 1990), un acortamiento de 4 Å en la cadena de acilo para el ASC12 en comparación con ASC16 puede resultar en una restricción para que el ASC12 alcance al centro hidrofóbico de la membrana.

Por otro lado es importante señalar que el DPH incorporado en las estructuras autoensambladas de ASCn mostró un entorno altamente rígido para

agregados ASC16 en comparación con los de la ASCn más corto (Figura 22). El aumento más grande en microviscosidad inducido por ASC14 se produjo con una dosis de fármacos extremadamente baja (50% dio $12 \pm 5 \mu\text{M}$, véase la Figura 21c), lo que apoya la idea de una incorporación mayor de ASC14 con respecto a ASC16 o ASC12.

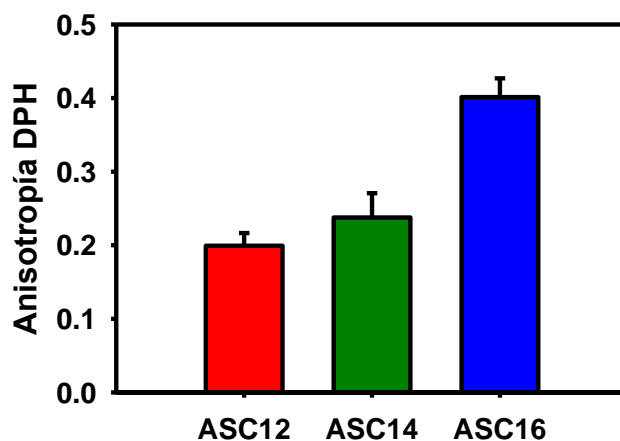


Figura 22. Anisotropía DPH en suspensiones acuosas de ASC12, ASC14 y ASC16. Las barras de error representan el SEM de dos experimentos independientes.

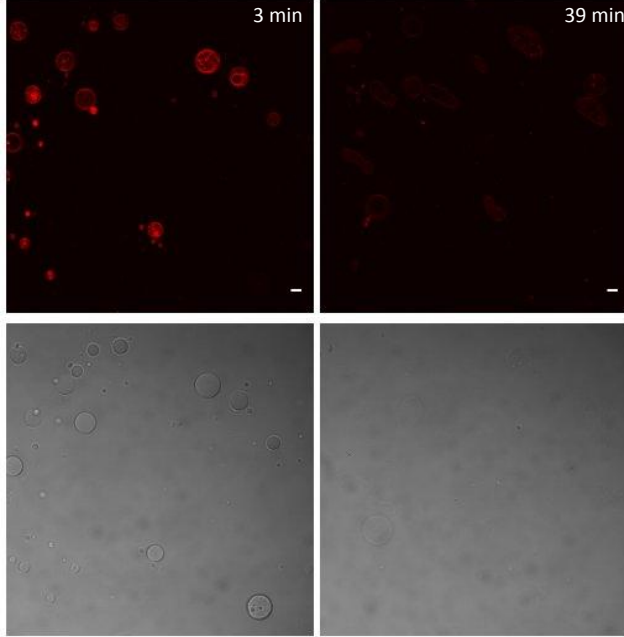
Los compuestos más activos, ASC14 y ASC16, tuvieron un comportamiento muy diferente entre sí. ASC16 mostró un valor de $[\text{ASC}]_{50}$ 22 veces mayor al de ASC14 (Figura 21c) y una concentración de saturación no accesible experimentalmente. Este último efecto puede estar relacionado con la tendencia de ASC16 a segregarse lateralmente en dominios de tipo gel (G) enriquecidos en el fármaco, previamente observados en sistemas de monocapas lipídicas (Mottola et al. 2013; Mottola et al. 2015). La partición DPH en estos dominios enriquecidos en ASC16 puede ser más baja que la partición de la sonda en los dominios enriquecidos en POPC (Pinto et al. 2013). Por lo tanto el ASC16 presente en la membrana lipídica puede encontrarse acumulado en dominios enriquecido en el fármaco, lo que permite el mantenimiento de una baja concentración de fármaco en la fase más fluida (donde se concentra el DPH). Estudios previos demostraron que ASC14 tiene una mayor capacidad que ASC16 para penetrar en monocapas de

POPC (Zulueta Diaz et al. 2016), hecho que sugiere que el mayor efecto encontrado en la anisotropía DPH puede también estar vinculado a una mayor concentración de ASC14 en la fase enriquecida en la sonda en comparación con ASC16.

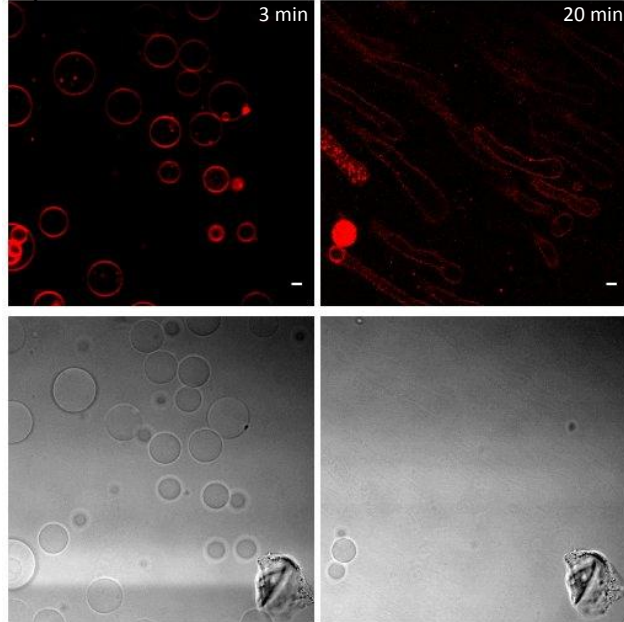
3.2.4 Observación en tiempo real, de vesículas unilamelares gigantes de 1-palmitoil 2-oleoil fosfatidilcolina bajo la acción de los alquil ésteres del ácido L-ascórbico por microscopía confocal.

Explotamos a continuación otro sistema modelo de membrana que permite la visualización directa de la bicapa lipídica mediante microscopía óptica. Generamos GUVs de POPC y analizamos los cambios en las propiedades de la membrana de estas vesículas tales como la separación de fases y cambios en la forma de las vesículas y fluctuaciones de tamaño, cuando se enfrentaron a los diferentes ASCn. La Figura 23 muestra que la adición de ASCn a las GUVs indujo una disminución de tensión de la membrana en todos los sistemas estudiados pero en diferente medida, la cual se evidencia por las deformaciones masivas de las membranas y el aumento en las fluctuaciones de forma de las vesículas. En este sentido, ASC14 es el compuesto más activo e induce el estiramiento de las vesículas en la dirección del flujo del medio (Figura 23b). ASC12 mostró un comportamiento similar, más moderado (Figura 23a) y ASC16 solamente indujo un aumento en la rugosidad, disminución de la circularidad de la membrana (Figura 23c). En todos los casos, estas observaciones se correlacionaron con una pérdida de contraste entre el medio interno de las GUVs y el medio externo detectada por microscopía DIC. Este efecto se puede asociar a una desestabilización de la integridad de la membrana y a la liberación de contenido con intercambio entre sacarosa y solución reguladora de los dos compartimentos interno y externo respectivamente.

a) ASC12



b) ASC14



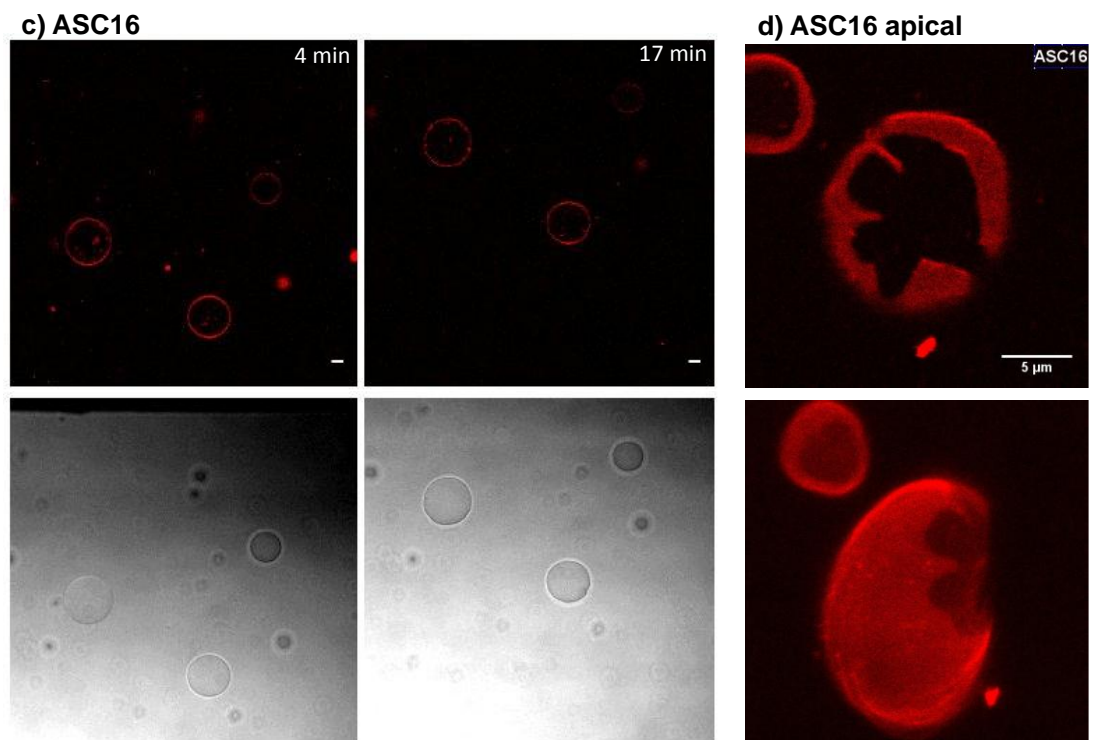


Figura 23. Microscopía Confocal de GUVs de POPC marcadas con 0.5mol% de Rho-PE y enfrentada a ASC12 (a) ASC14 (b) y ASC16 (c-d). (a-c) muestran imágenes de microscopía confocal de fluorescencia (panel superior) y microscopía DIC (panel inferior) de la sección ecuatorial de las GUVs en los tiempos indicados después de la adición de los ASCn. Las imágenes de fluorescencia en los tiempos de incubación largos (panel derecho en A, B y C) fueron menos brillantes y se le mejoró el contraste con el fin de contrarrestar el blanqueo químico desarrollado por ASCn, como se muestra en la Figura 24. El panel (d) muestra vistas apicales de las GUVs con ASC16. Las barras representan 5 μ m.

Los ensayos de liberación de contenido en LUVs (Figura 18) indicaron sólo un aumento significativo de la permeabilidad de las membranas para el caso de ASC14. Esta diferencia respecto a los experimentos con GUVs, puede ser debida al exceso de fármaco ya que el contenido de lípidos utilizado es mucho más bajo, es decir la relación molar de fármaco: lípido es alta. Cuando las GUVs se incubaron

con ASC16, se observó la aparición de dominios como zonas oscuras de las membranas libres de sonda fluorescente Rho-PE, (Figura 23d). Dado que es conocido que la sonda Rho-PE es excluida de las fases G, esto sugiere que los dominios podrían estar en esa fase. Además, los dominios con formas de flores se asemejan a los dominios líquidos condensados de ASC16 observados en monocapas de POPC / ASC16 (Benedini et al. 2011; Mottola et al. 2013; Mottola et al. 2015). Los primeros estudios de espectroscopía infrarroja reportados por Casal y su grupo (Köhler et al. 1988) evidenciaron que ASC16 induce un aumento de la temperatura de transición de fases desde G a Ld en monocapas de dipalmitoil-PC. El proceso de transición se produce en un solo paso, pero la estabilización de la fase G sugiere fuertemente una partición preferencial de ASC16 en esta fase y también baja solubilidad de ASC16 en la fase Ld. Estos datos concuerdan con nuestros hallazgos experimentales en que ASC16 induce una fase G enriquecida en ASC16 en coexistencia con una fase fluida con bajo contenido de ASC16.

3.2.5 Capacidad antioxidante de los alquil ésteres del ácido L-ascórbico sobre componentes de membrana

Los experimentos de microscopía confocal también mostraron una disminución notable de la intensidad de fluorescencia de la Rho-PE después de la adición de los ASCn (Figura 24). Esta disminución no fue causada por fotoapagado debido a la exposición a la luz (véase la curva de control en la Figura 24), si no que probablemente por reducción química del grupo rodamina del fluoróforo anfifílico utilizado. Previamente se ha reportado que los ASCn mantienen una parte importante de la capacidad antioxidante (reductor) del ácido ascórbico (ASC) (Palma et al. 2007; Mottola et al. 2015). En este trabajo de Tesis exploramos si este efecto podría ser inducido por la acción antioxidante de ASC soluble. La Figura 24 muestra que no hubo ningún efecto en la fluorescencia de la Rho-PE cuando se

enfrentaron las GUVs al ASC soluble en contraste con el efecto medido con ASCn durante el tiempo analizado.

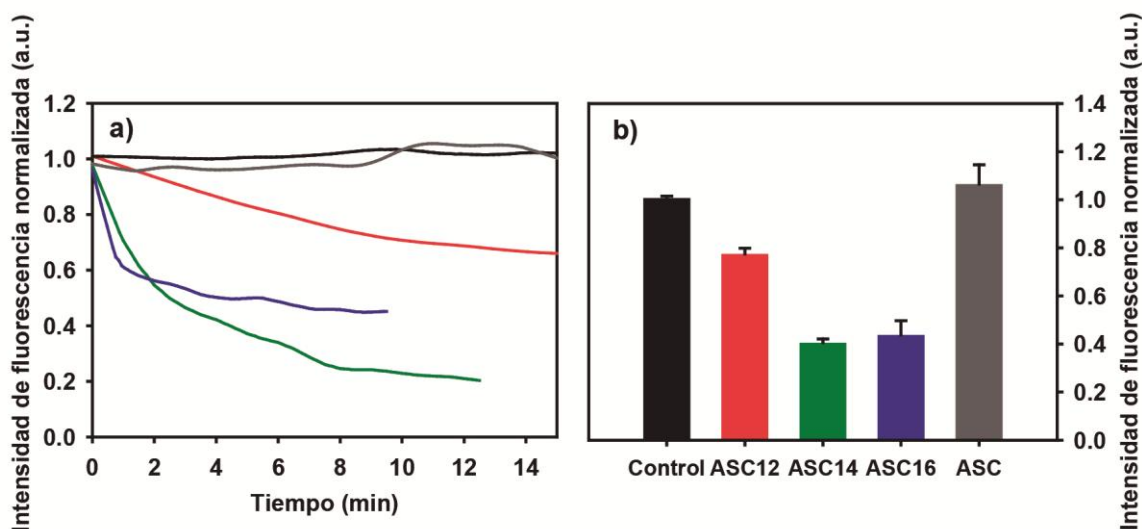


Figura 24. Diminución de la intensidad de fluorescencia de Rho-PE incorporado a las membranas de GUVs luego de la interacción de los ASCn. (a) Intensidad de fluorescencia vs. tiempo normalizada respecto a la intensidad de fluorescencia a tiempo zero, que corresponde a la primera toma luego de la inyección de ASC12 (rojo), ASC14 (verde), ASC16 (azul), sin ASCn (negro) y con ácido ascórbico (ASC) línea (gris). (b) Se muestra comparativamente la disminución de la fluorescencia a los 5 minutos de agregados los ASCn o ASC en las distintas condiciones. Las barras de error representan el SEM de dos experimentos independientes.

La cuantificación de la intensidad de la fluorescencia en el tiempo después del agregado de los fármacos mostró un efecto creciente de orden $ASC12 < ASC14 \sim ASC16$. Puesto que la potencia reductora de los ASCn estudiados son similares (Kharrat et al. 2014; Lo Nostro et al. 2000) este resultado sugiere que el ASCn debe integrarse en la membrana lipídica para que haya reducción de los componentes de membranas y que las diferencias en la pérdida de intensidad de la fluorescencia pueden ser una medida de la capacidad de los ASCn de incorporarse a las mismas. En este caso ASC12 aparece como el compuesto con menos capacidad de

incorporación, así como el menos eficaz en el aumento de la microviscosidad del corazón de las membranas (figuras 21 y 24) y con efecto moderado sobre la reestructuración de las vesículas. En este punto es importante señalar que los distintos tipos de mediciones de fluorescencia mostrados anteriormente también pueden sufrir de dicha disminución global de la intensidad de fluorescencia por reducción por parte de los ASCn, pero los parámetros reportados tales como la GP del Laurdan y la anisotropía del DPH son calculados de forma relativa por ende no son alterados por este efecto reductor.

3.2.6 Polarización generalizada del Laurdan en vesículas unilamelares grandes con distinta composición lipídica luego del enfrentamiento a los alquil ésteres del ácido L-ascórbico.

Se evaluó si la composición lipídica de las vesículas enfrentadas a los ASCn condicionaba el efecto de los mismos en las membranas. Para ello se procedió a enfrentar los ASCn a LUVs de mezclas binarias de POPC/Col o POPC/Cer (80:20). Dichos liposomas se encuentran en estado de fase Ld+Lo y Ld+G respectivamente, según bibliografía (Castro et al. 2009; de Almeida et al. 2003).

Las vesículas control sin el agregado de fármaco presentan valores de GP mayores en presencia de Col (y de fase Lo) que para POPC puro, indicando una mayor restricción de la relajación dipolar del agua superficial. Éste fenómeno ha sido reportado anteriormente para mezclas binarias PC/Col (Parasassi et al. 1995) y se ha propuesto como otra evidencia del efecto en general de esteroides de aumentar el empaquetamiento de la bicapa con respecto a fase Ld. Contrariamente a lo observado para vesículas de POPC, el agregado de ASCn no afecta el valor de GP en las vesículas con alto contenido de Col (Figura 25). Esto puede deberse a que los ASCn no tienen un efecto estructurador del agua superficial mayor al que ya ocurre por la propia membrana lipídica. La presencia de Cer induce aumento de los valores de GP con respecto al control de POPC, acorde a datos bibliográficos

(Fidorra et al. 2006), mientras que la presencia de ASCn es pobremente censada por el Laurdan (los cambios están por debajo de las confidencialidad del dato).

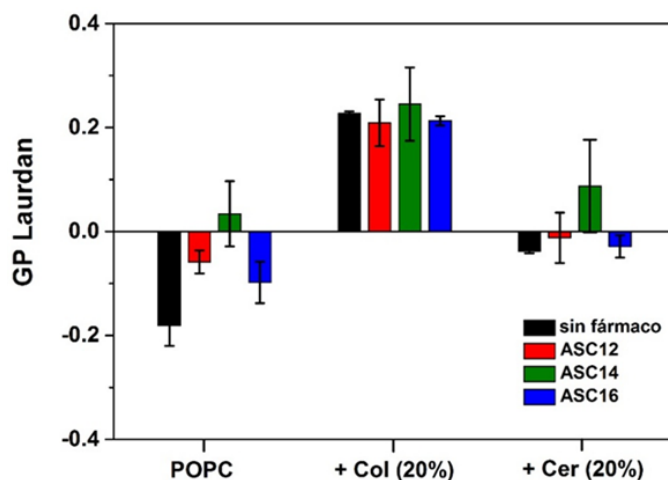


Figura 25. Cambios en la generalización polarizada de Laurdan (GP) inducida por ASCn en liposomas binarios. La figura muestra GP (Ec. 5) de LUVs de POPC puro, o conteniendo 20 mol% de Col o Cer y 0.5 mol% de Laurdan, los cuales se incubaron por 45 minutos con ASC12 (rojo), ASC14 (verde) o ASC16 (azul) a una relación molar fármaco lípido (2:1). Las barras de error representan el SEM de dos experimentos independientes.

Estos resultado constituyen una apertura hacia el entendimiento de la interacción de los ASCn (y en general de anfifilos solubles) a bicapas complejas, un área que se ha iniciado en nuestro grupo utilizando monocapas lipídicas como modelo de membrana y que evidencian una interacción diferencial de los ASCn con monocapas en distintos estados de fase (Zulueta Diaz et al. 2016). Según dicho estudio, el menor cambio observado en los valores de GP para vesículas binarias (Figura 25) podría ser el resultado de una menor inserción a de los ASCn a membranas altamente compactas (fases condensadas o con alto contenido de Col).

4 CONCLUSIONES

Los resultados de esta Tesis sugieren que los postulados que son ciertos para liposomas típicos de fosfolípidos no parecen regir para liposomas que contienen otros lípidos de gran importancia a nivel biológico como Col y Cer. El enriquecimiento de las membranas con estos lípidos, que poseen una forma molecular de cono invertido, induce una restructuración de las bicapas que en su proceso de formación han sido forzadas a adoptar estructuras pequeñas al ser extruidas por filtros de 100 nm. Esto está asociado a la aparición de fases de distinta naturaleza a las Ld típicas de fosfolípidos insaturados, como las fases Lo enriquecidas en Col o G enriquecidas en Cer, estas fases pueden experimentar mayor estrés en superficies planas que en curvas y favorecerían los procesos observados de aposición y/o fusión de vesículas.

Además de los aspectos estructurales de las membranas celulares, su capacidad de interactuar con agentes anfitrónicos externos y responder a éstos estímulos a través de cambios fisicoquímicos es un aspecto clave en la función biológica de estas membranas. En esta Tesis analizamos la respuesta a la desestabilización de la membrana inducida por el detergente no iónico TX-100. La presencia de Col indujo una protección de la membrana frente al detergente tal como fuera esperable según estudios pioneros en membranas enriquecidas en Col (Mouritsen & Bloom 1995). Este efecto puede ser consecuencia de una menor partición del TX-100 a la membrana, como ha sido propuesto para mezclas ternarias conteniendo Col (Heerklotz et al. 2003) o una diferencia en el efecto que dicho detergente tiene en el aumento de la permeabilidad de estas bicapas lipídicas.

Por otro lado la presencia de dominios en estado de fase G formados por Cer induce el efecto opuesto, en cuanto debilitan las bicapas lipídicas favoreciendo el efecto permeabilizante de TX-100. Esto puede estar relacionado con el mecanismo de acción biológico de Cer como mediador de la señalización celular (Schenck et al.

2007; Grassmé et al. 2007). La formación enzimática de Cer induce un aumento de la permeabilidad de la bicapa lipídica (Montes et al. 2002) y aumenta el movimiento transhemicapa (flip-flop) de componentes lipídicos (Contreras et al. 2003). Estos efectos han sido asociados a una producción asimétrica de Cer y desbalance de tensión entre ambas hemicapas (López-Montero et al. 2007). En nuestros estudios el aumento de la permeabilidad se produjo sin un agregado asimétrico de Cer, posiblemente asociado a la presencia de defectos e irregularidades de empaquetamiento en los bordes de los dominios condensados. Dicho comportamiento evidencia un posible mecanismo de acción biológica de Cer ya que torna la membrana más susceptible a la acción de agentes desestabilizantes que pueden incorporarse a la membrana.

En nuestros estudios utilizamos el detergente TX-100 para tal efecto, pero en un entorno biológico dicho desestabilizante puede ser cualquier molécula anfipática natural como es el caso de otros actores en la señalización celular o sintética, como distintos fármacos anfipáticos con capacidad de integrarse y cambiar las propiedades fisicoquímicas de las membranas lipídicas. En este contexto focalizamos nuestra atención a los ASCn, con el objetivo de utilizarlas como sondas para evaluar los cambios que ellos producen cuando se incorporan a bicapas lipídicas. Diferentes datos bibliográficos revelan que los ASCn que poseen cadenas alquílicas de distintos largos, utilizados en diferentes preparaciones farmacológicas debido a su naturaleza anfipática y su poder antioxidante, tienen sutiles diferencias en la eficacia terapéutica (Tártara et al. 2012; Kharrat et al. 2014; Palma et al. 2003). Esas diferencias pueden estar relacionadas a las diferentes interacciones de los ASCn con las membranas celulares.

En este trabajo de Tesis demostramos que los compuestos ASCn que varían en la longitud de la cadena de acilo de 12 a 16 átomos de carbono producen diferentes efectos en las vesículas de fosfolípidos que utilizamos como modelos de biomembrana que se resumen cualitativamente en la Tabla 3. ASC12 es el único que en solución acuosa forma estructuras pequeñas, así como grandes partículas

laminares (ver Figura 17c). La presencia de esas estructuras pequeñas y laxas puede resultar de importancia en la carga de otros fármacos hidrófobos (Tártara et al. 2012), y también pueden ser responsables de un rápido intercambio molecular con biomembranas. ASC12 mostró la capacidad de particionar a la capa superficial de los liposomas, pero no penetra profundamente en la membrana. Además, muestra efectos considerables en la disminución de la tensión de la membrana y liberación del contenido vesicular, una capacidad que puede ser relevante en la administración de fármacos hidrófobos (Tártara et al. 2012; Kharrat et al. 2014).

ASC14 se mostró como el fármaco más perturbador de la membrana (Tabla 3), con un alto grado de incorporación y capacidad de mezclarse lateralmente con los componentes de la bicapa lipídica sin observarse separación de fases. No se ha informado en bibliografía algún enfoque farmacológico sobre el uso de este compuesto, pero a partir de este trabajo de Tesis podemos esperar que haya un compromiso entre el efecto antioxidante, localizado a nivel de la membrana y una considerable desestabilización de la bicapa lipídica.

El compuesto ASC16 mostró importantes propiedades de reestructuración de la membrana con la característica adicional de que una vez incorporados en la membrana lipídica es capaz de formar dominios condensados enriquecidos en el fármaco. Esto, junto con la formación de estructuras compactas grandes en solución acuosa (véase Figura 17a y Mottola et al. 2013), puede dar cuenta de la buena capacidad de los coageles como adyuvante, reportada recientemente (Sánchez Vallecillo et al. 2014). El desarrollo de nuevos adyuvantes de este tipo son relevantes en especial para vacunas de tipo inactivado y de subunidades, las cuales son más estables y seguras que las vacunas vivas. Los adyuvantes utilizados rutinariamente para este propósito estimulan una respuesta más débil del sistema inmunitario que las vacunas vivas por lo cual son necesarias varias dosis adicionales o vacunas de refuerzo para asegurar un nivel eficiente de inmunidad. Esto implica un gran inconveniente por ejemplo en zonas aisladas, alejadas de los servicios de salud. Por ello el desarrollo de este tipo de adyuvantes con capacidad

de formar estructuras de tipo reservorio se ha tornado un objetivo de alta prioridad en el panorama biotecnológico actual.

Tabla 3. Resumen de la actividad de los ASCn a nivel de membrana, los símbolos representan una cuantificación arbitraria y relativas a los efectos de los ASCn: – (nulo), + (bajo) ++ (moderato) +++ (importante).

| Actividad de membrana | ASC12 | ASC14 | ASC16 |
|--|--------------|--------------|--------------|
| Efecto detergente en MLVs de POPC (determinación de fosforo soluble) | - | - | - |
| Cambios en la distribución del tamaño de LUVs de POPC (DLS) | - | ++ | +++ |
| Liberación de contenido acuoso (CF) de LUVs de POPC | - | ++ | - |
| Aumento de la reestructuración del agua superficial (GP Laurdan) | ++ | +++ | + |
| Aumento de la microviscosidad en el corazón hidrofóbico de las membranas (Anisotropía DPH) | - | +++ | ++ |
| Cambios en la tensión de membrana y elongación de la GUVs (microscopía confocal) | ++ | +++ | + |
| Perdida de contenido en GUVs (microscopia DIC) | ++ | +++ | + |
| Presencia de dominios condensados en GUVs (Microscopía confocal) | - | - | +++ |
| Reducción de la intensidad de fluorescencia de las GUVs (microscopía confocal). | + | +++ | +++ |

Además, el efecto de este coagel, cuando se utiliza como adyuvantes, sugiere una respuesta inflamatoria local inducida por ASC16 como una

característica principal responsable de la inmunización obtenida. Evidencias de necrosis local en la zona de inyección apoyaron esta hipótesis. Este panorama se puede entender mejor a la luz de nuestros resultados: ASC16 puede ser liberado lentamente desde el coagel e integrarse en las membranas celulares, en los que también puede acumularse, y segregar lateralmente en dominios rígidos que actúan como reservorios del fármaco. La moderada desestabilización de la membrana y una mayor permeación puede atentar contra la viabilidad celular a altas concentraciones del fármaco (cerca de la zona de inyección) y despertar la respuesta inmunológica observada. De manera similar, ASC14, con su mayor capacidad de perturbar la membrana puede ir más allá y poner en peligro la supervivencia del animal.

Los estudios desarrollados en esta Tesis sugieren que la acumulación ASCn en la biomembrana mejora su calidad como reductor (o antioxidante) debido a la localización sitio específica de los fármacos. Esta avala los reportes anteriores que evidencian una mejorada capacidad bactericida para los ASCn en comparación con ASC soluble junto con el ácido graso correspondiente (Kharrat et al. 2014). Ésta propiedad los torna especialmente atractivos para nuevos usos farmacológicos con necesidad de proteger ante la oxidación moléculas bioactivas hidrofóbicas.

En resumen, la familia ASCn muestra actividad de perturbación de biomembranas en diferente magnitud dependiendo de la longitud de su cadena alquílica. La diferente actividad encontrada para cada ASCn en el presente trabajo de Tesis puede dar cuenta de un potencial uso farmacológico característico de cada ASCn, lo cual puede contribuir para el diseño de nuevas aplicaciones que tengan interfaces biológicas como blanco principal.

5 REFERENCIAS

- Ahyayauch, H. et al., 2010. Detergent effects on membranes at subsolubilizing concentrations: Transmembrane lipid motion, bilayer permeabilization, and vesicle lysis/reassembly are independent phenomena. *Langmuir*, 26(10), pp.7307–7313.
- Ale, E.C., Maggio, B. & Fanani, M.L., 2012. Ordered-disordered domain coexistence in ternary lipid monolayers activates sphingomyelinase by clearing ceramide from the active phase. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(11), pp.2767–2776.
- Ali, M.R., Cheng, K.H. & Huang, J., 2006. Ceramide drives cholesterol out of the ordered lipid bilayer phase into the crystal phase in 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine/cholesterol/ ceramide ternary mixtures. *Biochemistry*, 45(41), pp.12629–12638.
- De Almeida, R.F.M., Fedorov, A. & Prieto, M., 2003. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophysical journal*, 85(4), pp.2406–2416. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74664-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74664-5).
- Ambroggio, E. et al., 2010. ArfGAP1 generates an Arf1 gradient on continuous lipid membranes displaying flat and curved regions. *The EMBO journal*, 29(2), pp.292–303.
- Ambroggio, E.E. et al., 2005. Direct visualization of membrane leakage induced by the antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein. *Biophysical journal*, 89(3), pp.1874–1881. Available at: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.066589>.
- Bartlett, G.R., 1958. Colorimetric Assay Phosphorylated for Free Glyceric Acids. *Journal of Biological Chemistry*, 234, pp.469–471.
- Basu, S.C. & Basu, M., 2002. *Liposomes Methods and protocols*, Berlin: Springer Science + Business Media, LLC.
- Becker, K.A. et al., 2008. Ceramide-enriched membrane domains in infectious biology and development. In P. J. Quinn & X. Wang, eds. *Sub-cellular biochemistry*. Berlin: Springer Science + Business Media, LLC, pp. 523–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18751925>.

- Benedini, L. et al., 2014. Study of the influence of ascorbyl palmitate and amiodarone in the stability of unilamellar liposomes. *Molecular Membrane Biology*, 31(2-3), pp.85–94. Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/09687688.2014.896956>.
- Benedini, L. et al., 2011. Surface phase behavior and domain topography of ascorbyl palmitate monolayers. *Langmuir*, 27(17), pp.10914–10919.
- Van Blitterswijk, W.J. et al., 2003. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *The Biochemical journal*, 369(Pt 2), pp.199–211.
- Bollinger, C.R., Teichgräber, V. & Gulbins, E., 2005. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1746(3), pp.284–294.
- Brown, D. a & London, E., 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology*, 14, pp.111–136.
- Capuzzi, G. et al., 1996. Mixtures of Stearoyl-6-O-ascorbic Acid and r-Tocopherol : A Monolayer Study at the Gas / Water Interface. *Langmuir*, 11(11), pp.3957–3963.
- Carpinteiro, A. et al., 2008. Ceramide-induced cell death in malignant cells. *Cancer Letters*, 264(1), pp.1–10.
- Castro, B.M. et al., 2009. Cholesterol-rich fluid membranes solubilize ceramide domains: Implications for the structure and dynamics of mammalian intracellular and plasma membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34), pp.22978–22987.
- Castro, B.M., Prieto, M. & Silva, L.C., 2014. Ceramide: A simple sphingolipid with unique biophysical properties. *Progress in Lipid Research*, 54(1), pp.53–67. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2014.01.004>.
- Chen, Z. & Rand, R.P., 1997. The influence of cholesterol on phospholipid membrane curvature and bending elasticity. *Biophysical journal*, 73(1), pp.267–276.
- Contreras, F.X. et al., 2003. Sphingomyelinase activity causes transbilayer lipid translocation in model and cell membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), pp.37169–37174.

- Córsico, B. et al., 2013. *Análisis estructural y funcional de Macromoléculas*, Available at: <http://hdl.handle.net/10915/37269>.
- Danelian, E. et al., 2000. SPR Biosensor Studies of direct Interaction between 27 Drugs and a Liposome Surface: Correlation with Fraction Absorbed in Humans. *Journal of medicinal chemistry*, 43(11), pp.2083–2086.
- Ducharme, D. et al., 1990. Ellipsometric Study of the Physical States of Phosphatidylcholines at the Air-Water Interface. *The Journal of Physical Chemistry A*, 94(5), pp.1925–1932. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100368a038>.
- Fanani, M.L. et al., 2010. The action of sphingomyelinase in lipid monolayers as revealed by microscopic image analysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1798(7), pp.1309–1323. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.01.001>.
- Fanani, M.L. & Maggio, B., 2010. Phase state and surface topography of palmitoyl-ceramide monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(6), pp.594–600.
- Fanani, M.L.M.L. & Maggio, B., 2011. Liquid-liquid domain miscibility driven by composition and domain thickness mismatch in ternary lipid monolayers. *Journal of Physical Chemistry B*, 115(1), pp.41–49.
- Fidorra, M. et al., 2006. Absence of fluid-ordered/fluid-disordered phase coexistence in ceramide/POPC mixtures containing cholesterol. *Biophysical journal*, 90(12), pp.4437–4451. Available at: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.077107>.
- Gallay, J. & De Kruijff, B., 1982. Correlation between molecular shape and hexagonal HII phase promoting ability of sterols. *FEBS letters*, 143(1), pp.133–136.
- Grassmé, H., Riethmüller, J. & Gulbins, E., 2007. Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains. *Progress in Lipid Research*, 46(3-4), pp.161–170.
- Heerklotz, H. et al., 2003. The sensitivity of lipid domains to small perturbations demonstrated by the effect of triton. *Journal of Molecular Biology*, 329(4), pp.793–799.
- Heimburg, T., 2007. *Thermal Biophysics of Membranes*, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

- Holopainen, J.M., Angelova, M.I. & Kinnunen, P.K., 2000. Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes. *Biophysical journal*, 78(2), pp.830–838.
- Horres, C.R. & Hannun, Y. a., 2012. The roles of neutral sphingomyelinases in neurological pathologies. *Neurochemical Research*, 37(6), pp.1137–1149.
- Israelachvili, J.N., 1991. *Intermolecular and Surface Forces* Second., London: Academic Press.
- Kharrat, N. et al., 2014. Lipophilization of Ascorbic Acid : A Monolayer Study and Biological and Antileishmanial Activities. *J Agric Food Chem*, 62(37), pp.9118–27.
- Köhler, U., Mantsch, H.H. & Casal, H.L., 1988. Infrared spectroscopic characterization of the interaction of ascorbyl palmitate with phospholipid bilayers. *Canadian Journal of Chemistry*, 66(4), pp.983–988.
- Lakowicz & J.R., 2006. Fluorescence anisotropy. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Publishers, pp. 353–381.
- López-Montero, I., Vélez, M. & Devaux, P.F., 2007. Surface tension induced by sphingomyelin to ceramide conversion in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768(3), pp.553–561.
- Maggio, B. et al., 2006. Biophysics of sphingolipids II. Glycosphingolipids: An assortment of multiple structural information transducers at the membrane surface. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(12), pp.1922–1944.
- Maggio, B. & Yu, R.K., 1989. Interaction and fusion of unilamellar vesicles containing cerebroside and sulfatides induced by myelin basic protein. *Chem. Phys. Lipids*, 51, pp.127–136.
- Mangiarotti, A., Caruso, B. & Wilke, N., 2014. Phase coexistence in films composed of DLPC and DPPC: A comparison between different model membrane systems. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(7), pp.1823–1831. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.02.012>.
- Marsh, D., 2009. Cholesterol-induced fluid membrane domains: A compendium of lipid-raft ternary phase diagrams. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(10), pp.2114–2123. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.08.004>.

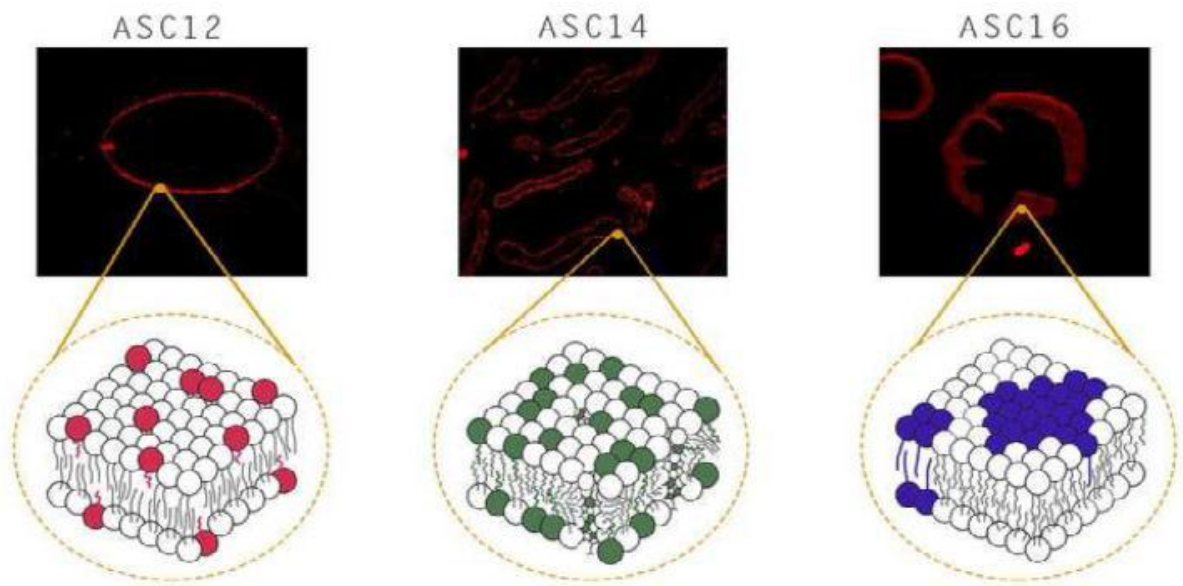
- Marsh, D., 1990. CRC Handbook of Lipid Bilayers. , p.387.
- Martinez-Seara, H. et al., 2010. Cholesterol induces specific spatial and orientational order in cholesterol/phospholipid membranes. *PLoS ONE*, 5(6).
- Mesa, U. et al., 2010. La Membrana Plasmatica: Modelos, Balsas y Señalización. *REB*, 29(4), pp.125–134.
- Montes, L.R. et al., 2002. Membrane restructuring via ceramide results in enhanced solute efflux. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), pp.11788–11794.
- Morad, S. a & Cabot, M.C., 2013. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 13(1), pp.51–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23235911>.
- Mottola, M. et al., 2015. Alkyl esters of l-ascorbic acid: Stability, surface behaviour and interaction with phospholipid monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 457, pp.232–242.
- Mottola, M. et al., 2013. Ascorbyl palmitate interaction with phospholipid monolayers: Electrostatic and rheological preponderancy. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(11), pp.2496–2505.
- Mouritsen, O.G. & Bloom, M., 1995. The evolution of membranes. In L. R. and S. E., ed. *Handbook of Biological Physics*. Amsterdam: Elsevier Science, pp. 65–95.
- Lo Nostro, P. et al., 2000. Self-assembly and antioxidant properties of octanoyl-6-O-ascorbic acid. *Langmuir*, 16(4), pp.1744–1750.
- Oliveira, R.G. et al., 2010. Equivalent aqueous phase modulation of domain segregation in myelin monolayers and bilayer vesicles. *Biophysical Journal*, 99(5), pp.1500–1509.
- Palma, S. et al., 2003. Coagels from alkanoyl-6-O-ascorbic acid derivatives as drug carriers: Structure and rheology. *Farmaco*, 58(12), pp.1271–1276.
- Palma, S. et al., 2002. Coagels from Ascorbic Acid Derivatives. *Langmuir*, 18(24), pp.9219–9224.
- Palma, S. et al., 2007. Nanostructures from alkyl vitamin C derivatives (ASCn): Properties and potential platform for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 345(1-2), pp.26–34.

- Parasassi, T. et al., 1995. Abrupt modifications of phospholipid bilayer properties at critical cholesterol concentrations. *Biophysical journal*, 68(5), pp.1895–1902. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80367-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80367-X).
- Parasassi, T. et al., 1990. Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophysical journal*, 57(6), pp.1179–1186.
- Peetla, C., Stine, A. & Labhasetwar, V., 2009. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Mol Pharm.*, 6(5), pp.1264–1276.
- Peñalva, D. a. D.A. et al., 2014. Atypical surface behavior of ceramides with nonhydroxy and 2-hydroxy very long-chain (C28-C32) PUFAs. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(3), pp.731–738. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.11.018>.
- Pinto, S.N. et al., 2013. A combined fluorescence spectroscopy, confocal and 2-photon microscopy approach to re-evaluate the properties of sphingolipid domains. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(9), pp.2099–2110. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.011>.
- Sánchez Vallecillo, M.F. et al., 2014. Adjuvant activity of CpG-ODN formulated as a liquid crystal. *Biomaterials*, 35(8), pp.2529–2542. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.002>.
- Schenck, M. et al., 2007. Ceramide: Physiological and pathophysiological aspects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462(2), pp.171–175.
- Seddon, J.M. & Templer, R.H., 1995. Polymorphism of Lipid-Water Systems. In R. Lipowsky & E. Sackmann, eds. *Handbook of Biological Physics*. Amsterdam: Elsevier Science B.V., pp. 97–160.
- Seifert, U. & Lipowsky, R., 1995. Morphology of Vesicles. In R. Lipowsky & E. Sackmann, eds. *Handbook of Biological Physics*. Amsterdam: Elsevier Science B.V., pp. 403–462.
- Stottrup, B.L. & Keller, S.L., 2006. Phase behavior of lipid monolayers containing DPPC and cholesterol analogs. *Biophysical journal*, 90(9), pp.3176–3183.
- Tártara, L.I. et al., 2012. Improvement of Acetazolamide Ocular Permeation Using Ascorbyl Laurate Nanostructures as Drug Delivery System. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 28(2), pp.102–109.

- Veiga, M.P. et al., 1999. Ceramides in phospholipid membranes: effects on bilayer stability and transition to nonlamellar phases. *Biophysical journal*, 76(1 Pt 1), pp.342–350.
- Wu, B.X., Clarke, C.J. & Hannun, Y. a., 2010. Mammalian Neutral Sphingomyelinases: Regulation and Roles in Cell Signaling Responses. *Neuromolecular Med.*, 12(4), pp.320–330.
- Zhang, Y. et al., 2009. Ceramide-enriched membrane domains-Structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(1), pp.178–183. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.07.030>.
- Zulueta Diaz, Y. de las M. et al., 2016. The Rheological Properties of Lipid Monolayers Modulate the Incorporation of L - Ascorbic Acid Alkyl Esters. *Langmuir*, 32, pp.587–95.

6 TRABAJO PUBLICADO

Giudice, F. et al., 2016. The amphiphilic alkyl ester derivatives of L-ascorbic acid induce reorganization of phospholipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(9), pp.2132–2139.



Agradecimientos

Deseo agradecer ante todo al Dr. Bruno Maggio por la oportunidad de dejarme poder llevar a cabo este doctorado en su laboratorio, por su afecto, su cortesía, su constante disponibilidad y sus innumerables enseñanzas.

Agradesco a la Dra. María Laura Fanani, directora de esta tesis por la confianza, por su disponibilidad a responder mis dudas durante el desarrollo de este doctorado y por todos los logros de esta etapa de mi vida, sin la cual no hubieran sido posibles.

Agradezco a todos mis colegas biofísicos que me acompañaron y me apoyaron ya sea profesionalmente y humanamente durante estos cuatro años de mi estadía en Córdoba, así volviendo esta experiencia única y muy enriquecedora.

Un agradecimiento particular va a la Dra. Natalia Wilke por haberme dejado escuchar las conversaciones con sus discípulos, los cuales fueron una fuente inesorable de aprendizaje.

Otro agradecimiento particular va a la Dra. Soledad Celej, por haberme asesorado mil y una veces sobre las técnicas de fluorimetrías, gracias a las cuales pude contestar a varias preguntas de estas tesis.

Agradezco al Dr. Rafael Oliveira y el Dr. Ernesto Ambroggio por su colaboración en esta tesis.

Deseo agradecer al Dr. Gustavo Nores (“papi”) por su apoyo moral, y sus consejos, y para transformar su oficina en una consultora psicológica todas las veces que lo necesité. Gracias!

Agradezco mi compañero Agustín Mangiarotti, con el cual iniciamos juntos este camino, por todas las ayudas y por estar siempre, y por haber sido más que un simple compañero un verdadero amigo.

Agradezco mis familias adoptivas, por haberme dado mucho calor humano haciendome extrañar menos mi familia nativa. Mis mamitas, la Biol. Marina Rodríguez y Graciela Cuadrado para haberme abierto las puertas de sus casas y por todo el afecto incondicional que me han regalado y mucho más. Gracias!

Agradezco toda la comunidad del CIQUIBIC, por haberme remarcado el concepto de que la unión hace la fuerza.

Agradezco este departamento además para haberme echo encontrar algunas personas especiales: Alin Tobares, Samy Funes, Carlos Mas, Yenisleidy Zhulueta, Candelaria Camara, Gabriela Marzari, Milagro Mottola, Eliana Escobar, Romina

Cejas, Eugenia Chiari. Chicos, se dice que: “ Quien encuentra un amigo encuentra un tesoro”, con ustedes me he vuelto rica. Gracias infinitas!

Por último, no menos importante, quisiera agradecer a toda las instituciones que hicieron posible todo esto: La Universidad Nacional de Córdoba, La Facultad de Ciencias Químicas, el Centro de Investigación en Química Biológica (CIQUIBIC-CONICET). El gobierno que me recibió en este país.