

# Tesis de doctorado en Ciencias Químicas

Título: *“Regulación de la interacción de anfifilos con membranas lipídicas modelo”*

Lic en Bioq. **Yenisleidy de las Mercedes Zulueta Díaz**

Directora: **Dra. María Laura Fanani**

**2019**



El presente trabajo de tesis fue realizado en el Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba- Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba ( CONICET), bajo la dirección de la Dra. María Laura Fanani.

### **Comisión evaluadora de tesis:**

- Dra. Natalia Wilke
- Dra. Mabel Yudi
- Dra. María Angélica Perillo
- Dr. Axel Hollmann (evaluador externo)

# Índice

## *Abreviaturas*

## *Resumen general*

### **Capítulo 1: Introducción** ..... 1

1.1 Modelos de membrana celular .....	1
1.2 Composición lipídica de la membrana .....	3
1.3 Fluidez de membranas lipídicas .....	4
1.4 Autoensamblaje, factores de empaquetamiento y morfología de los agregados .....	6
1.5 Sistemas modelo en estudio .....	10
1.6 Anfifilos estudiados: Importancia biológica e interés farmacológico .....	12
1.7 Hipótesis y Objetivos .....	15

### **Capítulo 2: Materiales y métodos** ..... 18

2.1 Materiales utilizados .....	18
2.2 Monocapas lipídicas como modelos de membranas y estrategias experimentales empleadas .....	19
2.2.1 Monocapas de Langmuir en interfase agua- aire. Isotermas de compresión .....	19
2.2.2 Estudios de penetración de anfifilos a interfases lipídicas .....	22
2.2.3 Estudios de Titulación Superficial .....	23
2.2.4 Coeficiente de difusión de microsferas en monocapas lipídicas de diferentes características reológicas .....	24
2.2.5 Microscopía de Angulo de Brewster .....	26
2.2.6 Transferencia de película de Langmuir a soportes sólidos para inspección por microscopía de fuerza atómica (AFM) .....	27
2.3 Utilización de Vesículas Lipídicas como modelo de membranas.....	29
2.3.1 Preparación de liposomas: vesículas multilamelares (MLVs), vesículas unilamelares grandes (LUVs) y Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs) .....	29
2.3.2 Análisis de la distribución de tamaño de LUVs por dispersión dinámica de la luz (DLS.....	30
2.3.3 Medidas de Potencial Z en LUVs .....	32
2.3.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) empleando MLVs .....	33
2.3.5 Análisis del equilibrio de formas micelares y bicapas en suspensiones lipídicas conteniendo HePC .....	35
2.4 Actividad Fosfolipasa .....	36

### **Capítulo 3: Caracterización de las propiedades de superficie de los anfifilos.** . 37

3.1 Introducción .....	37
------------------------	----

3.2 Caracterización de la suspensión de los anfifilos a pH neutro .....	38
3.3 Adsorción de los anfifilos a interfase limpia agua/aire .....	39
3.4 Isotermas de compresión de monocapas de los anfifilos empleados .....	42
3.5 Conclusiones .....	43

**Capítulo 4: Caracterización de las propiedades reológicas de las membranas lipídicas modelos .....** 45

4.1 Introducción .....	45
4.2 Propiedades reológicas de las monocapas lipídicas aceptoras .....	47
4.3 Conclusiones .....	54

**Capítulo 5: Interacción de los anfifilos con monocapas lipídicas .....** 56

5.1 Introducción.....	56
5.2 Cambios en las propiedades de monocapas lipídicas con diferentes características reológicas y estados de fase luego de la incorporación de los anfifilos .....	56
5.3 Estimación de la cantidad de anfifilo incorporado en monocapas lipídicas de diferentes características reológicas .....	62
5.4 Partición preferencial de anfifilos en membranas heterogéneas por microscopía de ángulo de Brewster .....	67
5.5 Conclusiones .....	75

**Capítulo 6: Acción de los ASCn en las membranas del modelo del estrato córneo: una visión del mecanismo para mejorar la permeación de la piel.....** 77

6.1 Introducción .....	77
6.2 Los agentes potenciadores de la permeación dérmica afectan la compresibilidad de las membranas lipídicas SC .....	78
6.3 Los ASCn, así como OA, alteran la estructuración en el plano de las películas SCM ...	82
6.4 ASCn también altera las propiedades físicas de las fases coexistentes en las películas SC .....	88
6.5 Conclusiones .....	89

**Capítulo 7: Interacción de los anfifilos con bicapas lipídicas .....** 91

7.1 Introducción .....	91
7.2 Los anfifilos en estudio cambian el equilibrio de fases en bicapas lipídicas .....	94
7.3 Efecto de Psy sobre la electrostática de Superficie en Bicapas Lipídicas .....	100
7.4 Conclusiones .....	102

<b><i>Capítulo 8: Regulación de la acción de fosfolipasas sobre membranas lipídicas por HePC</i></b> .....	103
8.1 Introducción .....	103
8.2 Determinación de la actividad enzimática fosfolipasas (PLC y SMasa).....	104
8.3 Efecto de HePC en la restructuración de membrana por acción de fosfolipasa .....	106
8.3.1 PLC .....	106
8.3.2 SMasa .....	111
8.4 Conclusiones .....	115
 <b><i>Capítulo 9: Conclusiones Generales</i></b> .....	116
 <b><i>Anexos</i></b> .....	120
 <b><i>Referencias bibliográficas</i></b> .....	121
 <b><i>Listado de publicaciones realizadas</i></b> .....	131

## Abreviaturas

<b>PC:</b> fosfatidilcolina	<b>PE-Rho:</b> 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N- lisamina rodamina B sulfonilo.
<b>PE:</b> fosfatidiletanolamina	<b>SMasa:</b> Esfingomielinasa
<b>PS:</b> fosfatidilserina	<b>PLC:</b> Fosfolipasa C
<b>CHO:</b> colesterol	<b>PLD:</b> fosfolipasa D
<b>PI:</b> fosfatidilinositol	<b>ASCn:</b> esterres alquílicos del ácido L-ascórbico
<b>PG:</b> fosfatidilglicerol	<b>HePC:</b> n-hexadecilfosfocolina o Miltefosina
<b>POPC:</b> 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina	<b>Psy:</b> galactosilesfingosina o psicovina
<b>DLPC:</b> 1,2-dilaurooil-sn-glicero-3-fosfocolina	<b>ASC<sub>12</sub>:</b> laurato de ascorbilo
<b>DMPC:</b> 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina	<b>ASC<sub>14</sub>:</b> miristato de ascorbilo
<b>DPPC:</b> 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina	<b>ASC<sub>16</sub>:</b> palmitato de ascorbilo
<b>DSPC:</b> 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina	<b>OA:</b> ácido oleico
<b>DMPS:</b> 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina	<b>SL:</b> laurato de sacarosa
<b>DOPE:</b> 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	<b>IPM:</b> isopropilo miristato
<b>DOPS:</b> 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (sal de sodio)	<b>SM:</b> miristato de sacarosa;
<b>SM<sub>16</sub>:</b> N-palmitoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina	<b>Span 20:</b> laurato de sorbitán
<b>bSM:</b> Esfingomielinasa de Cerebro bovino	<b>Azone:</b> 1- dodecil-azacicloheptan-2-ona
<b>ERG:</b> Ergosterol	<b>SC:</b> estrato córneo
<b>Cer<sub>24</sub>:</b> d18: 1/24: 0) N-lignoceroil-D-eritro-esfingosina	<b>DAG:</b> diacilglicerol
<b>AL:</b> ácido lignocérico	<b>CER:</b> ceramida
<b>CHO-S:</b> sal sódica del colesterol 3- sulfato	<b>Pc:</b> parámetro geométrico de empaquetamiento crítico
<b>SULF:</b> sulfátido	<b>v:</b> volumen de las cadenas
<b>Gal-Cer:</b> galactosil ceramida	<b>lc:</b> longitud de las cadenas
<b>GANG:</b> gangliósidos totales	<b>a<sub>0</sub>:</b> sección trasversal de las cabezas polares
<b>LLC:</b> membrana compuesta por DLPC/SM <sub>16</sub> /CHO 33:33:34 (del inglés liquid-liquid coexistence)	<b>CMC:</b> concentración micelar crítica
<b>MCC:</b> membrana compuesta por POPC/SM <sub>16</sub> /CHO 25:25:50 (del inglés cholesterol containing membrane).	<b>H<sub>I</sub>:</b> estructura opuesta hexagonal
<b>SCM:</b> membrana de imitación de estrato córneo (del inglés Stratum corneum membrane)	<b>H<sub>II</sub>:</b> estructura hexagonal invertida
<b>MM:</b> membrana similar de mielina	<b>LE:</b> fase líquido expandido
	<b>LO:</b> fase líquido-ordenado
	<b>LC:</b> fase líquido condensado
	<b>S:</b> fase sólida
	<b>G:</b> fase gaseosa
	<b>L<sub>α</sub> o L<sub>d</sub>:</b> fase líquido desordenada
	<b>L<sub>β</sub>:</b> gel
	<b>SUVs:</b> vesículas unilamelares pequeñas
	<b>LUVs:</b> vesículas unilamelares grandes
	<b>MLVs:</b> vesículas multilamelares

**GUVs:** vesículas unilamelares gigantes  
**SLBs:** bicapas lipídicas soportadas  
**Cs<sup>-1</sup>:** módulo de compresibilidad  
**DCMr:** desplazamiento cuadrático medio relativo  
**BAM:** Microscopía de ángulo de Brewster  
**AFM:** microscopía de fuerza atómica  
**LB:** transferencia de Langmuir-Blodgett  
**DLS:** dispersión dinámica de la Luz  
**D:** coeficiente de difusión traslacional  
**DCE:** doble capa eléctrica  
**ζ:** zeta potencial  
**DSC:** Calorimetría Diferencial de Barrido  
**Cp:** capacidades caloríficas  
**Tm:** temperatura de transición  
**ΔHcal:** entalpía calorimétrica de la transición  
**ΔS:** entropía de transición  
**TLC:** Cromatografía en placa delgada

## *Resumen General*

Las bases fisicoquímicas que rigen el fenómeno de inserción de moléculas anfitrópicas de moderada solubilidad en agua (como los anfifilos propuestos en esta tesis) a biomembranas no están claramente dilucidadas en la actualidad. Este fenómeno es de vital importancia tanto para la acción farmacológica de una gran cantidad de fármacos como para distintos eventos que rigen la función celular. En este sentido los estudios biofísicos sobre la interacción de fármacos con membranas modelo proporcionan un método simple pero efectivo para comprender el papel de los lípidos de membrana en el transporte de fármacos y la eficiencia de sistema de liberación de fármacos a través de barreras biológicas.

En este trabajo de tesis nos propusimos estudiar los cambios que producen anfifilos relativamente solubles en soluciones acuosas sobre membranas lipídicas modelos. Planteándonos como objetivo general estudiar las diferencias en la capacidad de sistemas modelo de membranas biológicas con distintas propiedades estructurales y reológicas de incorporar moléculas anfitrópicas. Además, nos propusimos investigar los cambios inducidos sobre las propiedades biofísicas, estructurales y dinámicas de membranas aceptoras por la interacción con estos anfifilos.

Para ello empleamos una amplia de batería de compuestos lipídicos con lo que construimos estructuras autoensambladas (monocapas y bicapas) utilizadas como modelos de membrana. De modo que nos permitió el control tanto de las propiedades físicas de continuo (estado de fases, compresibilidad, fluidez, electrostática de la película, etc...) como de la microestructura de las membranas (presencia de dominios lipídicos en coexistencias de fases lateral). Para la caracterización de las membranas de los anfifilos, así como para los estudios de interacción anfifilo- membrana utilizamos diferentes técnicas que incluyeron: Balanza de Langmuir, microscopia de ángulo de Brewster (BAM), microscopia de fuerza atómica (AFM), microscopia de fluorescencia confocal, calorimetría diferencial de barrido (DSC), entre otras.

Nuestros estudios han resaltado la importancia de las propiedades estructurales y reológicas de las distintas membranas lipídicas utilizadas (estados de fase, compresibilidad, difusión lateral y presencia de dominios lipídicos) en la interacción con estas familias de anfifilos. De estos estudios surge la compresibilidad de la membrana como el principal parámetro físico que rige la incorporación de los mismos, y a su vez observándose un fuerte patrón que indica que su inserción en biomembranas resulta en películas más elásticas. Hemos visto que esta capacidad de los anfifilos estudiados de perturbar la membrana adquiere la mayor relevancia en el contexto de permeación dérmica mejorada de fármacos a través del estrato córneo (SC) en piel o en eventos relacionados con el metabolismo lipídico tanto sobre su actividad enzimática de fosfolipasas como en el efecto estructural que sus productos ejercen sobre la membrana huésped.

En general estos resultados contribuyeron a una mejor comprensión del mecanismo de interacción de estos anfifilos con membranas lipídicas. Lo cual es importante en el contexto de que estos anfifilos ejercen su acción al interaccionar con membranas biológicas. Los mismos son utilizados en tratamientos de enfermedades infecciosas desatendidas para la Argentina, como es la Leishmaniasis, para el tratamiento de cáncer o como el caso de la psicosis, involucrados en procesos de desmielinización que conllevan a alteraciones severas en el sistema nervioso central.

# Capítulo 1: Introducción

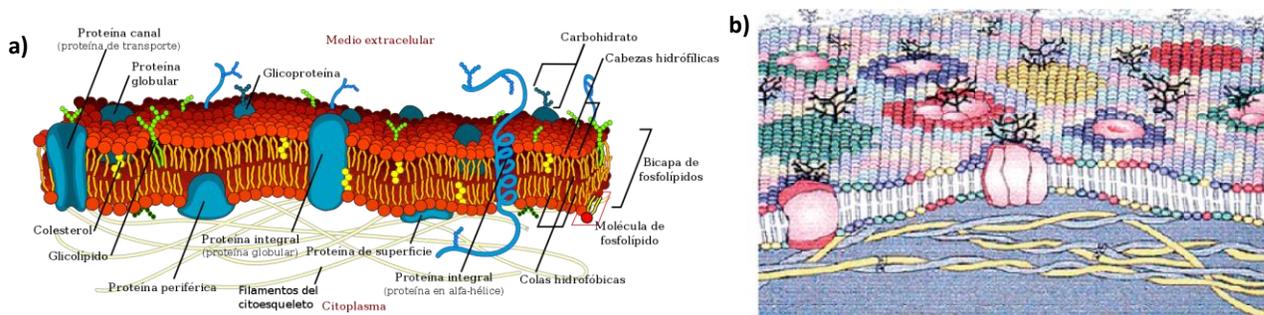
## 1.1 Modelos de membrana celular

Un modelo es un sustituto de un sistema real, es una representación sistemática de un objeto o evento en forma idealizada y abstracta. El concepto de modelo o sistema modelo es extremadamente importante en el estudio de las ciencias naturales constituyendo una herramienta esencial para facilitar la percepción de los procesos naturales complejos que acontecen en los organismos vivos<sup>1</sup>.

En la actualidad conocemos que las membranas biológicas contienen bicapas lipídicas como su unidad estructural básica. Tales bicapas forman los límites entre citoplasma intracelular y el entorno exterior de la célula, así como entre el interior de muchos de los orgánulos celulares y su citoplasma. Esta estructura de bicapa lipídica fue reconocida por primera vez como la base de la arquitectura de la membrana celular en 1925 en un estudio detallado de los lípidos. En 1972, Singer y Nicolson propusieron el modelo de mosaico fluido para explicar la estructura de la membrana <sup>2,3</sup>.

El modelo de Singer y Nicolson establece que las membranas están constituidas por una bicapa de fosfolípido en la cual están inmersos colesterol, proteínas y carbohidratos que le dan a la membrana su carácter fluido <sup>2,4,5</sup>. Esta composición estructural le permite a la membrana realizar múltiples funciones como reconocimiento molecular, catálisis enzimática, adhesión celular y fusión de membranas. Uno de los puntos más relevantes de este modelo es la introducción de aspectos dinámicos en membranas por ejemplo difusión de moléculas en el plano de la membrana y entre hemicapas (flip flop). Estas importantes propiedades no habían sido consideradas en ninguno de los modelos que le precedieron. Además el modelo introdujo una descripción más apropiada de las proteínas asociadas a la membrana <sup>1</sup>. Sin embargo, la principal limitación que tuvo este modelo fue que le otorgó muy poca significancia a la gran diversidad química de los lípidos observada en sistemas celulares.

En varias oportunidades han surgido refinamientos del modelo del mosaico fluido, generalmente inspirados en nuevas observaciones experimentales o cálculos teóricos enfocados en algunos aspectos específicos de las membranas. Un ejemplo es el modelo de J. Israelachvili, el cual considera la necesidad de las proteínas de membrana y los lípidos que la rodean de ajustarse geoméricamente unos a otros <sup>6</sup>. Este modelo también incorpora los conceptos de plegamiento de la membrana, formación de poros y variaciones de espesor de la membrana, como así también algún grado de heterogeneidad lateral. Otro refinamiento del modelo de Singer y Nicolson es el propuesto por E. Sackmann en 1995 <sup>1,7</sup> en el que se enfatiza la importancia de la interacción de la membrana con el citoesqueleto y glicocáliz celular. La evolución más importante de este modelo ocurrió en 1997 con los trabajos de Simons y col y de Brown y col quienes propusieron que los lípidos de la membrana se organizaran en microdominios separados en fases, llamados balsas lipídicas, con una composición y dinámica local diferentes de la fase cristalina líquida circundante <sup>8</sup>. La validez de esta hipótesis ha sido un tema acaloradamente debatido durante más de una década, pero desde entonces muchos investigadores han encontrado y desarrollado tecnologías para la detección de heterogeneidad lateral en membranas biológicas <sup>4,9</sup>. En la Fig1.1 se ilustran el modelo del mosaico fluido y el esquema de una membrana celular, mostrando la complejidad de la composición.



**Figura 1.1:** Esquemas representativos de modelos de membrana celular. Figura del Modelo de Mosaico Fluido propuesto Singer y Nicolson, tomado de Ref<sup>10</sup> (a). Esta representación de una membrana celular muestra la asimetría de los lípidos de la membrana y los microdominios enriquecidos en los lípidos en particular y aquellos inducidos por las proteínas de la membrana (b) , tomado de Ref <sup>3</sup>.

## 1.2 Composición lipídica de la membrana.

Las membranas biológicas tienen composiciones complejas y variadas de lípidos y proteínas que hacen que la determinación exacta de su composición en una célula sea bastante difícil. Dicho esto, sus componentes primarios están bien establecidos. Los componentes principales de las membranas biológicas son los lípidos. Todas las membranas biológicas contienen bicapas lipídicas como su unidad estructural base. Las bicapas lipídicas son conjuntos en forma de lámina de miles de moléculas lipídicas anfifílicas estabilizadas por interacciones de van der Waals entre sus cadenas de acilo.

Los lípidos son moléculas anfifílicas; que contienen una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica, que existen en la naturaleza y que componen las membranas celulares. La parte hidrofílica está compuesta por una variedad de estructuras químicas (cabezas polares) (Fig 1.2A). La parte hidrofóbica está compuesta de cadenas hidrocarbonadas (llamadas alifáticas) de diferente longitud. El grupo polar permite clasificar los lípidos y junto con el grado de insaturación de las cadenas así como su longitud definen su comportamiento termodinámico. Los lípidos de membrana se pueden dividir en tres grupos según su estructura química: lípidos a base de glicerol (glicerofosfolípidos), esfingolípidos a base de ceramida y esteroides (Fig 1.2B). Los fosfolípidos a su vez, se dividen en diferentes grupos basados en su cabeza polar hidrofílica: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS) son los lípidos predominantes en la membrana celular, mientras que el fosfatidilinositol y la cardiolipina están presentes en pequeñas cantidades. Los esfingolípidos tienen una base esfingoide como esqueleto estructural.

El colesterol (CHO) tiene un grupo hidroxilo que le permite interactuar con la cabeza polar hidrofílica de los fosfolípidos, y los grupos esteroides interactúan con las cadenas acílicas hidrófobas de los lípidos. Estas interacciones influyen en la fluidez y empaquetamiento de la membrana lipídica<sup>3,11</sup>. Su estructura inmoviliza a las cadenas vecinas dando rigidez a la bicapa formada por fosfolípidos insaturados, mientras que en presencia de fosfolípidos saturados aumenta su fluidez. El CHO abunda en las membranas de los organismos superiores,

especialmente en las membranas plasmáticas, mientras que en otros organismos están presentes otros compuestos similares que cumplen una función comparable. El núcleo esteroide rígido se orienta en la bicapa, con su grupo hidroxilo formando puentes de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonilo del ácido graso del fosfolípido adyacente.

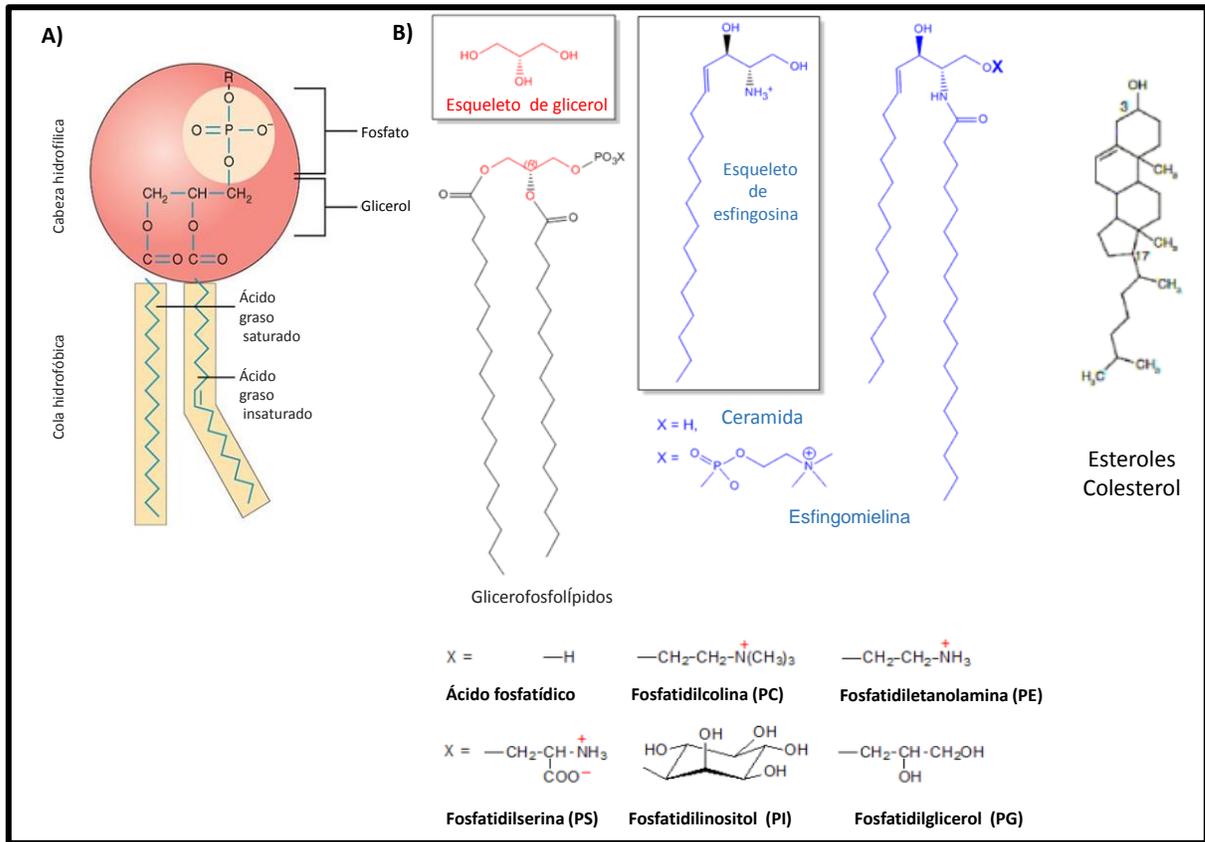


Figura 1.2: Representación de la estructura de un fosfolípido (A). Clasificación de los lípidos en base a estructura química (B).

### 1.3 Fluidez de membranas lipídicas

La fluidez es uno de los principales atributos de las membranas biológicas, esencial para el mantenimiento de una distribución apropiada de lípidos y una difusión adecuada de las proteínas de membrana en la bicapa; dos aspectos moleculares fundamentales para el funcionamiento de la membrana celular.<sup>12</sup> De manera general la fluidez de la membrana debe mantenerse dentro de un cierto rango para que la célula funcione correctamente. Hay una serie de factores que modulan la fluidez de la membrana entre ellos: La longitud o grado de

insaturación de la cola hidrocarbonada de los ácidos grasos; la temperatura y como mencionamos en la sección anterior, el contenido de colesterol.

En muchos trabajos se ha relacionado el concepto "fluidez de membrana" generalmente a una alta movilidad molecular dentro de la bicapa lipídica <sup>13</sup> ( fluidez lipídica promedio de la región hidrocarbonada de los fosfolípidos). Un término operacional útil para la evaluación cuantitativa de la fluidez de la membrana es el término "microviscosidad". Este término se deriva de las mediciones de polarización de fluorescencia de la difusión rotacional de una sonda fluorescente ubicada en la región analizada. Sin embargo, este método tiene sus limitaciones y muchos valores de microviscosidad de membrana medidos con diferentes fluoróforos dependen a menudo de las propiedades moleculares de la sonda. Generalmente, cuando el fluoróforo requiere un gran volumen para el movimiento, ya sea para la formación del estado excitado o la desexcitación no radiactiva, se obtiene una amplia gama de valores de microviscosidad. Además se ha sugerido que sondas grandes puede causar distorsión de la bicapa de membrana <sup>14</sup> .

En los último años con el empleo de técnicas de microreología: seguimiento de partícula única, pinzas ópticas o magnéticas <sup>15,16</sup>; se ha contribuido a la creación de la imagen moderna de las membranas biológicas, como sistemas complejos que no solo son capaces de desarrollar flujo viscoso bajo el movimiento de proteínas , sino también lo suficientemente rígidas para proporcionar una adecuada resiliencia mecánica contra los esfuerzos externos, contribuyendo así con la estabilidad mecánica de la membrana.

En esta tesis cuantificamos la fluidez de nuestros sistemas de membranas lipídicas mediante medidas de coeficientes de difusión lateral empleando seguimiento de partícula única.

#### 1.4 Autoensamblaje, factores de empaquetamiento y morfología de los agregados.

Gracias a su carácter anfifílico, los lípidos tienden a autoensamblarse en diferentes estructuras macromoleculares cuando se disponen en disolución acuosa. La morfología de los agregados dependerá tanto de las características moleculares de los lípidos (estructura química y geometría del anfifilo), temperatura, así como del medio acuoso donde están disueltos <sup>17,18</sup>.

El agua forma una red de puentes de hidrógeno que se verá afectada al introducir un soluto polar o no polar. Cuando una molécula anfifílica (y en particular un lípido) se sumerge en agua, producirá una reorganización local de las moléculas de agua que se orientarán para maximizar las interacciones puente de H formando una “caja de solvente”. Sin embargo, estas interacciones en torno a la molécula no polar son más estructuradas con respecto a las que se forman normalmente en el seno de la solución. El ordenamiento del agua tiene un alto costo entrópico en la energía del sistema que, cuando no es compensado entálpicamente., el sistema tenderá a segregar al soluto hidrofóbico en una fase para minimizar la superficie apolar accesible al solvente y por ende, el ordenamiento del agua <sup>1,19</sup>. Al mismo tiempo, la parte hidrofílica va a experimentar una interacción favorable con el agua. La ganancia entrópica proveniente de la autoagregación de las moléculas no polares se conoce como efecto hidrofóbico.

Los lípidos segregados de la fase acuosa por efecto hidrofóbico se autoensamblan en respuesta a las interacciones intermoleculares establecidas entre ellos. Estas fuerzas son la sumatoria de interacciones débiles que producen un efecto general que es lo suficientemente fuerte como para sostener diferentes moléculas anfifílicas asociadas, así como para asegurar su estabilidad en solución. Las principales fuerzas débiles (no covalentes) que actúan en el autoensamblaje de los anfifilos son enlaces de hidrógeno, interacción electrostática y fuerzas de van der Waals <sup>18</sup>. Las moléculas van a formar ensamblados moleculares en razón de estas interacciones, pero hay varias configuraciones posibles. La geometría efectiva de una molécula de lípido está determinada por la relación entre las dimensiones de la cabeza polar y el tamaño de su cola hidrofóbica. En base a estos parámetros moleculares Israelachvili, desarrolló un

modelo sencillo que permite predecir la forma de agregación de un lípido en disolución acuosa a partir de un parámetro geométrico de empaquetamiento crítico adimensional ( $P_c$ ) que se define como:

$$P_c = \frac{v}{a_0 \cdot l_c} \quad (\text{Ec. 1.1})$$

Donde  $v$  es el volumen de las cadenas,  $l_c$  la longitud de las cadenas, y  $a_0$  la sección transversal de las cabezas polares. El valor de  $P_c$  determina el empaquetamiento óptimo que debe tener la estructura del agregado para que éste sea termodinámicamente favorable. La Fig 1.3 pone de manifiesto las distintas estructuras de membranas en relación con el valor del parámetro de empaquetamiento crítico.

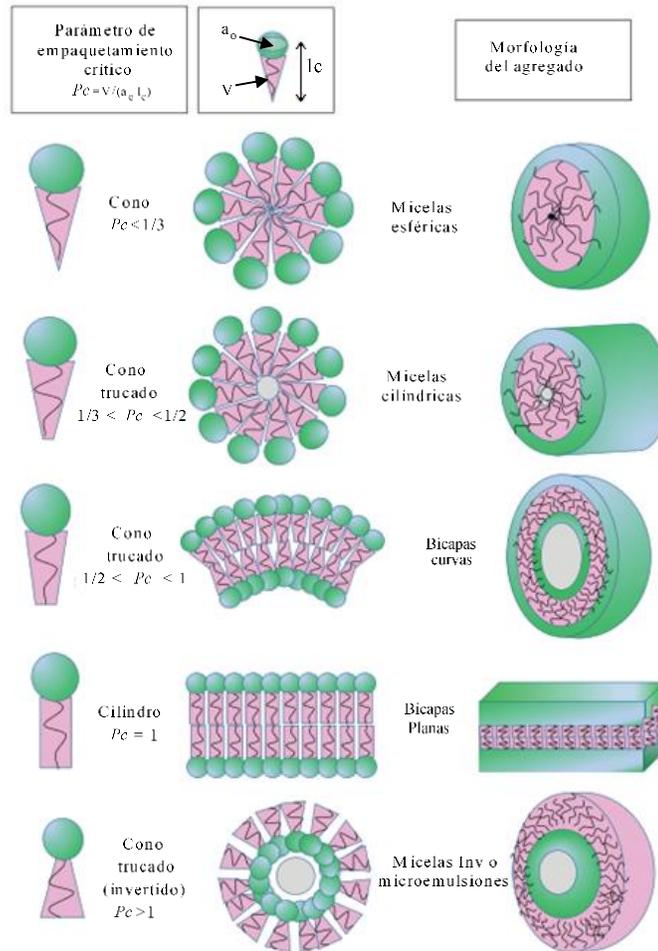


Figura 1.3: Factores de forma de anfífilos y resumen de las estructuras agregadas que se pueden predecir a partir del parámetro de empaquetamiento crítico ( $P_c$ ). Esquema adaptado de Ref 18 .

Las moléculas anfifílicas que cumplan con una  $Pc < 1/3$ , inducen a la aparición de una estructura multimolecular denominada micela en solución acuosa a partir de una concentración, llamada concentración micelar crítica (CMC) como resultado del agregado de varias moléculas de anfifilo (Fig 1.3). De modo que la CMC se puede definir como la concentración de monómero lipídico a la cual comienzan a aparecer en el equilibrio cantidades apreciables ( $> 5\%$  del total) de agregados micelares:  $nM \leftrightarrow Mn^{20}$ .

Un análisis de las geometrías moleculares de los lípidos nos permite clasificarlos mediante su curvatura espontánea (Fig 1.4). Los lípidos con forma cilíndrica ( $Pc \sim 1$ ) favorecen la formación de bicapas planas, es decir con curvatura nula. A medida que  $Pc$  se desvía de la unidad sugiere la formación de estructuras no lamelares. Valores de  $Pc > 1$  corresponde a aquellos lípidos con cadenas hidrocarbonadas voluminosas en comparación con su cabeza polar y favorecen curvaturas negativas, mientras que lípidos con forma del tipo cónico y  $Pc < 1$  presentan cabezas polares grandes que favorecen curvaturas positivas, incluida la micelar.

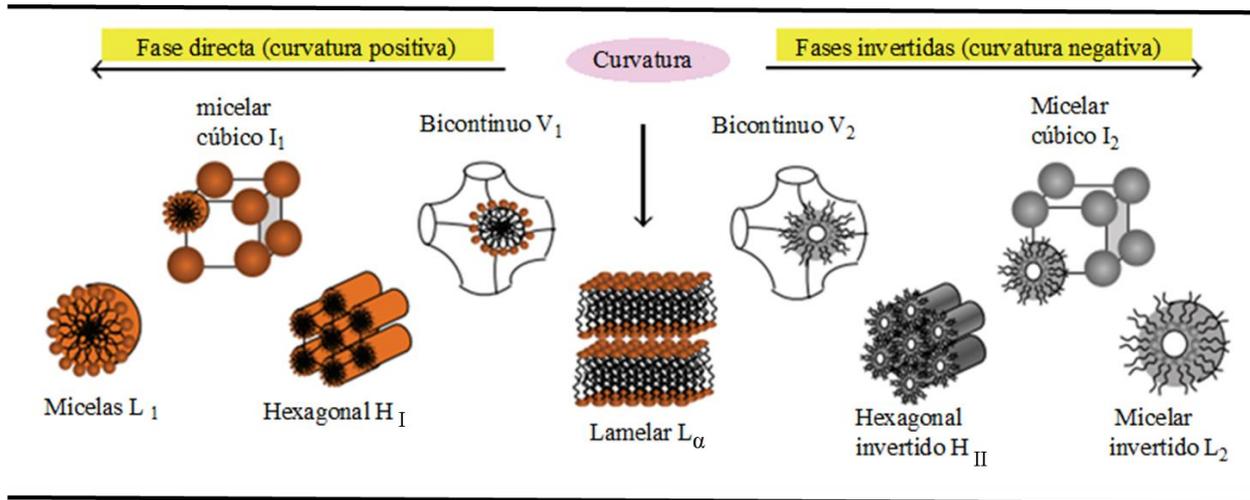


Figura 1.4: Representación esquemática de una progresión típica de fases en función de la concentración para un anfifilo disuelto en un disolvente selectivo. Figura tomada de Ref<sup>18</sup>.

Una estructura particularmente interesante es la llamada estructura hexagonal invertida ( $H_{II}$ ) (Fig 1.4) la cual se caracteriza por la presencia de agregados lipídicos dispuestos en forma tubular (cilíndrica) y que contienen agua en su interior. La estructura opuesta hexagonal ( $H_I$ ), no es muy común excepto en sistemas que contengan lípidos de carácter muy polar o en

aquellos que contengan lípidos con cabezas polares grandes como en el caso de lisofosfolípidos<sup>1</sup>. Además existen varios tipos de estructuras cúbicas que, comparadas con las fases lamelares y hexagonales presentan mucha mayor complejidad y se caracterizan por mostrar continuidad tanto en la fase acuosa como la membrana (Fig 1.4). La incorporación de sustancias hidrofóbicas o moléculas anfifílicas tales como hidrocarburos, alcoholes detergentes u otros compuestos químicos (fármacos) pueden desplazar el equilibrio entre las distintas estructuras. Por ejemplo los monoacilglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, alcanos y ácidos grasos pueden favorecer estructuras  $H_{II}$ , los detergentes, lisofosfatidilcolina y ciertos péptidos antivirales inhiben su formación.

La propensión a formar estructuras no lamelares, como estados latentes en una membrana permite generar un estrés de curvatura. Esto último puede ser ocasionado por la acción de enzimas específicas en la bicapa, cambiando por ejemplo una determinada especie lipídica con propensión a formar una fase lamelar en otra que se "acomoda" mejor en una fase  $H_{II}$ .

Cuando una bicapa contiene monocapas con curvatura espontánea distinta de cero, se dice que la membrana sufre una "frustración" a la cual se le denomina estrés de curvatura. Si las curvaturas espontáneas de sus dos monocapas son diferentes, la bicapa se vuelve asimétrica y asume una curvatura espontánea distinta de cero. Si las fuerzas de cohesión de la bicapa no pueden soportar el estrés producido por la curvatura espontánea, la bicapa adopta estructuras no lamelares como las que se muestran en la Fig 1.4. La capacidad que muestran estas estructuras de cambiar de forma de agregación sin cambiar su composición se denomina *polimorfismo lipídico*<sup>1</sup>.

Las bicapas lipídicas se pueden ordenar en dos grupos principales teniendo en cuenta el contenido de agua y el estado de las cadenas. Hablamos por tanto de fases con propiedades "sólidas" y fases con propiedades "fluidas".

Una transición de fase, dentro de la estructura lamelar se define como el paso de una fase a otra por un cambio de parámetros termodinámicos, como la temperatura por ejemplo. Se puede construir un diagrama de fase teórico en función de la temperatura comportamiento

termotrópico) y el contenido de agua (comportamiento liotrópico). Así, a bajas temperaturas los fosfolípidos se organizan en lamelas cuyas cadenas están principalmente en su conformación más 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  $L\beta$  o gel. 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 debilitan. Esta fase llamada  $L\alpha$  muestra una mayor difusión en el plano de la lamela, mayores áreas por molécula y menor espesor de las lamelas <sup>21</sup>. En esta tesis se empleará en monocapas la fase  $L_d$  (líquido desordenada) en analogía a la fase  $L\alpha$  encontrada en bicapas.

Desde un punto de vista biológico, las fases lamelares fluidas son muy importantes. Los organismos vivos mantienen en promedio este estado fluido en casi todas sus membranas. Dado que la célula es una estructura dinámica, parece razonable que la célula necesite una membrana donde lípidos y proteínas pueden moverse con el fin de realizar sus funciones, sin ningún tipo de limitación mecánica. Otras fases no lamelares, hexagonales, permiten el desarrollo de ciertos procesos transitorios (tales como fusión de membranas) donde la reorganización de los lípidos es diferente a la de la fase lamelar.

## 1.5 Sistemas modelo en estudio

Debido a la complejidad de las membranas celulares y a la dificultad de aislarlas en su contexto nativo; con frecuencia se utilizan membranas artificiales que tienen estructuras y composición simplificadas, como modelo de membrana biológica. Es importante mencionar que estos modelos de membrana también presentan sus limitaciones como por el ejemplo: pueden involucrar pocas especies lipídicas en comparación con la gran variedad que existen en membranas reales; es difícil imitar la asimetría de los lípidos en las bicapas y no tienen en cuenta otros componentes como las proteínas, o componentes del citoesqueleto que regulan la difusión de lípidos y proteínas a través de la membrana.

A pesar de estas limitaciones los estudios basados en modelos, han demostrado ser muy útiles para comprender las propiedades biofísicas básicas de membranas biológicas. Proporcionan una base sobre la cual se pueden generar nuevas hipótesis a probar en células vivas <sup>5</sup>. Los estudios biofísicos sobre la interacción de fármacos con membranas modelo podrían proporcionar un método simple pero efectivo para comprender el papel de los lípidos de membrana en el transporte de fármacos y la eficiencia de sistema de liberación de fármacos a través de barreras biológicas. Una mejor comprensión de estos mecanismos podría fomentar el descubrimiento y desarrollo de fármacos, así como favorecer el desarrollo de sistemas de administración de fármacos más eficientes.

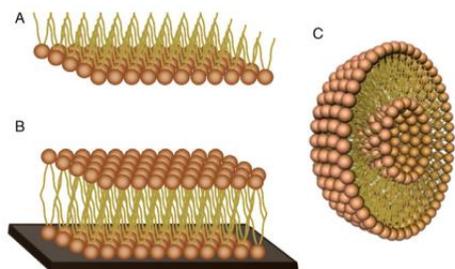
Los sistemas biomiméticos más conocidos y comunes utilizados para tales fines son las monocapas lipídicas, vesículas lipídicas y bicapas lipídicas soportadas (Fig 1.5). Si bien cada uno de estos sistemas presenta ventajas y desventajas, todos aportan diferentes elementos para interpretar la disposición lipídica de las membranas celulares naturales.

La estructura más simple utilizada en esta tesis se denomina monocapa lipídica, la cual corresponde a una película monomolecular de lípidos que se forman esparciendo moléculas anfipáticas sobre la superficie de un líquido. Provee un modelo simple para evaluar la inserción de compuestos en la membrana y las interacciones lípido-lípido cambiando parámetros tales como la naturaleza y el empaquetamiento de las moléculas diseminadas, la composición de la subfase (pH, fuerza iónica) y la temperatura ( Fig 1.5a).

Por otro lado, la bicapa lipídica (Fig 1.5b) se puede describir como dos monocapas (o hemicapas) lipídicas interaccionando entre sí por la parte de la cadena hidrocarbonada. Generalmente las bicapas lipídicas pueden organizarse en arreglos de multicapas, denominadas estructuras multilamelares. Si imaginamos ahora una bicapa plana en medio acuoso y teniendo en cuenta el efecto hidrofóbico, es evidente que la bicapa plana conectará sus extremos laterales formando un arreglo cerrado. Este tipo de estructuras se denominan vesículas (o liposomas) unilamelares y multilamelares (Fig 1.5 c). Un liposoma unilamelar está constituido por una sola bicapa y representa el modelo artificial más simple de una membrana celular. Son estructuras cuasiesféricas con un compartimento interno acuoso y se puede formar

en diferentes tamaños, pequeñas vesículas unilamelares, 20-50 nm de diámetro (SUV), grande vesículas unilamelares (100-500 nm de diámetro, LUV) y vesículas unilamelares gigantes de 10-100  $\mu\text{m}$  de diámetro (GUVs).

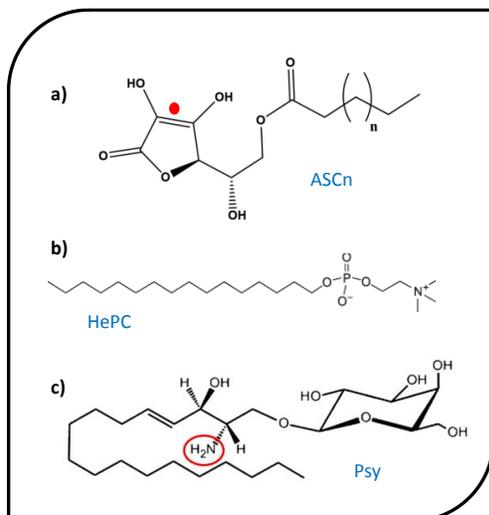
Las GUVs han sido empleadas para determinar el comportamiento de fase de mezclas de lípidos binarias y ternarias en bicapas. La separación de fases a menudo se visualiza mediante la partición de las sondas fluorescentes en la fase líquido desordenada (Ld) <sup>22</sup>. Otro modelo de membrana artificial ampliamente utilizado son las monocapas o bicapas lipídicas soportadas (SLBs), las cuales se forman típicamente mediante fusión de vesículas o transferencia de Langmuir a una superficie adecuada. Los SLBs ofrecen muchas ventajas, incluida la facilidad de preparación, la estabilidad, el diseño y la disponibilidad de una amplia variedad de técnicas sensibles a la caracterización de superficie <sup>23</sup>.



**Figura 1.5:** Representación esquemática de los modelos de membrana descritos en el texto: monocapa lipídica (A), bicapa lipídica soportada (B) y liposoma (C). Esquema tomado de la Ref <sup>24</sup>.

### 1.6 Anfifilos estudiados: Importancia biológica e interés farmacológico.

Los anfifilos estudiados en esta tesis pertenecen a las familias de los ésteres alquílicos del ácido L-ascórbico (ASCn) (Fig 1.6 a), alquilfosfolinas como la Miltefosina (HePC) (Fig 1.6b) y esfingolípidos de simple cadena, Psicossina (Psy) (Fig 1.6 c).



**Figura 1.6:** Estructura molecular de los fármacos a estudiar. a) Ésteres alquílicos del ácido L-ascórbico según presente una cadena hidrocarbonada de 16, 14 o 12 átomos de carbono (ASCn). El grupo C3-OH ionizable del grupo ascórbico (con pKa = 4.2) se encuentra resaltado; b) miltefosina o n-hexadecilfosfocolina (HePC) y c)  $\beta$ -galactosilesfingosina o psicosisina (Psy). El grupo amina ionizable con un pKa = 7.18 está resaltado.

El ácido L-ascórbico (vitamina C) se ha estudiado y utilizado ampliamente como un potente antioxidante, soluble en agua, que protege eficazmente las moléculas biológicas contra la degradación oxidativa. Sin embargo, debido a su escasa solubilidad en medios hidrófobos, su utilidad se limita a los ambientes acuosos. Una estrategia para superar esta limitación ha sido la generación de derivados anfifílicos, como los ésteres alquílicos del ácido L-ascórbico (ASCn), que mantienen el carácter antioxidante del ácido ascórbico y particionan en medios no polares<sup>25,26</sup>. Otra ventaja del carácter anfipático de la ASCn es su capacidad para formar agregados en soluciones acuosas o para integrarse en membranas lipídicas<sup>27-29</sup>, proporcionando un ambiente adecuado para el almacenamiento y transporte de sustancias hidrófobas susceptibles de oxidación. De hecho, algunos ASCn tales como el laurato de ascorbilo (ASC<sub>12</sub>), miristato de ascorbilo (ASC<sub>14</sub>) y palmitato de ascorbilo, (ASC<sub>16</sub>) se auto-organizan como coageles a una relación ASCn / agua relativamente alta<sup>26</sup>. Estas suspensiones acuosas de los ASCn, incrementan la solubilidad cuando se les administra calor por encima de la Temperatura Micelar Crítica (TMC). La solución resultante por enfriamiento da lugar a la formación de una estructura cristalina semisólida denominada en forma general coagel. Dichas estructuras presentan distintas propiedades físico-químicas y reológicas, dependiendo del largo de la cadena alquílica, de su concentración y de la temperatura<sup>30</sup>.

Todas estas características hacen de los ASCn una herramienta prometedora como vehículos de fármacos para formulaciones farmacéuticas. Por ejemplo, ASC<sub>12</sub>, que entre los fármacos estudiados en este trabajo contiene la cadena alquílica más corta, mejora la permeación oftalmológica de otros fármacos hidrófobos<sup>31</sup>. Por otro lado, el coagel formado por ASC<sub>16</sub> actúa como un buen adyuvante en la inmunización en modelos animales<sup>32</sup>, presumiblemente debido a alguna actividad inflamatoria de tipo citotóxica. Además, se ha informado recientemente de que algunos miembros de esta familia de fármacos muestran acción bactericida, antitumoral y contra la leishmania<sup>33</sup>. Todas estas aplicaciones implican indirectamente la interacción de los ASCn con las membranas biológicas, la cual constituye la primera barrera celular. A partir de los datos bibliográficos mencionados resaltamos que la longitud de la cadena alquílica (que actúa como la cola hidrófoba) de los compuestos ASCn regulan sutilmente la eficacia de esas aplicaciones farmacológicas.

Por su parte, la HePC actualmente es utilizada como citotóxico para tratamientos antitumorales o contra enfermedades como la leishmaniasis<sup>34</sup>. HePC es utilizada en tratamiento sistémico contra la forma cutánea de leishmaniasis,<sup>35</sup> sin embargo es urgente la implementación de nuevos tratamientos más cortos y eficaces. El mecanismo de acción de este compuesto, aunque no completamente dilucidado, está relacionado a la disfunción de la homeostasis lipídica<sup>36-38</sup> y de la señalización celular mediada por lípidos;<sup>39,40</sup> en eventos celulares que involucran la acción de fosfolipasas y otras enzimas que actúan sobre membranas, lo que sugiere una partición y acumulación en biomembranas. Es notable el hallazgo de que *in vivo* este fármaco actúa selectivamente sobre células cancerígenas con poco efecto sobre células normales, lo cual plantea la incógnita de cuál serían las bases de la selectividad de este fármaco a su incorporación en distintos tipos de membranas.

Por otro lado, la Psy es un esfingolípido de cadena única con un grupo catiónico, que se degrada en el lumen del lisosoma por la  $\beta$ -galactosilceramidasa durante la biosíntesis de los esfingolípidos. Una deficiencia de esta actividad enzimática resulta en la acumulación progresiva de Psy, de 10 a 100 veces por encima de su concentración normal<sup>41</sup>, siendo responsable de la llamada leucodistrofia de células globoides o enfermedad de Krabbe.

Este es un trastorno autosómico hereditario que conduce a la desmielinización, la infiltración de macrófagos en el parénquima cerebral y muerte <sup>42</sup>. Psy es un glicolípido altamente citotóxico en el rango de 20 a 50  $\mu\text{M}$  <sup>43</sup>. Su mecanismo de toxicidad parece ocurrir a través de factores pleiotrópicos, incluyendo disfunciones en varias vías metabólicas <sup>44</sup>. Existe evidencia de que esta molécula anfifílica ejerce su efecto patológico al integrarse en membranas y afectar su función. También se sabe que el Psy es hemolítico <sup>44</sup> e induce la permeabilización de liposomas <sup>43</sup>.

Es importante señalar que la Psy muestra un pKa de 7.18 <sup>45</sup>, lo que indica que, en su entorno natural, el lumen lisosomal ácido, Psy está principalmente en forma catiónica. Sin embargo, en la enfermedad de Krabbe, Psy está presente en altas concentraciones y escapa de la luz del lisosoma para acumularse en espacios extralisosomales, como el citoplasma o el medio extracelular, a un pH cercano a la neutralidad ( $\sim 7.4$ ). A este pH la Psy solo está parcialmente cargado y en esa condición sus propiedades difieren en comparación con el estado completamente cargado, pudiendo prevalecer un carácter más parecido a los lípidos mayoritarios.

De manera general estos anfifilos presentan moderada solubilidad en agua y ejercen su acción interaccionando con membranas. Los mismos son utilizados en tratamientos de enfermedades infecciosas desatendidas para la Argentina, como es la Leishmaniosis y el Chagas, para el tratamiento de cáncer o como el caso de la Psy involucrados en procesos de desmielinización que conllevan a alteraciones severas en el sistema nervioso central.

## 1.7 Hipótesis y Objetivos

A diferencia de la selección de fármacos para lograr interacción específica con receptores proteicos, los compuestos que interaccionan con membranas biológicas pocas veces lo hacen a través de interacciones específicas de alta afinidad, sino como una sumatoria de interacciones débiles y factores entrópicos que conllevan a su función. Esta nueva perspectiva en la búsqueda de anfifilos con interés farmacológico debe nutrirse sin duda del estudio de modelos artificiales

en condiciones de extremo control de sus componentes resuelto tanto en el espacio, como en el tiempo.

Nuestra hipótesis de trabajo en esta tesis se basa en que la incorporación de anfifilos a membranas biológicas es la primera condición para una selección y/o uso racional de nuevos compuestos con características deseadas para una determinada función farmacológica.

En esta tesis nos permitimos plantear el estudio de los cambios que producen moléculas relativamente solubles en soluciones acuosas, como lo son una gran variedad de fármacos anfifílicos, sobre membranas biológicas<sup>27,46,47</sup>. De esta forma focalizamos nuestra atención en los fenómenos físicos que rigen la estructura y función de autoensamblados supramoleculares de biomoléculas. Tanto desde nuestra experiencia como de otros grupos que trabajan en el área de la interacción fármaco-membranas, se evidencia que las propiedades de una membrana compleja no pueden resumirse como la suma de las propiedades de sus componentes químicos, sino que posee propiedades emergentes que deben estudiarse y comprenderse en escala meso y nanométrica, bajo conceptos de materia blanda.

Si tenemos en cuenta que en el entorno biológico la densidad de macromoléculas y estructuras autoorganizadas es tal que poca agua se encuentra en condiciones de “agua libre” no es de extrañar que la interacción de moléculas de moderada solubilidad en soluciones acuosas (como fármacos anfifílicos) con las superficies hidrofóbicas que ofrecen las membranas biológicas sea determinante de una extensa cantidad de procesos importantes tanto para la función celular como para el reconocimiento e incorporación de moléculas circulantes en tejidos celulares.

En este contexto, la presente tesis responde a este enfoque y propone como objetivos generales: Estudiar las diferencias en la capacidad de sistemas modelo de membranas biológicas con distintas propiedades estructurales y reológicas de incorporar moléculas anfitrópicas. Además propone investigar los cambios inducidos sobre las propiedades biofísicas, estructurales y dinámicas de membranasceptoras por la interacción con estos anfifilos.

Nos planteamos como objetivos específicos:

- ✓ La caracterización fisicoquímica de las propiedades de superficie de los anfifilos derivados del ácido ascórbico (ASCn), familias de las alquilfosfolinas (HePC) y  $\beta$ -galactosilesfingosina o Psicosisina (Psy).
- ✓ La caracterización de las propiedades reológicas de las membranas lipídicas aceptoras.
- ✓ Evaluar la interacción de ASCn, HePC y Psy con monocapas y bicapas lipídicas modelos.
- ✓ Investigar el mecanismo por el cual algunos fármacos anfifílicos inducen la permeación dérmica facilitada, utilizando membranas modelo.
- ✓ Evaluar el efecto que HePC ejerce sobre la restructuración de membrana inducida por la acción de fosfolipasas.

## Capítulo 2: Materiales y métodos

### 2.1 Materiales utilizados

En este trabajo de Tesis se utilizaron los siguientes lípidos: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (**POPC**), 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (**DLPC**), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (**DMPC**), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (**DPPC**), 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (**DSPC**), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (**DMPS**), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (**DOPE**), 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (sal de sodio) (**DOPS**), N-palmitoil-D-eritro-esfingosilfosforilcolina (**SM<sub>16</sub>**), Esfingomielina de Cerebro bovino (**bSM**), Colesterol (**CHO**), Ergosterol (**ERG**), d18: 1/24: 0) N-lignoceroil-D-eritro-esfingosina (**Cer<sub>24</sub>**) los cuales fueron comprados en Avanti Polar Lipids (Alabama, USA). El ácido lignocérico (**AL**) y la sal sódica del colesterol 3- sulfato (**CHO-S**), así como las microesferas de poliestireno (3µm de diámetro LB30) fueron comprados en Sigma- Aldrich (St. Louis, USA). El sulfátido (**SULF**), galactosilceramida (**Gal-Cer**) y los gangliósidos totales (**GANG**) se purificaron a partir de cerebro bovino como se informó en la Ref.<sup>48</sup> y todos fueron generosamente proporcionados por el Dr. Bruno Maggio.

Las monocapas mezclas empleadas fueron: membranas binarias aniónicas conteniendo **DMPC/DMPS 70:30**; membranas conteniendo CHO que mostraron coexistencia de fases líquidas (líquido expandido (LE)- líquido-ordenado (LO)), compuesta por DLPC/SM<sub>16</sub>/CHO 33:33:34 (**LLC** del inglés liquid-liquid coexistence) o POPC/SM<sub>16</sub>/CHO 25:25:50 (**MCC** del inglés colesterol containing membrane) y la membrana que imita estrato córneo compuesta de Cer<sub>24</sub> /AL/CHO 33: 33: 33 con la adición de 5% m/ m de CHO-S (**SCM**). Además fue incluida una mezcla compleja de lípidos que simula la mielina que se eligió para ajustarse a los datos bibliográficos reportados por Oliveira y col de la siguiente manera: CHO 38% en moles; POPC 7% en moles; DOPE 19% en moles; DOPS 6% en moles; bSM 10% en moles; SULF, 5% en moles; Gal-Cer 15% en moles y GANG 1 mol% (**MM**).<sup>49,50</sup> Las soluciones de lípidos puros y mezclas

utilizadas en esta tesis se solubilizaron en cloroformo: metanol 2:1 a una concentración de aproximadamente  $1 \text{ nmol}\mu\text{L}^{-1}$ .

Los anfifilos propuestos para estudiar su interacción con membranas modelos utilizados fueron: **ASC<sub>16</sub>** el cual fue comprado a Sigma Aldrich y luego exhaustivamente purificado como se describe en la Ref <sup>27</sup> o **ASC<sub>14</sub>** y **ASC<sub>12</sub>**, los cuales fueron sintetizados en el departamento de Química Orgánica- FCQ y purificados como se describe en la Ref <sup>27</sup>. HePC fue comprado a Sigma y Psy adquirida en Avanti Polar Lipids.

Todos los demás reactivos como Cloroformo, Metanol, Ácido acético, Cloruro de Sodio (NaCl), Tris- Base fueron comprados en Merck (Darmstadt, Alemania) y el Hexano y Éter de petróleo a Sintorgan (Argentina). Todos fueron de grado analítico (99% Puro) y usados sin purificación adicional. El agua fue purificada por un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) para producir un producto con una resistividad de  $\sim 18.5 \text{ M}\Omega$ .

Para los estudios de fluorescencia se utilizó la sonda fluorescente: 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N- lisamina rodamina B sulfonilo) (PE-Rho) adquirida de Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabama, EE. UU. A).

Para los estudios de Actividad enzimática las enzimas empleadas fueron Esfingomielinasa (**SMasa**) de *Bacillus cereus* (EC 3.1.4.12) (en solución) y Fosfolipasa C (**PLC**) de páncreas porcino (EC 3.1.1.4). Ambas se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

## **2.2 Monocapas lipídicas como modelos de membranas y estrategias experimentales empleadas.**

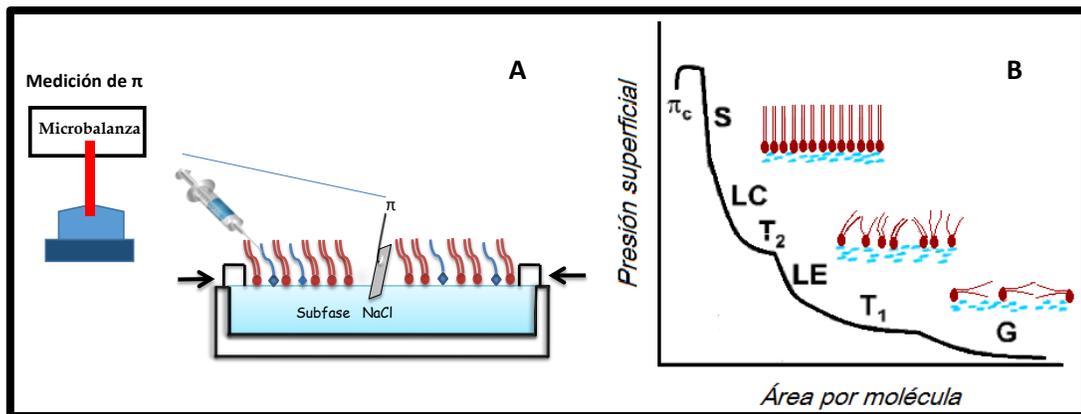
### **2.2.1 Monocapas de Langmuir en interfase agua- aire. Isotermas de compresión**

Una monocapa de Langmuir es una película monomolecular formada por moléculas anfifílicas, las cuales son atrapadas en la interfase agua/aire. Esta monocapa es formada depositando sobre la superficie de una solución acuosa (subfase), pequeñas gotas de una solución clorofórmica de lípidos (con ayuda de una microjeringa). Esta solución rápidamente se evapora induciendo la auto-organización de los anfifilos en la interfase.

Al ubicarse en la interfase agua-aire, los lípidos se comportan como surfactantes, ya que producen una disminución de la energía libre de superficie cuantificada como una disminución de la tensión superficial,  $\gamma$ . Medimos experimentalmente la diferencia en la  $\gamma$  de la interface limpia con respecto a la superficie cubierta con la película lipídica, denominada presión superficial ( $\pi$ ) y definido en la Ec.2.1. Esto permite interpretar la  $\gamma$  en términos de fuerzas intermoleculares. Las unidades usualmente empleadas para expresar  $\pi$  son mN/m.

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad \text{Ec. 2.1}$$

Esta monocapa puede ser comprimida mediante el movimiento controlado de dos barreras sobre la superficie de la subfase monitoreando continuamente el aumento de la  $\pi$  en la interfase como se muestra en la Fig 2.1 <sup>51</sup>. Las isotermas de compresión son informadas en gráficos de  $\pi$  vs. área molecular promedio (MMA). La MMA reportada es calculada considerando el área total de la monocapa dividida por el número total de moléculas de anfifilo en la interfase. Las mismas dan información acerca de la estabilidad de la monocapa en la interfase aire-agua, así como de la organización de las moléculas en la monocapa y de las interacciones entre ellas.



**Figura 2.1:** Monocapa de Langmuir e isotermas de compresión. Representación esquemática de una monocapa de Langmuir (A). Se construye una capa monomolecular de lípidos por deposición de una solución clorofórmica sobre la interfase agua/aire limpia. Luego de evaporación del solvente se comprime mediante barreras móviles midiendo continuamente el cambio de  $\gamma$  (llamado presión lateral, ver Ec. 2.1) inducido por el aumento de la densidad molecular en la interfase. Ejemplo de isotermas de compresión idealizada donde se muestran las regiones más comunes de forma esquemática para un fosfolípido (B).

A partir de las isothermas  $\pi$  - MMA se obtienen parámetros de especial relevancia. El valor de presión superficial a la cual la monocapa pierde su estabilidad es conocido como presión de colapso (Fig 2.1B). Además, las isothermas  $\pi$ -MMA muestran distintas regiones que corresponden a los diferentes estados de organización o fases en los que se encuentra la monocapa, así como regiones en las que coexisten dos fases. En la isoterma  $\pi$  - MMA mostrada en la Fig 2.1B se indican de forma idealizada las distintas fases para una sustancia anfifílica simple. En esta Figura se destaca:

- Fase gaseosa, G: Las moléculas se encuentran bastante diluidas, y tienen una gran área disponible por molécula, constituyendo una fase denominada gas bidimensional.
- Líquido expandido, LE: es una fase fluida muy compresible, en la que las moléculas experimentan unas fuerzas atractivas que permiten adoptar una estructura compacta. Entre las dos fases descritas, G y LE, ocurre un proceso parecido a la condensación de un gas (T1).
- Líquido condensado, LC: es un estado menos compresible y con una organización compacta. La parte hidrófoba de las moléculas se orienta casi perpendicularmente a la interfase. Puede observarse una segunda transición de fase (T2), entre las fases LE y LC.
- Fase sólida, S: Al continuar comprimiendo la monocapa, y antes de que esta llegue al colapso la monocapa puede alcanzar un estado S, donde la película es muy rígida y las cadenas hidrófobas forman un apilamiento compacto.

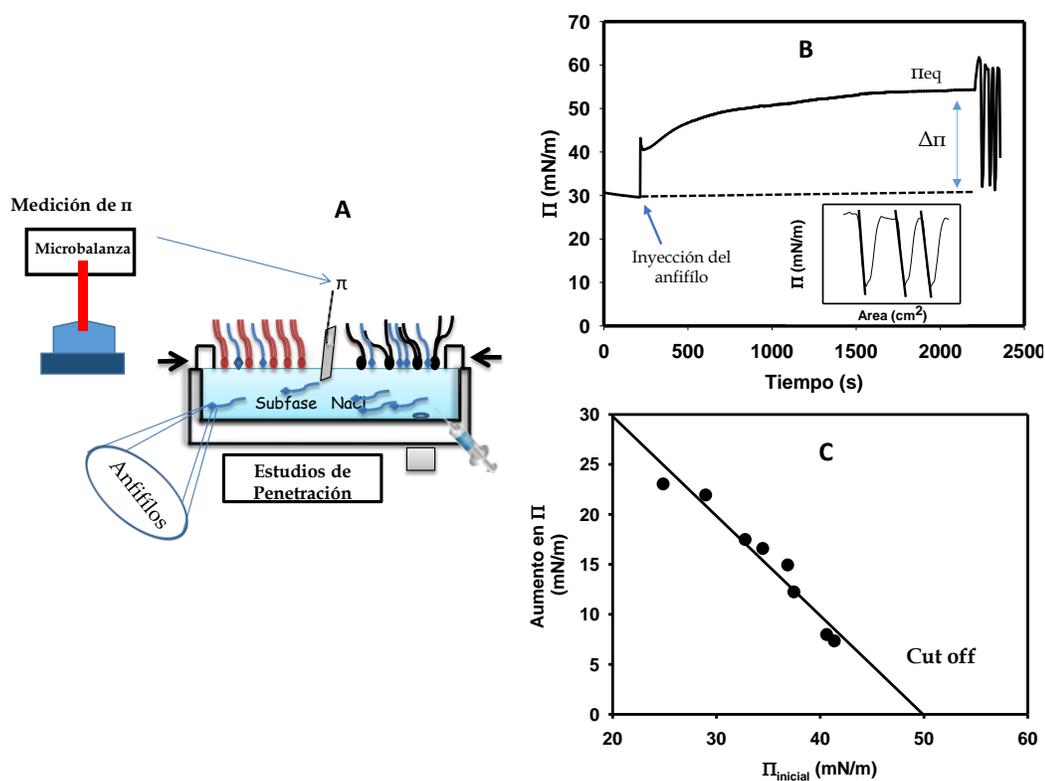
Además, a partir de la derivada de las isothermas se obtiene el parámetro de módulo de compresibilidad ( $C_s^{-1}$ ), según (Ec. 2.2):

$$C_s^{-1} = -A\left(\frac{d\pi}{dA}\right)_T \quad \text{Ec. 2.2}$$

Donde A representa el área total de la monocapa. Éste parámetro describe la elasticidad de la película y se relaciona con el estado de fase que presenta. Si se encuentran en estado LC, se registra un alto módulo de compresibilidad, es decir que la película responde a la compresión con un gran aumento de presión. Mientras que si presentan un estado LE, la  $C_s^{-1}$  determinada es baja, ya que se producen incrementos progresivos en la  $\pi$  a medida que el área molecular disminuye.

### 2.2.2 Estudios de penetración de anfifilos a interfases lipídicas

Para evaluar las características de la asociación de anfifilos a monocapas lipídicas en distintos estados de fases se llevaron a cabo estudios de penetración. Para estos experimentos, se formaron monocapas de lípidos puros o mezclas mediante la deposición de una solución clorofórmica de los lípidos en la interfase aire / solución salina hasta lograr la  $\pi$  deseada (30 mN/m). Posteriormente, se inyectó en la subfase (con continua agitación) volúmenes de los anfifilos propuestos; y se registró el aumento de  $\pi$  en función del tiempo (curvas de penetración) como se muestra en la Fig 2.2B y se describió en Ref <sup>29</sup>.



**Figura 2.2:** Monocapa de Langmuir y curvas representativas obtenidas a partir de los experimentos de penetración. Esquema de monocapa de Langmuir en la cual se sembró pequeñas gotas del lípido en la interfase hasta alcanzar una presión de 30mN/m y posteriormente se inyectó en la subfase cantidad deseada del anfifilo de interés (A). Curva de penetración representativa que muestra la inserción de ASC<sub>14</sub> en monocapas DSPC puras (B). Representación de penetración de ASC<sub>16</sub> en monocapa de diferente empaquetamiento inicial (C).

La concentración final de anfifilos elegida fue superior a su CMC. En el lapso de ~ 30-40 min las medidas de  $\pi$  se estabilizaron alcanzando la  $\pi$  de equilibrio ( $\pi_{eq}$ ) y luego, las monocapas

resultantes se sometieron a ciclos de compresión- expansión a una velocidad a  $3 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molec}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . A partir de las regiones de compresión de las curvas  $\pi$  vs. área (ver Fig2.2B recuadro), se calculó y promedió el valor  $C_s^{-1}$  de las membranas con los anfifilos adsorbidos. Los valores de  $\pi_{eq}$  y del parámetro cinético  $t_{50\%}$  (el tiempo necesario para alcanzar el 50% del proceso de adsorción o desorción) fueron calculados ajustando una función hiperbólica<sup>29</sup> (E.2.3) a cada curva experimental. Todos estos experimentos se llevaron a cabo encerrados en una caja acrílica bajo una corriente de  $\text{N}_2$  (g) para evitar la oxidación de los lípidos y anfifilos empleados.

$$\pi = \frac{\pi_{eq}}{(t_{50\%} + t)} \quad \text{Ec.2.3}$$

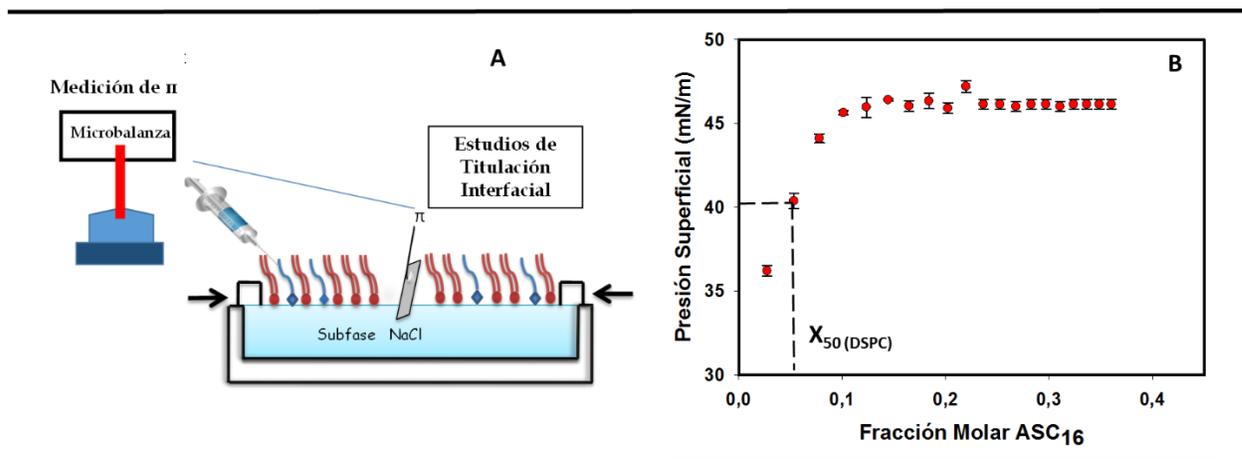
Además de los parámetros antes mencionados  $\pi_{eq}$ ,  $C_s^{-1}$  y  $t_{50\%}$ , estudiamos cuál es la presión límite de la monocapa inicial de fosfolípidos en la que los anfifilos pueden adsorberse. Este parámetro llamado presión de corte (o Cut Off en inglés), se relaciona con una mayor o menor capacidad del fármaco de penetrar las membranas lipídicas (ver Fig 2.2C).

Por otra parte, a partir de los experimentos de penetración podemos estimar la cantidad de anfifilo que se insertaría en la membrana. Teniendo en cuenta que la incorporación de las moléculas del anfifilo en una película lipídica preformada implicaría la compresión lateral de los componentes lipídicos para generar un área libre que ocupará el anfifilo. Luego, esto induciría un aumento en  $\pi$  hasta alcanzar  $\pi_{eq}$  y asumiendo un comportamiento de mezcla ideal para el sistema de anfifilo de interés / lípido, podemos estimar la fracción molar de anfifilo de interés a la  $\pi_{eq}$  como se describe en Ref <sup>29</sup> .

### 2.2.3 Estudios de Titulación Superficial

Se evaluó la capacidad de incorporación de los diferentes anfifilos a monocapas lipídicas a una presión de  $30 \text{ mN/m}$  mediante estudios de Titulación Superficial. Para ello sembramos lípidos sobre una solución salina (subfase) y luego añadimos gota a gota una solución clorofórmica de los anfifilos de interés y registramos la  $\pi$  resultante luego de la evaporación del solvente en cada paso. Es importante mencionar que para todos los sistemas membrana/ anfifilos estudiados, se alcanzó la saturación en  $\pi$ , lo cual significa que no se registró un

incremento en la presión al añadir mayor cantidad de anfifilos. A partir de las curvas obtenidas determinamos la fracción molar de anfifilo necesaria para alcanzar el 50 % de la saturación en la presión superficial ( $X_{50}$ ) según el caso (Fig2.3). El parámetro cinético para la desorción del anfifilo ( $t_{50}$ ) se calculó ajustando una función hiperbólica a la curva de relajación en el tiempo de cada monocapa después de la saturación de la superficie con el compuesto de interés <sup>29</sup>. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo corriente de  $N_2$  (g) para evitar la oxidación de los lípidos.



**Figura 2.3:** Esquema de Balanza de Langmuir y Titulación superficial de monocapas lipídicas mediante adición de anfifilo (A). Curvas representativas de la presión superficial alcanzada después de la adición gradual de ASC<sub>16</sub> en DSPC (símbolos rojos) inicialmente puros a 30 mN / m en función de la fracción molar resultante de ASC<sub>16</sub> (B). Las líneas discontinuas ilustran la fracción molar necesaria para alcanzar el 50% de la saturación en  $\pi$  ( $X_{50}$ ).

### 2.2.4 Coeficiente de difusión de microesferas en monocapas lipídicas de diferentes características reológicas

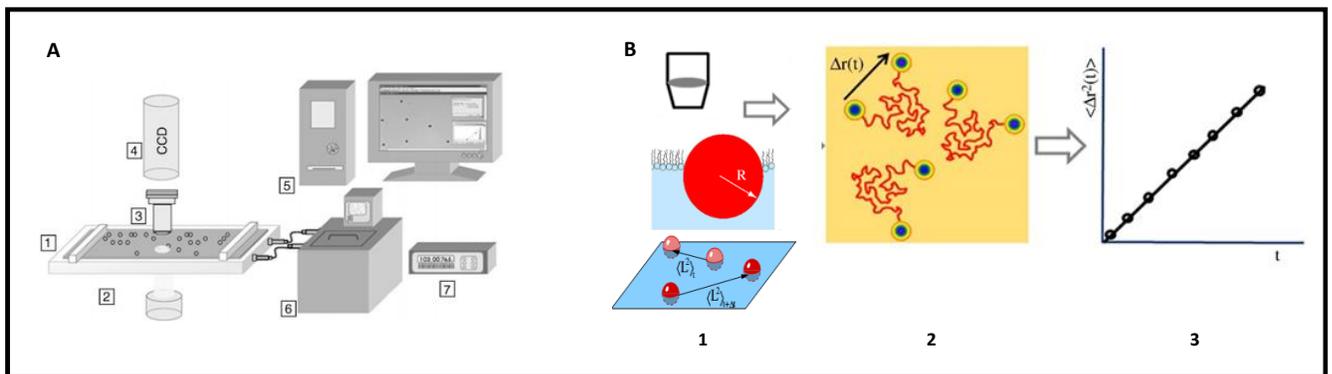
Estudiamos las propiedades de viscosidad de cizalla de diferentes monocapas lipídicas mediante la determinación del coeficiente de difusión de microesferas de látex. La difusión de las microesferas en una interfaz aire-agua modificada dependerá del ángulo de contacto, de la viscosidad del agua, del porcentaje de esfera que está hundida, y de la viscosidad superficial <sup>52,53</sup>. De una monocapa a otra, se espera que cambie este último parámetro y, por lo tanto, una comparación de la difusión de las microesferas (D) en las diferentes monocapas proporcionará una manera indirecta de comparar la viscosidad de cizalla de las mismas.

Para ello se agregaron microesferas de látex de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro a las soluciones de POPC, SM<sub>16</sub>, DSPC, CHO, MCC y SCM (solvente, cloroformo / metanol 2: 1 v / v), inmediatamente antes de extenderlos sobre la interfaz aire / solución salina. Después de la compresión de la monocapa hasta 30 mN / m, el movimiento de las microesferas en la superficie de las diferentes membranas fue seguido por microscopía de contraste de fase a una velocidad de 14 imágenes por segundo. Las posiciones relativas de las microesferas seleccionadas en pares se siguieron a través de los 200 imágenes utilizando el software complementario "Tracker\_class" del programa ImageJ 1.43u (NIH, EE. UU). A partir de estos datos, se calculó el desplazamiento cuadrático medio relativo (DCMr) de una única microesfera de látex en relación con otra.

La determinación de los desplazamientos cuadráticos medios relativos (DCMr) minimiza el efecto de convección (siempre presente en las monocapas de Langmuir) en el cálculo del movimiento browniano y el coeficiente de difusión de la microesfera (D) se puede obtener a partir de la Ec.2.4 que relaciona los valores de DCMr con la variación del tiempo ( $\delta t$ ).

$$DCMr = 8D\delta t \quad \text{Ec.2.4}$$

La Fig 2.4 muestra el desplazamiento cuadrático medio de una microesfera relativo a otra ( $DCMr = |X^2_{t+\delta t} - X^2_t|$ ) en función de  $\delta t$  para cada par de microesferas. El coeficiente de difusión se obtiene de la pendiente de la región lineal del gráfico <sup>54,55,56</sup>.



**Figura 2.4:** Configuración típica de seguimiento de partículas para experimentos de microreología en 2D: 1: Monocapa de Langmuir; 2: iluminación; 3: microscopio objetivo; 4: cámara CCD; 5: computadora; 6: termostato; 7: electrónica para medir la presión superficial (A). Esquema de una partícula de radio R que está parcialmente inmersa en la monocapa y la subfase. (1-2) La difusión en la superficie se determina midiendo el cambio promedio en la distancia de separación de los pares de partículas, que es un enfoque que elimina la convección. 3) Grafica

ilustrativa del cálculo del coeficiente de difusión de la microesfera considerando la Ec. 2.4. (B) (Figura adaptada de la Ref 8 y 11).

### 2.2.5 Microscopía de Angulo de Brewster

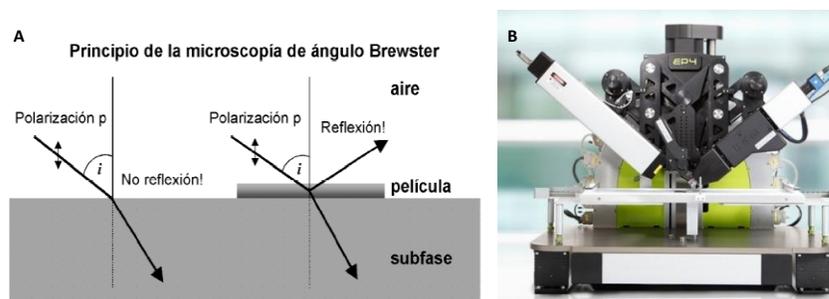
La exploración de la estructura bidimensional de las monocapas se realizó utilizando microscopía de ángulo de Brewster (BAM). Esta técnica permite la visualización de películas ultradelgadas basándose en las propiedades de reflectividad de la luz en interfases <sup>57</sup>. La reflectividad (R) es la fracción de radiación reflejada ( $I_R$ ) por una superficie con respecto a la radiación incidente ( $I_0$ ) según (Ec. 2.5):

$$R = I_R / I_0 \quad \text{Ec.2.5}$$

R es función del ángulo de incidencia  $\theta_i$ , de la polarización de la luz y del tipo de interfase. Para una interfase entre dos medios de diferente índice de refracción  $n_1$  y  $n_2$ , existe un ángulo donde el valor del coeficiente de reflexión es mínimo y una onda incidente polarizada verticalmente es mayoritariamente refractada. Este ángulo, se denomina ángulo de Brewster y se define según (Ec.2.6)

$$\tan \theta_B = \frac{n_2}{n_1} \quad \text{Ec.2.6}$$

Donde  $\theta_B$  es el ángulo de Brewster,  $n_1$  es el índice de refracción del medio 1 (aire) y  $n_2$  el índice de refracción del medio 2 (agua o solución acuosa). En presencia de una monocapa en la superficie, la R será distinta del mínimo experimental dependiendo de  $n$  y del espesor de la película ( $l$ ), ver Fig 2.5. Esto permite que la luz reflejada sea utilizada para formar una imagen de la estructura bidimensional de la monocapa, debido a la diferencia en  $n$  y  $l$  entre la monocapa y la subfase y a su vez entre las distintas fases lipídicas que pueden estar coexistiendo lateralmente en la monocapa <sup>57,58</sup>.

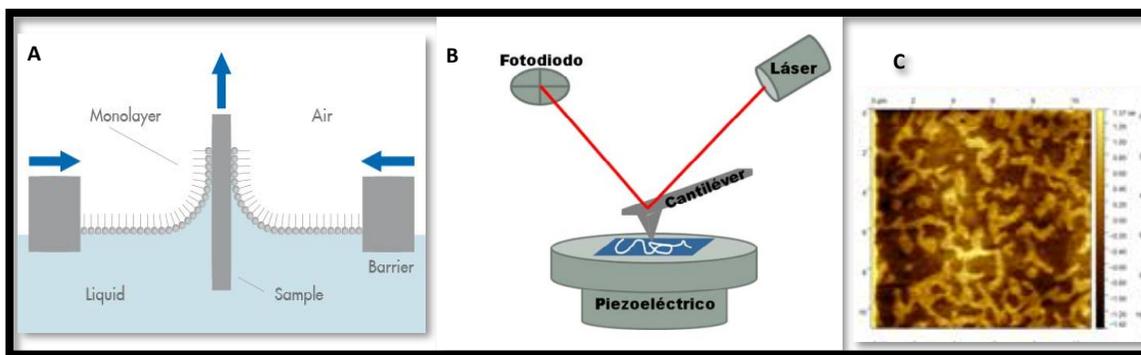


**Figura 2.5:** Principio físico de la microscopía de ángulo de Brewster (A). Instrumento Comercial elipsómetro de imagen Nanofilm EP3 Accurion, Goettingen, Alemania (B).

En estos experimentos las monocapas de Langmuir se prepararon como se describió anteriormente en un equipo Langmuir montado en la platina de un elipsómetro de imagen Nanofilm EP3 (Accurion, Goettingen, Alemania), que se usó en el Modo de microscopía de ángulo de Brewster (BAM). La reflexión mínima se estableció con un láser polarizado ( $\lambda = 532$  nm) incidente en la superficie acuosa en ausencia de anfifilos en el ángulo de Brewster experimentalmente calibrado ( $\sim 53.1^\circ$ ). Después de la formación de la monocapa y durante la compresión, la luz reflejada se recolectó a través de un objetivo 20x y un polarizador en una cámara CCD.

### 2.2.6 Transferencia de película de Langmuir a soportes sólidos para inspección por microscopía de fuerza atómica (AFM).

Se utilizó el método de Langmuir-Blodgett (LB) para construir monocapas soportadas en sustrato sólido colocando un vidrio cubreobjetos perpendicular a la interfase aire-agua cubierta por la monocapa que se va a transferir y, mediante emersión de dicho soporte. Las moléculas se van depositando sobre el sustrato sólido, tal como se muestra en la Fig 2.6A. Durante la transferencia se hace avanzar la barrera móvil para compensar la pérdida de moléculas manteniendo constante la  $\pi$ . Esta técnica permite la obtención de monocapas soportadas, que son estables en contacto con el aire <sup>59</sup>.



**Figura 2.6:** Esquemización de los métodos de transferencia de Langmuir-Blodgett (A) Representación de los principios de la microscopía de fuerza atómica (AFM) (B). Imágenes de microscopía de AFM de monocapas que mimetizan el estrato corneo (SCM) en presencia de 35 mol% ASC<sub>14</sub> transferidas a soporte sólido (C).

El microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) es una técnica de imagen que puede lograr una resolución a nanoescala (atómica) de la estructura superficial de varias muestras<sup>60</sup>. Constituye una herramienta muy importante dentro del campo de la nanotecnología y la química de superficie, puesto que mediante ella se obtiene información sobre la reología (fricción) y morfología (topología) de la película, permitiendo determinar el tamaño y orientación de las estructuras laterales formados. El principio de la operación de AFM, según Binnig y col (1986) se muestra en la Fig 2.6 <sup>61</sup>. Un cantiléver con una punta atómicamente afilada en el extremo se mueve sobre la superficie de la muestra en un patrón de escaneo (línea por línea) y se dobla en respuesta a la fuerza de interacción entre la punta y la superficie. Esta flexión vertical del cantiléver se traduce luego en información sobre la topografía de muestra. A partir del movimiento lateral del cantiléver se registró una señal de deflexión lateral o fricción.

Las imágenes de AFM de monocapas lipídicas transferidas a soporte sólido se adquirieron en un Microscopio de Sonda Local (AGILENT 5500 (Agilent Technology, California, EE. UU) y se trabajó en el modo contacto utilizando el NANOSENSOR PPP-VONTR-50 S/N: 60090F21L591 silicón- cantiléver para microscopía por escaneo con sonda con constante de resorte de 0.02-0.77 N/m, manteniendo continuamente la mínima fuerza posible.

Se tomaron imágenes de 512 x 512 píxeles de resolución (11 x 11  $\mu\text{m}$ ) a una velocidad de escaneo de 1 Hz. Los datos se recopilaron y analizaron utilizando el programa Gwyddion 2.50 para la visualización y análisis de datos de microscopía por escaneo con sonda (gratuito), desarrollado por el Instituto Checo de Metrología (<http://www.cmi.cz/>).

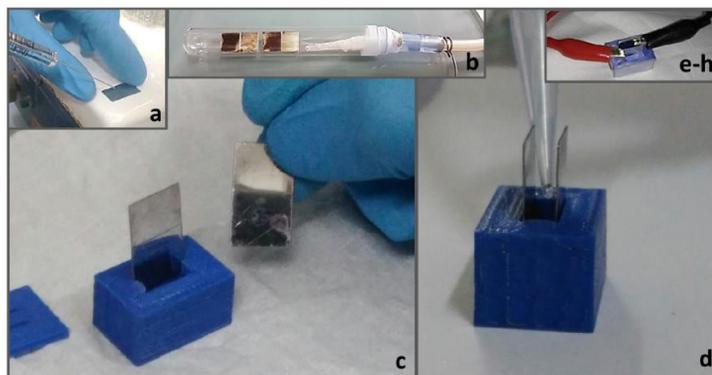
## **2.3 Utilización de Vesículas Lipídicas como modelo de membranas**

### **2.3.1. Preparación de liposomas: vesículas multilamelares (MLVs), vesículas unilamelares grandes (LUVs) y Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)**

Se utilizaron MLVs en algunos estudios. Para ello se secaron lípidos puros o mezclas a partir de soluciones clorofórmicas y se depositaron en las paredes de un tubo por evaporación del disolvente bajo una corriente de  $\text{N}_2$ . Los residuos de solvente orgánico se eliminaron con incubación (1h) en una cámara de alto vacío<sup>28,62</sup>. La película de lípidos se hidrató con una solución salina o tampón conteniendo Tris-base 10 mM, NaCl 120 mM y EDTA 0.1 mM (pH 7.4). Se agitó vigorosamente y después se sometió a cinco ciclos de frío y calor (-195  $^{\circ}\text{C}$  y 50  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente).

Los liposomas unilamelares utilizados en esta tesis se formaron por el método clásico de extrusión a través de filtros. A partir de las suspensiones de MLVs se realizaron repetidas extrusiones (21 veces) a través de filtros de policarbonato con poros de 100nm a una temperatura mayor a la de fusión de los componentes lípidos. Obteniéndose vesículas unilamelares grandes (LUVs) de un tamaño uniforme.

Para la obtención de las GUVs se utilizó el método de electroformación descrito por Angelova y col <sup>63</sup> y modificado por Bellón y col <sup>64</sup>. Brevemente, a 7  $\mu\text{L}$  de una solución lipídica (0,5 mg/ml en cloroformo: metanol 2: 1 v/v) se le añadió 0,5% en moles de la sonda fluorescente Rho-PE<sup>65</sup> y se procedió como está descrito en la Ref <sup>64,65</sup> ( ver Fig 2.7).



**Figura 2.7:** Esquema del procedimiento de obtención de GUVs empleando el método de electroformación. Deposición de la mezcla de lípidos de una solución clorofórmica 0,5mg/ml sobre electrodos previamente limpios(a).Secado de los lípidos mediante corriente de N<sub>2</sub> para eliminar restos de solvente residual, colocando los electrodos en una cámara de vacío durante 1 h(b).Inserción de los electrodos en las cavidades de la celda (c) . Llenado la celda con la solución acuosa deseada (d).sellado de la misma e incubación en la estufa a la temperatura deseada por encima de la temperatura de fusión de los lípidos y (e-h) someter la muestra a un campo eléctrico oscilante para comenzar la electroformación.[Figura tomada de la Ref <sup>20</sup>].

Los liposomas gigantes fueron observados con un microscopio confocal de fluorescencia (Olympus FV 300, Tokio, Japón). Las imágenes confocales de los GUv se procesaron y cuantificaron con el software FIJI Image J (NIH, EE. UU.).Las GUvs fueron visualizadas por microscopía de contraste de fases debido a la diferencia en el índice de refracción entre los medios internos (sacarosa) y externos (solución salina).A su vez, la incorporación de sondas fluorescentes liposolubles en la bicapa permitió su observación por microscopía confocal de fluorescencia.

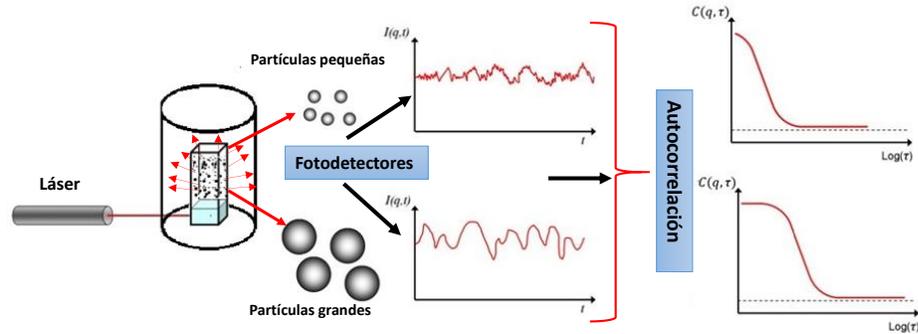
### 2.3.2 Análisis de la distribución de tamaño de LUVs por dispersión dinámica de la luz (DLS)

La dispersión dinámica de la Luz (DLS) es una técnica empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión <sup>66</sup>.La técnica consiste en irradiar con un láser un pequeño volumen de la suspensión de partículas, las cuales dispersan la luz en todas las direcciones. Como consecuencia del movimiento browniano de las partículas en suspensión, la luz láser se dispersa con diferentes intensidades en función de tiempo. La frecuencia de las fluctuaciones de la intensidad depende del tamaño de las partículas (las pequeñas se moverán más rápidamente que las grandes) y mediante su análisis es posible

obtener el coeficiente de difusión traslacional ( $D$ ), y finalmente el radio hidrodinámico de la partícula ( $R_H$ ) a partir de la ecuación de Stock-Einstein (ver Fig 2.8):

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad \text{Ec.2.9}$$

Donde  $D$  es el coeficiente de difusión y  $\eta$  es la viscosidad del fluido.



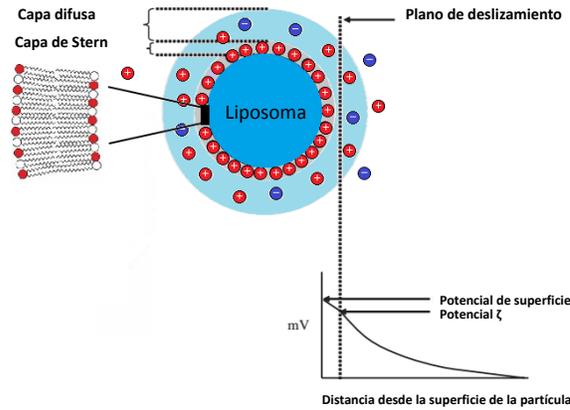
**Figura 2.8:** Representación del método de Dispersión dinámica de la luz (DLS). Registro de la luz dispersada por una muestra en función de su tamaño. A partir de dichas fluctuaciones mediante una función de correlación es posible obtener la distribución de tamaño de las partículas dispersantes.

La luz dispersada a un cierto ángulo  $\theta$  es colectada por un detector (fotomultiplicador) y correlacionando las intensidades de dispersión a diferentes tiempos se puede construir la función de correlación. Ésta puede ser ajustada por un modelo físico acorde al tipo de partículas o estructuras presentes en la muestra para determinar  $D$ , la distribución de tamaños y la polidispersión.

La distribución de tamaño de las partículas se estudió mediante DLS utilizando un rayo láser de 530 nm, y se analizó a 90 ° C. El equipo utilizado fue un medidor de partículas Nicomp™ 380 Submicron (Santa Barbara, California, EE.UU).

2.3.3 Medidas de Potencial Z en LUVs.

El potencial zeta es el potencial electrocinético medido en el plano de deslizamiento de una partícula bajo un campo eléctrico en sistemas coloidales y se denota con la letra griega  $\zeta$ . La doble capa eléctrica (DCE) de una partícula en solución está formada por la capa interna, llamada capa Stern y la capa difusiva que consta de iones / moléculas con carga opuesta e igual (Fig. 2.9). Cuando se aplica un campo eléctrico a la muestra, las partículas se mueven al electrodo opuesto deslizándose en un plano hipotético que actúa como la interfaz entre las partículas en movimiento y el dispersante circundante. Este plano es el plano de deslizamiento característico y el potencial zeta es el potencial en esta interfaz <sup>67,68</sup> ( ver Fig 2.9).



**Figura2.9:** Representación esquemática de la doble capa eléctrica que rodea una partícula en un medio acuoso y la posición del plano de deslizamiento, considerando que la misma tiene carga negativa .La partícula representa un liposoma compuesto por fosfolípidos cargados negativamente, indicando que la primera capa (potencial de Stern) principalmente compuesta por contraiones cargados positivamente después de la aplicación de un campo eléctrico. La segunda capa es la capa difusa que consiste en los contraiones y los iones de la misma carga de la partícula, la cual está en contacto con el medio acuoso. El potencial zeta es el potencial eléctrico en el plano de deslizamiento

Las mediciones del potencial zeta se realizaron utilizando el equipo Zetasizer SZ-100-Z (Horiba, Ltd., Japón), provisto de un láser de estado sólido (532 nm, 10 mW) y utilizando la técnica de velocimetría láser-Doppler. La movilidad electroforética ( $\mu_e$ ) de las partículas se calculó mediante la ecuación de Henry<sup>67</sup>.

$$\mu_e = 2 \epsilon_r \epsilon_0 \zeta f (ka) / 3\eta \quad \text{Ec.2.10}$$

donde  $\epsilon_r$  es la permitividad relativa / constante dieléctrica,  $\epsilon_0$  es la permitividad del vacío,  $\zeta$  es el valor del potencial zeta,  $f(Ka)$  es la función de Henry o Helmholtz-Smoluchowski, y  $\eta$  es la viscosidad a la temperatura experimental. Dependiendo del disolvente donde se dispersan las partículas, el valor de  $f(Ka)$  utilizado es 1 o 1.5, para medio orgánico o medio acuoso, respectivamente <sup>69</sup>. Las partículas lipídicas se resuspendieron en Tris-HCl 5 mM, pH 7,4 a una concentración final de lípidos de 0,4 mM.

#### 2.3.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) empleando MLVs

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) mide la capacidad calorífica relativa de un sistema determinado cuando sufre una transición inducida por un cambio térmico<sup>70</sup>. En el experimento, las celdas con la muestra y la referencia se calientan simultáneamente a una misma velocidad. La muestra es una solución o una suspensión del material que se desea estudiar, y la referencia contiene solamente el disolvente utilizado<sup>71</sup>. Al calentarse, se produce una transición inducida por la temperatura (por ejemplo, una transición orden-desorden en bicapas fosfolipídicas), la muestra absorbe parte del calor que se le está suministrando a la celda. El sistema de control del equipo suministra una potencia calorífica adicional para que ambas celdas mantengan la misma temperatura. Esta potencia en exceso es proporcional a la diferencia de capacidades caloríficas ( $C_p$ ) entre las dos celdas y sus contenidos<sup>71</sup>. La curva  $C_p$  en función de la temperatura es analizada para determinar la temperatura de transición ( $T_m$ ) y la entalpía calorimétrica de la transición ( $\Delta H_{cal}$ )<sup>72</sup> ( ver Fig 2.10).

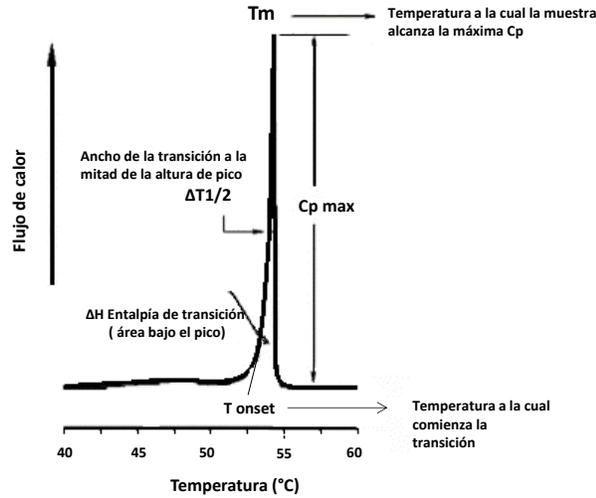


Figura 2.10: Esquema de los parámetros termodinámicos característicos de una curva de CDB. Adaptada de Ref<sup>73</sup>.

Para las transiciones de fase de primer orden, como la transición de gel a Ld, la temperatura de transición,  $T_m$ , es donde la  $C_p$  alcanza su valor máximo. El valor de la entalpía calorimétrica ( $\Delta H_{cal}$ ) para la transición de fase se determina integrando el área bajo el pico según la Ec. 2.11 <sup>73</sup>.

$$\Delta H_{cal} = \int C_p dT \quad \text{Ec.2.11}$$

A partir de estos valores, se determina la entropía de la transición de fase ( $\Delta S$ ):

$$\Delta S = \frac{\Delta H_{cal}}{T_m} \quad \text{Ec.2.12}$$

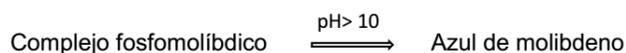
La transición principal de los fosfolípidos de las bicapas ocurre entre el estado lamelar de la fase gel a la Ld afectando las interacciones de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas e incrementando su movilidad.

Los MLVs de DPPC y DPPC + HePC, anfifilo bioactivo de interés se analizaron mediante CDB. Las muestras se sometieron a un tratamiento desgasificante de 15 minutos antes de cargarlas en un calorímetro diferencial de barrido Microcal VP-DSC (Microcal, Northampton, MA, EE. UU.). Los termogramas se registraron entre 20 y 60 ° C, a una velocidad de calentamiento de 30 ° C / h y se analizaron con el software Microcal Origin 5.0 (Microcal, Northampton, MA, EE. UU) y Origin 8.0. Los efectos de HePC en las vesículas de DPPC se

evaluaron a través de diferentes parámetros: entalpía y cambios de entropía ( $\Delta H_c$  y  $\Delta S$ )<sup>72</sup>, temperatura de transición ( $T_m$ ) y ancho medio del pico de transición ( $\Delta T^{1/2}$ ).

### 2.3.5 Análisis del equilibrio de formas micelares y bicapas en suspensiones lipídicas conteniendo HePC

Después de los ensayos de calorimetría, la suspensión lipídica se centrifugó a 13000 g durante 1 hora a 4 ° C para separar las MLVs de cualquier agregado unilamelar o micelar presente en la muestra <sup>28</sup>. Los sobrenadantes se pasaron por una columna 50 VAC SEP-PAK C18 1 cm<sup>3</sup> VAC (Waters) y se eluyeron consecutivamente con etanol y cloroformo, obteniéndose una fracción acuosa, etanólica y clorofórmica. Finalmente, se analizó el contenido de fósforo en cada fracción utilizando el método descrito por Bartlett y colaboradores<sup>74</sup>. Brevemente consiste en someter a cada fracción a una mineralización en presencia de ácido perclórico al 70%, 1h, 180°C y posterior medición de la concentración de fósforo inorgánico con una reacción colorimétrica (Bartlett 1958), según los siguientes equilibrios:



La absorbancia de cada muestra se midió con un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu, Biospec-mini) a una  $\lambda = 830$  nm. El límite de detección del ensayo de fosforo fue 50  $\mu\text{M}$ , que representa el 3.8mol% del total de fosfolípido usado.

## 2.4 Actividad Fosfolipasa

Se utilizaron liposomas compuestos por SM<sub>16</sub>: DOPE 70:30 o DOPC: DOPE 80:20 (en presencia o ausencia de HePC, el anfifilo bioactivo de interés) como sustratos de las enzimas esfingomielinasa (SMasa) o Fosfolipasa C (PLC) respectivamente. SMasa cataliza la conversión de SM<sub>16</sub> en palmitoil ceramida (Cer<sub>16</sub>) y PLC convierte DOPC en diacilglicerol (DAG). Se incubaron los liposomas con las enzimas a 37 ° C y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos añadiendo cloroformo: metanol para detener la reacción. Los lípidos fueron extraídos de la fracción clorofórmica, se evaporó el solvente y las muestras fueron resuspendidas en cloroformo.

Se realizó una cromatografía en placa delgada (TLC) para determinar de manera discontinua la actividad de ambas enzimas. Se incluyeron los patrones de lípidos puros: SM<sub>16</sub>, DOPC, DOPE, DAG, Cer<sub>16</sub> y HePC. La corrida cromatográfica para la SMasa se realizó con el solvente: cloroformo/metanol/agua 100:42:6 (v/v/v) hasta un tercio de la placa cromatografía y se utilizó cloroformo/metanol/ ácido acético 96:4:1 (v/v/v) hasta la parte superior de la placa para aislar las Cers. Para PLC se empleó el mismo procedimiento pero empleando cloroformo/metanol/agua 60:30:5 para separar DOPC, DOPE y con hexano: éter etílico: ácido acético 80:20:2 se logró separar el DAG. Para la identificación de los lípidos, se sumergió la placa en una solución acuosa de 3% p/v de acetato cúprico y 8% v/v de ácido fosfórico y se calentaron a 190 °C. La semicuantificación de los lípidos fue realizada usando el programa Image J 1.43 u (NIH, USA).

Para los experimentos que involucraron SMasa, los LUVs fueron preparados en 10mM HEPES, 200mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM MgCl<sub>2</sub> a pH7. Mientras que para los que involucraron a la PLC, los LUVs fueron preparados en 10mM HEPES, 200mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> a pH 7. El experimento se realizó a una concentración final de lípidos entre 0,4-0,5 mM y una concentración de 1,4 o 0,14 U/ml para SMasa o 0,75 o 0,024 ×10<sup>-3</sup> U/ml para PLC. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a 37°C bajo agitación constante.

## **Capítulo 3: Caracterización de las propiedades de superficie y de autoorganización de los anfifilos.**

### **3.1. Introducción**

Desde principio del siglo pasado hasta el presente, el proceso de asociación reversible de moléculas anfifílicas, ha despertado un amplio interés, por sus propiedades bioactivas en el campo de la medicina y como agentes etiológicos de algunas enfermedades, lo que ha sido objeto de numerosas investigaciones <sup>75,76</sup>. Estas moléculas tensoactivas están involucrados en procesos de micelización y formación de fases cristalinas líquidas, tienen una gran capacidad para interactuar con estructuras hidrofóbicas de los sistemas vivos como lo son las membranas lipídicas.

Teniendo en cuenta estos aspectos propusimos el estudio de dos familias químicamente no relacionadas de fármacos anfifílicos: los derivados del ácido ascórbico (ASC<sub>n</sub>) que contienen un ácido graso de 16 (ASC<sub>16</sub>), 14 (ASC<sub>14</sub>), o 12 (ASC<sub>12</sub>) carbonos esterificando la posición 6 del anillo aromático los que están dentro de la familia perteneciente a las aquilfosfocolinas, el compuesto HePC .Además incluimos a un esfingolípido con un grupo catiónico, Psicossina (Psy) por su importancia en la etiología de la enfermedad de Krabbe . Todas estas moléculas tienen ciertas características estructurales y de comportamiento de superficie en común ya que son anfifilos de simple cadena, con moderada solubilidad en agua y considerados fuertes perturbadores de membrana <sup>28,45,48,77</sup>.

Nuestro enfoque en primer lugar abordó el estudio de la actividad de superficie de estos compuestos y de las características biofísicas de las estructuras que forman al autorganizarse tanto en interfase agua/ aire como en solución acuosa. Planteamos un estudio comparativo que incluye: caracterización del tipo de agregado (micelas, lamelas, etc) que presentan en solución acuosa mediante DLS; evaluación de sus capacidades tensoactivas mediante estudios de

adsorción de Gibbs a interfases agua/aire; (determinación de la CMC). Además incluimos estudios de la estabilidad y estado de fases de los anfifilos autoorganizados en interfases agua/aire en monocapas de Langmuir, así como el análisis de la textura de la superficie por BAM.

### 3.2 Caracterización de las suspensiones de los anfifilos a pH neutro

Como se explicó en el capítulo 1, los parámetros geométricos de cada lípido determinan la estructura que formarán al agregarse en medio acuoso. Según el trabajo de Israelachvili, anfifilos con un parámetro de empaquetamiento crítico ( $P_c$ ) entre  $0,33 < P_c < 0,5$  se organizan en micelas cilíndricas, mientras que un  $0,5 < P_c < 1$  se espera que formen lamelas planas <sup>17</sup>.

Teniendo en cuenta estos criterios, Mottola y col han reportado que los  $P_c$ s para ASC<sub>12</sub> y ASC<sub>14</sub> están cerca del límite entre las dos cotas que corresponden a la organización micelar. De manera que plantearon que estos anfifilos presentan estructuras de 20-40 nm medidas por DLS en coexistencia con agregados de más de 100 nm para suspensiones de estos anfifilos puros, lo que está en concordancia con la ocurrencia de micelas cilíndricas en equilibrio dinámico con grandes estructuras lamelares del tipo descrito para ASC<sub>16</sub> por difracción de rayos X <sup>47</sup>.

Por otro lado, las muestras de HePC puro presentaron una población de partículas pequeñas (10-20 nm), que corresponden a micelas y una población diferente en el rango de 50-100 nm que puede incluir micelas cilíndricas o vesículas pequeñas <sup>78</sup>. Apoyando estos resultados Wnetrzak y col determinaron el  $P_c$  de diferentes alquilfosfolinas: HePC y octadecilfosfolina (0,29) indicando una forma cónica <sup>79</sup>.

Un análisis de las propiedades de superficie y estructurales de Psy nos permitieron calcular un  $P_c$  de 0,6 para ese anfifilo, un valor cercano al límite inferior propuesto para anfifilos que se autoorganizan en lamelas. Nuestros estudios de suspensiones de Psy a pH neutro mediante DLS arrojaron la presencia de micelas <20 nm que coexiste con grandes estructuras en el rango de micrómetros (0,6-3,3  $\mu$ m) (Fig 3.1B). En concordancia con nuestros resultados ,

Orfi y col utilizaron microscopía electrónica y encontraron una mezcla de estructuras pequeñas, de 15 a 23 nm de tamaño, consideradas como micelas con estructuras alargadas más grandes  $> 100$  nm <sup>45</sup>.

Cabe señalar que el volumen de Psy organizados en micelas fue casi insignificante en comparación con la cantidad que compone las estructuras de tamaño micrométrico. En comparación con la situación donde la mayoría de las moléculas están ionizadas a pH 4.5, a pH neutro al cual desarrollamos nuestro estudio se producirá una menor repulsión electrostática intermolecular ya que Psy solo está parcialmente ionizada. Ésto favorece su organización en una estructura más compacta, probablemente de naturaleza lamelar, observada como grandes agregados.

Este panorama está de acuerdo con el hecho de que la Psy se acumula en el cerebro de los pacientes con la enfermedad de Krabbe, una situación poco probable para un anfifilo que prefiere la organización micelar.

### **3.3 Adsorción de los anfifilos a la interfase limpia agua/aire**

Cuando una solución concentrada de anfifilos se disuelve en una solución acuosa se produce la adsorción de estas moléculas anfifílicas a la interfase agua/aire formando así una monocapa de Gibbs. A causa de ello, se observa una disminución en la  $\gamma$  registrado como un aumento de la  $\pi$ . En contraste con las monocapas de Langmuir, las monocapas de Gibbs reflejan el equilibrio entre la forma adoptada por la molécula anfifílica en la subfase (a concentraciones  $> \text{CMC}$ ) y la película organizada que se forma en la interfase<sup>59</sup>.

Mottola y col. reportaron que los tres derivados de la vitamina C con cadena hidrocarbonada de C16, C14 y C12 ( $\text{ASC}_{16}$ ,  $\text{ASC}_{14}$  y  $\text{ASC}_{12}$ ) forman monocapas de Gibbs que alcanzan valores típicos de  $\pi$  entre 34 y 45 mN/m, y que presentan cinéticas de adsorción muy diferentes. Estos autores describieron la curva cinética de adsorción, como una cinética bimodal para  $\text{ASC}_{16}$  y  $\text{ASC}_{14}$ . El pico inicial, evidencia una adsorción rápida en la interface de las

moléculas anfifílicas cargadas negativamente, mientras que la segunda fase involucra una neutralización parcial y compactación de la película. Por otro lado, ASC<sub>12</sub> presenta una región de metaestabilidad inicial, donde alcanza una presión superficial constante durante un tiempo variable <sup>27</sup>.

El equilibrio entre los agregados presentes en la subfase y en la superficie se produce con alta probabilidad a través de su forma monomérica. Es por ello que un estudio de la  $\pi_{eq}$  a diferente concentración de anfifilos permite determinar el valor de la CMC. Se ha reportado que las CMCs de los ASC<sub>n</sub> que disminuyen conforme aumenta la longitud de la cadena hidrocarbonada <sup>27</sup>, ver Tabla 3.1.

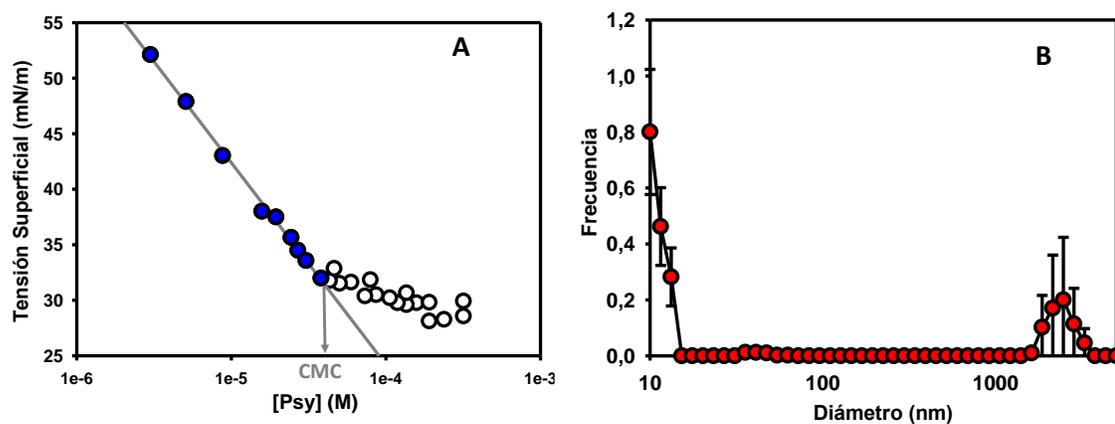
**Tabla 3.1:** Propiedades de monocapas de los anfifilos empleados a 30 mN / m y CMCs.

	MMA	Cs <sup>-1</sup> (mN/m)	Estado de fase	CMC(μM)	Ref
<b>ASC<sub>14</sub></b>	24± 1	33± 2	LE	9± 4	[2,13]
<b>ASC<sub>16</sub></b>	23± 1	66± 3	LC	8± 2	[2,13]
<b>HePC</b>	25±2	57± 4	LE	2-40 ± 20	[3,12]
<b>Psy</b>	23± 2	21± 2	LE	38± 3	

Cuando se añade HePC a una solución salina, se forman estructuras autoagregadas en forma de micelas por encima de la CMC. Los primeros estudios informaron valores de CMC de 2–2.5 μM para HePC en una solución de NaCl 150 mM <sup>77</sup>. Sin embargo, un estudio reciente muestra que los HePC se agregan de una manera dependiente del tipo y la concentración de sal con una CMC de 40 ± 20 μM <sup>80</sup>. Por otro lado, se informó una dosis media para su efecto citotóxico de 2.5 a 6.5 μM <sup>81</sup>. En nuestros estudios utilizamos una concentración final de 13 μM, que cae dentro del rango de CMC informado pero por encima de la concentración de dosis efectiva media de HePC.

Una concentración creciente de Psy induce la adsorción de las moléculas a la interfaz aire / agua, disminuyendo la  $\gamma$ . Este proceso sigue la ecuación de adsorción de Gibbs ( ver Ref<sup>65</sup>) hasta que el sistema alcanza la CMC (vea la flecha en la Figura 4.2A). Nuestros resultados para Psy mostrados en la Fig 3.1A arrojan un valor de CMC de  $38 \pm 3 \mu\text{M}$ , que coincide con el rango de concentración informado por Orfi y col. de 20–300  $\mu\text{M}$ <sup>45</sup>.

A partir del ajuste de los datos como se detallada en Ref<sup>65</sup>, se estimó el área molecular media (MMA) ocupada por Psy en la interfaz. Este análisis proporciona un valor de  $43 \pm 2 \text{ \AA}^2$  / molécula, un área mayor en un 40% que la MMA obtenida por las isothermas de compresión de las películas de Langmuir ( $23 \pm 2 \text{ \AA}^2$  / molécula)<sup>48</sup>. Esto sugiere que la organización de Psy en la interfaz después de la adsorción espontánea (formando monocapas de Gibbs) da como resultado una película menos compacta que la obtenida por compresión de las películas de Langmuir.

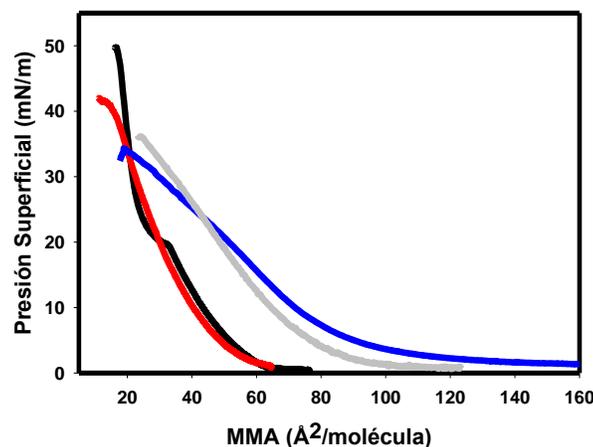


**Figura 3.1:** Caracterización de la suspensión de Psy en solución tampón a pH 7,4. A) Disminución de la  $\gamma$  tras la adsorción interfacial de Psy. La flecha indica el valor de CMC de  $38 \pm 2 \mu\text{M}$ . La línea de regresión se ajustó a los datos correspondientes a dos experimentos independientes. B) Distribución de tamaño de partículas en una suspensión de  $50 \mu\text{M}$  Psy analizada mediante dispersión dinámica de la luz. El análisis se realizó considerando el número de partículas (círculos rojos). Los ejes de frecuencia indican la distribución relativa, que varía de 0 a 1 para todos los casos. Las barras de error corresponden al error estándar de la media (SEM) de cinco experimentos independientes. T:  $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

### 3.4 Isotermas de compresión de monocapas de los anfifilos empleados

En la Fig3.2 se muestran las isotermas de compresión de los anfifilos empleados. Se observó que las monocapas de los mismos aumentan la  $\pi$  en respuesta a la compresión a medida que el MMA disminuye excepto para el ASC<sub>12</sub> que no forma una monocapa de Langmuir<sup>27</sup>. A una dada  $\pi$  (presión de colapso), la MMA se vuelve lo suficientemente pequeña como para provocar que las fuerzas de repulsión entre las moléculas predominen, desestabilizando así la monocapa formada y causando por lo tanto el colapso de la película.

En particular se ha reportado que las monocapas de ASC<sub>16</sub> presentan una transición de fase de LE (con una  $Cs^{-1}$  de  $\sim 33$  mN/m) a LC (con valores de  $Cs^{-1}$  mayores a 60 mN/m)<sup>82</sup> mientras que ASC<sub>14</sub> se encuentra en fase LE a pH cercano a la neutralidad, con  $Cs^{-1}$  que varían entre 20 y 35mN/m (Fig 3.2 y tabla 3.1). Es importante señalar que las propiedades termodinámicas y estructurales de las monocapas de ASC<sub>n</sub> dependen de las condiciones electrostáticas del sistema. A un pH cercano a la neutralidad las moléculas se encuentran parcialmente ionizadas con cargas negativas mientras que a pH ácido las moléculas se encuentran en estado neutro <sup>27,47</sup>.



**Figura 3.2:** Isoterma de Compresión de monocapas de Langmuir de los anfifilos estudiados. Las curvas son experimentos representativos, que varían en menos de 2 mN/m desde sus réplicas correspondientes. Los anfifilos estudiados fueron ASC<sub>16</sub> (línea negra), ASC<sub>14</sub> (línea roja), HePC (línea azul) y Psy (línea gris). Las condiciones de la subfase fueron a pH=5 (ASC<sub>n</sub>); pH = 6 (HePC) y pH=7 (Psy).

Por otra parte se ha informado que las monocapas de Langmuir de HePC y Psy puras forman películas LE en todo  $\pi$  hasta el colapso a  $\sim 35$  mN/m<sup>77,83</sup> y  $\sim 33$  mN/m<sup>48</sup> respectivamente, similares a nuestros resultados como se muestra en la Fig 3.2.

Una inspección mediante BAM de las monocapas de los anfifilos ASC<sub>14</sub>, HePC, Psy en una interfase aire/ solución salina mostró películas homogéneas durante toda la compresión, lo cual confirma la información obtenida de las isotermas (ver Fig 3.2) que indican que las mismas se encuentran en estado de fase LE. Para ASC<sub>16</sub> Benedini y col han observado presencia de dominios condensados con bordes afilados que sugieren un estado cristalino a pH ácido. A pH neutro se muestran como dominios ramificados y ondulados, en coexistencia con una fase LE, los cuales van creciendo sobre la compresión<sup>82</sup>. En la Fig 3.2 se puede observar el quiebre en la isoterma del ASC<sub>16</sub> confirmando la transición de fase LE-LC, acompañado de una región de coexistencia fases observada como un plateau, lo que concuerda con lo reportado por estos autores por BAM.

### **3.5 Conclusiones**

Los resultados obtenidos en este capítulo junto con antecedentes bibliográficos nos permitieron de manera comparativa caracterizar las propiedades de superficie y de autoorganización de los anfifilos empleados en esta tesis. A pH cercano a la neutralidad los ASC<sub>n</sub> debido a la ionización del grupo C3-OH del grupo ascórbico pKa = 4.2 se encuentran parcialmente cargado negativo; la HePC está Neutro (zwitteriónico), mientras que la Psy tiene grupo amino ionizable con un pka = 7.18 por lo que está parcialmente cargado positivo. En estas condiciones en solución acuosa estos anfifilos según su Pc tienden a autorganizarse en estructuras micelares, lamelares o en coexistencia con estas dos estructuras (observándose las diferentes poblaciones correspondientes a cada tipo de estructuras mediante estudios de DLS). A su vez mediante estudios de Adsorción de Gibbs estos anfifilos mostraron una alta actividad de superficie siendo capaces de disminuir la  $\gamma$  entre (34-45 mN/m). Teniendo en cuenta el

análisis de las isotermas de compresión de Langmuir y su visualización mediante BAM resaltamos que los anfifilos son estables en la interfase agua/aire excepto ASC<sub>12</sub>. Además presentan un estado de fase LE en todo el rango de  $\pi$  hasta el colapso, excepto para el ASC<sub>16</sub>, el cual se ha descrito presenta coexistencia de fase LE-LC <sup>82</sup>.

A partir de estos conocimientos, pudimos investigar la interacción de estos anfifilos con modelos de membrana biológicas: en sistemas de monocapas lipídicas previamente caracterizadas y bicapas.

## **Capítulo 4: Caracterización de las propiedades reológicas de las membranas lipídicas modelos.**

### **4.1 Introducción**

En esta tesis, la manipulación de la composición lipídica de las membranas modelos utilizadas nos permitió el control tanto de las propiedades físicas de continuo (estado de fases, compresibilidad, fluidez, electrostática de la película, etc...) de la microestructura de las membranas (presencia de dominios lipídicos en coexistencias de fases lateral). Con este propósito empleamos una amplia batería de compuestos lipídicos comerciales de alta pureza para la construcción de estructuras autoensambladas utilizadas como modelos de membrana.

Las fosfatidilcolinas (Fig 4.1 a-f) son lípidos zwitteriónicos muy abundantes en membranas celulares y cuando contienen al menos un doble enlace en sus cadenas representan el modelo de membrana más sencillo comúnmente utilizado, ya que presenta un estado de fase líquido-expandido (LE) en monocapas, equivalente a la fases  $L_{\alpha}$  en bicapas. Al agregar otros componentes mayoritarios de membrana plasmática como  $SM_{16}$  (Fig4.1i) y CHO (Fig 4.1o) se induce la formación de una fase (frecuentemente observado como dominios lipídicos) en estado líquido-ordenado (LO); la cual ha sido ampliamente reportada tanto en monocapas<sup>84</sup> como en bicapas <sup>85</sup>. Esta fase también ha sido propuesta como el estado de fase que presentan nanodominios funcionales en membranas celulares de mamíferos llamados "rafts"<sup>86</sup>. Además de CHO incluimos en nuestro estudio membranas conteniendo ergosterol (Erg), el más abundante esteroles encontrado en protistas como las Leishmanias (Figura4.1p), capaz también de inducir la formación de fase LO <sup>11</sup>.

Las membranas celulares contienen también lípidos con carga negativa a pH fisiológico <sup>11,87</sup>, lo cual provoca un potencial de doble capa con concentración superficial de cationes, entre ellos los  $H^+$ . Debido a este efecto el pH en las cercanías a las membranas (a distancias relevantes



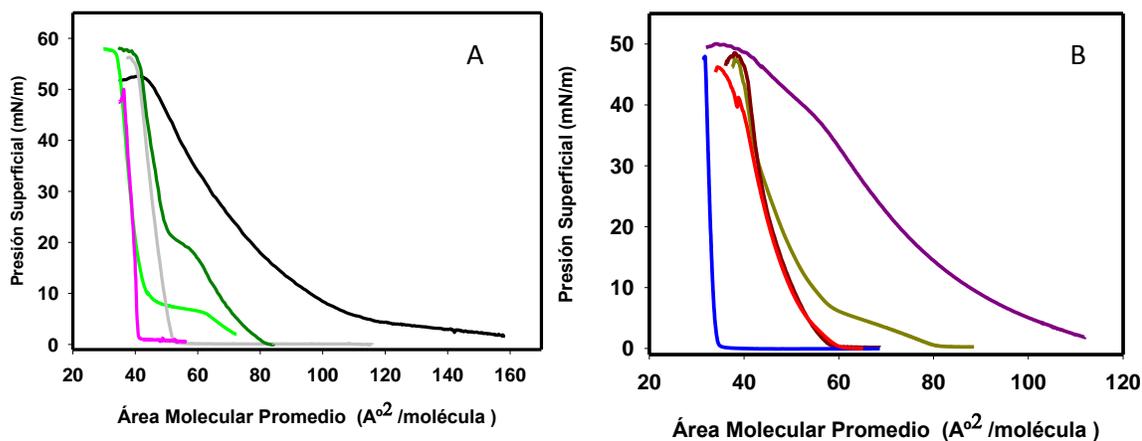
También utilizamos mezclas lipídicas que constituyen un sistema sencillo para simular las propiedades de membranas blanco de estos fármacos como el estrato corneo de piel (SC), en base a reportes recientes que validan un modelo simple de solo cuatro lípidos que simula las propiedades de barrera hidrofóbica del SC (SCM)<sup>88</sup>. Utilizamos una mezcla que contienen una ceramida y un ácido graso de cadena larga (lignoceril-ceramida Cer<sub>24</sub> y ácido lignocérico AL (Fig 4.1j,k), junto con CHO y colesterol-sulfato (CHO-S). De esta forma modelizaremos la incorporación de nuestros anfifilos bioactivos a un modelo simple que mimetiza las principales características hidrofóbicas y de barrera de la piel.

Por ultimo estudiamos una mezcla compleja de fosfolípidos, esfingolípidos y CHO que imita la composición lipídica de mielina (MM)<sup>48-50,89</sup>. Ésta es relevante en el estudio de la incorporación de Psy a membranas modelos en el contexto biológico de la enfermedad de Krabbe. Al estar presente en esta enfermedad un proceso desmielinizante, nuestros resultados contribuirían a la interpretación supramolecular del mecanismo de perturbación de biomembranas por Psy.

## 4.2 Propiedades reológicas de las monocapas lipídicas aceptoras.

Como modelos de membrana simples utilizamos monocapas de lípidos puros como POPC, DPPC, SM<sub>16</sub> y DSPC<sup>51,54,90,91</sup> y películas de CHO y ERG puros que muestran estados de fase conocidos y bien definidos. Las isotermas de compresión de dichas monocapas (Fig 4.2A) muestran características de LE, LC y S a  $\pi \geq 30$  mN / m, (SM<sub>16</sub> y DPPC sufren una transición de fase LE a LC a  $\sim 17$  y 7 mN / m respectivamente) de acuerdo con los datos bibliográficos<sup>51,54,90,91</sup>. Las monocapas formadas por esteroides presentaron estado de fase equivalente a la LO.

En el caso de las monocapas mezclas empleadas compuestas por DMPC: DMPS, así como la mezcla que muestra coexistencia de fases líquidas formada por DLPC: SM<sub>16</sub>: CHO 1:1:1 (LLC), SCM o MM las isotermas mostraron características LE y LO respectivamente (ver Fig 4.2B y tabla 4.1).



**Figura 4.2:** Isotherma de Compresión de Monocapas de Langmuir de las membranas aceptoras puras (A) y mezclas (B). Las curvas muestran experimentos representativos que varían en menos de 2 mN/m de sus réplicas correspondientes. Las membranas estudiadas son A) POPC (negro), DPPC (verde claro), DSPC (gris), SM<sub>16</sub> (verde oscuro) y CHO (magenta), B) DMPC: DMPS (violeta), MCC (POPC/SM<sub>16</sub>/CHO 25:25:50) (amarillo oscuro), LLC (DLPC/SM<sub>16</sub>/CHO 33:33:34) (marrón), SCM (Cer 24 /AL/CHO 33: 33: 33 con la adición de 5% m/ m de CHO-S) (azul) y MM (CHO 38% en moles; POPC 7% en moles; DOPE 19% en moles; DOPS 6% en moles; bSM 10% en moles; SULF, 5% en moles; Gal-Cer 15% en moles y GANG 1 mol% ) (rojo).

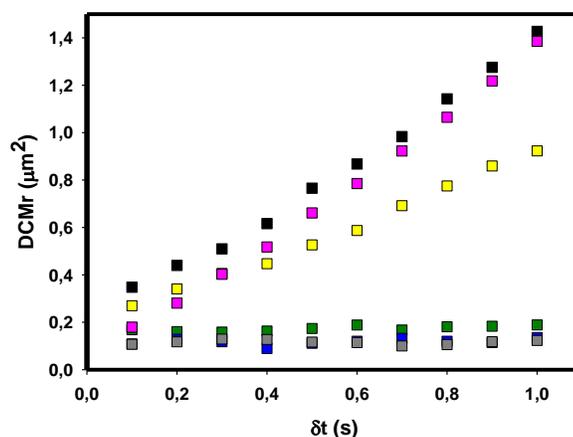
La asignación de un estado de fase a una monocapa lipídica ha estado generalmente basado en el estudio de su respuesta elástica a una tensión dilatacional (es decir, el módulo de compresibilidad  $C_s^{-1}$ )<sup>92</sup>. Para monocapas LE (como las formadas por POPC), una disminución en el área disponible induce un aumento relativamente bajo en  $\pi$ , lo que resulta en valores de  $C_s^{-1}$  bajos, típicamente  $<100$  mN/m<sup>92</sup>. Para las monocapas con estado de fase LC o S, se induce un aumento mayor en  $\pi$  ante una pequeña reducción del área de la monocapa, lo que conlleva a valores de  $C_s^{-1}$  varios ordenes de magnitud más altos en comparación con monocapas POPC (Tabla 4.1).

En este sentido los primeros estudios realizados empleando isothermas de compresión de monocapas puras de CHO han reportado que son películas altamente incompresibles<sup>51</sup> (con altos valores de  $C_s^{-1}$ , ver Tabla 4.1), que se han descrito en los años 60 como “películas

bastante condensadas”<sup>92</sup>. Posteriormente, se visualizó la coexistencia de fase líquido-líquido mediante microscopía de fluorescencia en monocapas que contenían CHO<sup>93,94</sup>.

Estos estudios también han reportaron que el CHO induce un efecto de licuefacción en monocapas sólidas de fosfolípidos<sup>95</sup>, lo cual está en concordancia con estudios más recientes donde se ha demostrado que las monocapas que lo contienen se comportan como fluidos viscosos<sup>96</sup>, y se le asigna un carácter fluido a esas bicapas<sup>7</sup>. Luego, por analogía con la fase líquida ordenada informada para bicapas que contienen altas cantidades de CHO<sup>97,98</sup>, la fase más gruesa enriquecida en CHO en coexistencia con la fase LE encontrada en monocapas también se le denomina fase LO<sup>84,96</sup>.

En esta tesis estudiamos las propiedades de viscosidad de cizalla de diferentes monocapas lipídicas, incluidas las monocapas de CHO puro empleando microesferas de látex como se describió en el capítulo 2.2.4. La Fig 4.3 muestra el desplazamiento cuadrático medio relativo (DCMr) de las microesferas de látex insertadas en monocapas con diferente composición lipídica en función del intervalo de tiempo. A partir de la pendiente de estas curvas en la región lineal se calculó D utilizando la Ec.2.4, como se describió en materiales y métodos.



**Figura 4.3:** Seguimiento de partículas individuales de microesferas de látex en diferentes monocapas. Desplazamiento cuadrático medio relativo (DCMr) frente a intervalos de tiempo ( $\delta t$ ) para microesferas de  $3 \mu\text{m}$  en monocapas lipídicas a  $30 \text{ mN/m}$ . Los datos corresponden a experimentos representativos. A partir del análisis de 40 trayectorias de este tipo, los datos estadísticos de D se calcularon para cada película de lípidos y se

informaron en la Tabla 3.1. Las monocapas estudiadas estaban compuestas de POPC (negro), SM<sub>16</sub> (verde), DSPC (gris), CHO (magenta), MCC (amarillo), y SCM (azul).

A partir de estos experimentos es evidente que las monocapas de DSPC y SM<sub>16</sub> (fases S y LC) tienen una difusión lateral muy restringida (en comparación con las monocapas compuestas por POPC y CHO) dando valores de  $D$  inferiores a  $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$  (ver Fig 4.3 y Tabla 3.1). Estos valores concuerdan con los informados en la literatura para monocapas LC ( $1 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2 / \text{s}$ )<sup>54</sup>. Por otra parte, las monocapas LE compuestas de POPC presentan valores de  $D$  similares a los obtenidos a las monocapas de CHO (en el orden de  $10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) evidenciando una baja viscosidad de cizalla para ambas monocapas. Este resultado coincide con reportes previos en los cuales se les asignó un carácter más viscoso a monocapas de DSPC en relación a las de CHO<sup>95</sup>. Por lo tanto, se puede asignar un carácter LO a monocapas puras de CHO en función de su baja compresibilidad (alto  $C_s^{-1}$ ) y su alta movilidad lateral.

Cabe señalar que los resultados obtenidos para esta monocapa no se extrapolan a sistemas de bicapas porque el CHO puro no forma estructuras lamelares. Por ende se incluyó en el estudio una mezcla ternaria representativa de mezclas que contienen colesterol (LLC) formada por DLPC / SM<sub>16</sub> / CHO (1: 1: 1), que se ha descrito como formadora de fases LO tanto en sistemas de bicapa como en monocapa<sup>84,85,96</sup>.

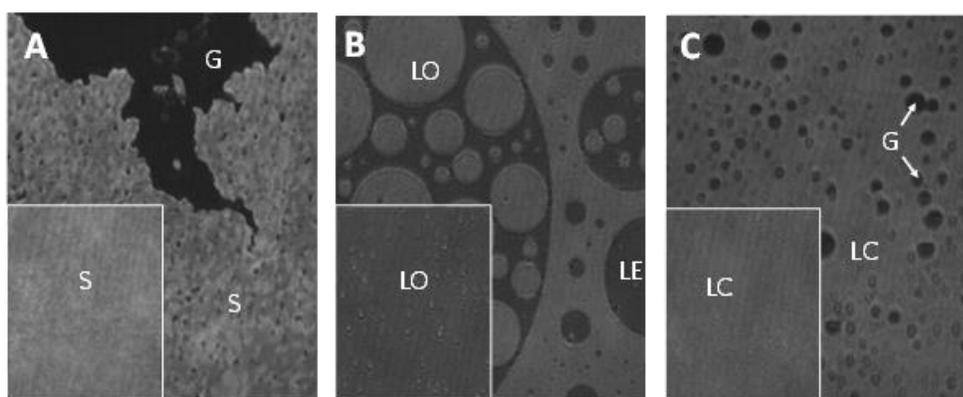
Mezclas ternarias conteniendo CHO han sido de interés general en las últimas dos décadas desde que se propuso que los dominios LO están presentes en células vivas<sup>99</sup>. La Figura 4.2B muestra la isoterma de compresión de la membrana MCC, la cual mostró coexistencia de fase LE-LO por BAM a  $\pi \leq 6 \text{ mN} / \text{m}$  y una fase homogénea por encima de este valor de presión (Fig 4.4B). También se puede observar un quiebre en la isoterma de compresión en la transición de dos fases a una. Nuestro análisis reológico para MCC mostró valores de  $C_s^{-1}$  más bajos que las membranas de CHO puro pero más altos que los obtenidos para monocapas LE a  $30 \text{ mN} / \text{m}$  (Tabla 3.1),<sup>84</sup> manteniendo una alta capacidad de difusión (Fig 4.2 y Tabla 4.1).

**Tabla 4.1:** Caracterización de las propiedades reológicas de las membranas lipídicas aceptoras

Composición Lipídica	Caracterización Reológica de las Monocapas lipídicas		
	<sup>a</sup> Cs <sup>-1</sup> (mN/m)	<sup>b</sup> D(μm <sup>2</sup> /s)	<sup>c</sup> Estado de fase
POPC	83 ± 9	0.3± 0.2	LE
DPPC	270±20	nd	LC
DSPC	257 ± 20	< 1x10 <sup>-2</sup>	S
SM <sub>16</sub>	162 ± 29	< 1x10 <sup>-2</sup>	LC
CHO	358 ± 37	0.2± 0.1	LO
ERG	458 ±39	0.2± 0.1*	LO
DMPC:DMPS	73 ± 7	nd	LE
MCC	142 ± 7	6±3 x10 <sup>-2</sup>	LO
LLC	351 ± 22	nd	LO
SCM	272 ± 40	< 1x10 <sup>-2</sup>	LC
MM	174 ± 9	nd	LO

**a** Evaluado a 30 mN/m. El error representa SEM de 2-3 experimentos independientes. **b** Evaluado a 30 mN/m. El error representa desviación estándar de 40 trayectorias individuales analizadas de 3 experimentos independientes. Calculado después de la ecuación 8 descrita en materiales y métodos. **c** Estado de fase estimado para monocapas lipídicas basadas en Cs-1, D y datos de microscopía (Fig 4.4). \* Dato obtenido de Ref <sup>100</sup>. Abreviaturas de las monocapas mezclas empleadas : POPC/SM16/CHO 25:25:50 (**MCC**), DLPC/SM16/CHO 33:33:34 (**LLC**); Cer 24 /AL/CHO 33: 33: 33 con la adición de 5% m/ m de CHO-S (**SCM**) y CHO 38% en moles; POPC 7% en moles; DOPE 19% en moles; DOPS 6% en moles; bSM 10% en moles; SULF, 5% en moles; Gal-Cer 15% en moles y GANG 1 mol% (**MM**). nd: significa no determinado.

Por otro lado las membranas con estados de fases LC o S, mostraron una baja compresibilidad (valores altos de  $C_s^{-1}$ )<sup>92</sup> y una difusión lateral restringida (Tabla 4.1). Sin embargo, las fases LC son fases líquidas con carácter viscoelástico ante perturbaciones tipo cizalla<sup>96</sup>. Así, en presencia de coexistencia con una fase más fluida (como la fase LE) la fase LC forman dominios redondeados o similares a una flor para equilibrar la repulsión intradominio / tensión de línea presentes (como ha sido observado en dominios de  $SM_{16}$ )<sup>101</sup>.



**Figura 4.4:** Imágenes representativas de monocapas aceptoras en las cuales se evidencian los diferentes estados de fase mediante microscopía de ángulo de Brewster. Las monocapas están compuestas de (A) DSPC puro, (B) membrana que contiene CHO (MCC) y (C) membrana que imita el estrato córneo (SCM). Las imágenes se obtuvieron a bajo  $\pi$  ( $<1$  mN / m). Las inserciones muestran las mismas películas a 30 mN/m. Las imágenes son representativas de 5-7 imágenes de dos experimentos independientes. Para una mejor visualización, se seleccionó el rango inferior de nivel de gris (rango de 0-80, desde una escala original de 0-255). Las letras se refieren al estado de fase de la película: G (gas), LE (fase expandida líquida), LO (fase ordenada líquida), LC (fase condensada líquida) y S (sólido). Las imágenes principales son  $250 \times 200 \mu\text{m}$  y las inserciones son  $125 \times 100 \mu\text{m}$ .

Las fases S se caracterizan por una estructura interna regular y un alto módulo de compresibilidad<sup>13,96</sup> que restringen la relajación de los bordes del dominio y se observan en la escala de micras como estructuras de bordes afilados (ver los bordes de la fase sólida DSPC cuando está en coexistencia con una fase gaseosa (G) en la Fig 4.4A y Ref<sup>102</sup>, y monocapas de Cer en la Ref<sup>103</sup>).

Por otro lado, la membrana mezcla que capturó nuestro interés fue SCM. Esta monocapa cuaternaria compuesta por una mezcla equimolar de Cer24, ácidos grasos libre y CHO, más

5% p / p de CHO-S, ha sido previamente estudiada por Skolova y col encontrando que contenía una alta proporción de estructura ortorrómbica (sólida) cuando se transfirió a un soporte sólido y analizó por FTIR/AFM <sup>88</sup>. Nosotros extendimos este análisis a las propiedades reológicas y estructurales de la monocapa en la interfaz solución salina/aire. Las isothermas de compresión y las propiedades de difusión de las monocapas de SCM evidenciaron un comportamiento LC (ver Tabla 4.1). En concordancia, la inspección de BAM mostró bordes de dominio redondeados cuando coexistían con una fase G (Fig 4.4C, a bajas  $\pi$ ). Ésto se asemeja mucho a la coexistencia de fases fluidas (Fig 4.4B) y no a una coexistencia de fases S-G (Fig 4.4A). Por lo tanto nuestros estudios sugieren que en la interfaz solución salina/aire las monocapas SCM se comportan como una fase LC, a diferencia de una fase S, como se ha propuesto anteriormente para esta membrana cuando se organiza sobre un soporte sólido <sup>88</sup>.

Por otro lado, la visualización por BAM de las monocapas de SCM en la interfaz solución salina / aire a alta  $\pi$  (30 mN /m) la mostraron como una película homogénea (Fig4.4C), mientras que en los estudios de AFM de películas SCM transferidas a soportes sólidos se encontró coexistencia de fases <sup>88,104,105</sup>. La diferencia entre los reportes anteriores y los resultados que se muestran aquí puede deberse a una estabilización de la fase más ordenada, promovida por el soporte sólido <sup>106</sup>. Además, es posible que la coexistencia de fase estuviese presente en las monocapas SCM pero con dominios muy pequeños (más pequeños que la resolución de BAM, que es  $\sim 0,2\mu\text{m}$ ).

Finalmente, estudiamos otra mezcla compleja que capturó nuestro interés y es la membrana que mimetiza la composición de los lípidos de mielina (MM). Ésta presentó valores relativamente altos de  $C_s^{-1}$ (ver tabla 4.1), una característica típicamente observada en membranas con un alto contenido de CHO que presentan fases LO <sup>49</sup>. Una inspección de los imágenes de BAM de esta membrana mostró coexistencia de fase LE y una fase más brillante con dominios redondeados a bajas  $\pi$ , similar a lo observado en la membrana que contiene CHO (MCC) y a lo reportado para extractos lipídicos de mielina <sup>107</sup>(ver Fig 4.4B). Este patrón es típico de la coexistencia de fases líquidas y la fase más brillante corresponde a la fase

enriquecida con CHO. Tras la compresión, las fases se fusionaron a la presión de miscibilidad ( $\pi_m$ ), probablemente debido a la reducción de la brecha composicional y aumento de miscibilidad de los componentes <sup>84</sup>, lo que resultó en una película homogénea.

Como se esperaba para una monocapa que contiene una alta proporción de CHO, su isoterma de compresión mostró una abrupta pendiente casi vertical por encima de su  $\pi_m$ , revelando una organización de superficie compacta (Fig 4.2B). Este comportamiento coincide con el observado para las películas de Langmuir formadas por membranas extraídas de mielina <sup>49,107</sup>.

### 4.3. Conclusiones

Las propiedades de una membrana compleja no pueden resumirse en la suma de sus componentes químicos, sino que posee propiedades emergentes que debe estudiarse y comprenderse en la meso y macroescala, bajo conceptos de materia blanda como propusimos en este capítulo. Para alcanzar ese grado de comprensión hemos utilizado las monocapas de Langmuir como modelo de una membrana biológica. Éstas han sido de gran utilidad para el estudio de propiedades físicas de biomembranas desde hace un siglo. Nuestros resultados empleando este sistema nos permitió la asignación de un estado de fase a una monocapa lipídica basándonos en su respuesta elástica a la tensión de dilatación (es decir, el módulo de compresibilidad,  $C_s^{-1}$ ) y las propiedades de viscosidad de cizalla comparando la difusión bidimensional de las microesferas de látex en el plano de la monocapa <sup>108</sup>. Un valor bajo de  $C_s^{-1}$  indica que la película lipídica es fácilmente compresible, un comportamiento típico de las monocapas LE <sup>109</sup>. Las monocapas LO, LC y S muestran un  $C_s^{-1}$  más alto (ver Tabla 4.1) pero con diferentes propiedades de difusión: los componentes de las membranas LO tienen una dinámica de difusión lateral tan alta como en una fase LE<sup>91</sup>, mientras que los lípidos en la fase LC difunden más lentamente y los dominios muestran bordes redondeados. En contraste, los lípidos en la fase S tienen una dinámica lateral severamente restringida y los dominios S muestran bordes irregulares<sup>108</sup>.

Con la información obtenida combinando estas diferentes metodologías pudimos asignar un determinado estado de fase a cada una de membranas modelos de estudio. Lo cual constituyó un primer paso para abordar de manera profunda el entendimiento de las propiedades físicas de estas membranas y establecer las diferencias en estos sistemas modelos. Esto permite avanzar con el objetivo de estudiar las diferencias en la capacidad de estos sistemas de incorporar algunos anfifilos, así como adquirir información complementaria de los factores que regulan la interacción anfifilo-membrana y las consecuencias en las propiedades resultantes.

## **Capítulo 5: Interacción de los anfifilos con monocapas lipídicas**

### **5.1. Introducción**

Las bases fisicoquímicas que rigen el fenómeno de inserción de moléculas anfitrópicas de moderada solubilidad en agua (como los anfifilos propuestos en esta tesis) a biomembranas no estaban claramente dilucidadas al comienzo de esta tesis. Este fenómeno es de vital importancia tanto para la acción farmacológica de una gran cantidad de fármacos como para distintos eventos que rigen la función celular.

El estudio de penetración en monocapas lipídicas por anfifilos solubles ha sido ampliamente usado para caracterizar la interacción de proteínas periféricas a biomembranas <sup>110</sup>. Sin embargo no había un estudio sistemático de la dependencia de estas interacciones o inserciones con el estado físico de la membrana y/o de la presencia de dominios lipídicos (coexistencia de fases). En esta tesis nos propusimos utilizar moléculas anfifílicas de bajo peso molecular (como los fármacos/anfifilos en cuestión) para explorar esta pregunta. Para ello aprovechamos nuestros conocimientos sobre la estructura y propiedades reológicas de mezclas lipídicas autoorganizadas en la interfase agua/aire, estudiadas previamente <sup>84</sup>.

Por lo tanto el objetivo de este capítulo es estudiar las diferencias en la capacidad de sistemas modelo de membranas biológicas con distintas propiedades estructurales y reológicas de incorporar compuestos anfifílicos. A su vez, investigar los cambios inducidos sobre las propiedades biofísicas, estructurales y dinámicas de membranas aceptoras por la interacción con estas moléculas.

### **5.2 Cambios en las propiedades de monocapas lipídicas con diferentes características reológicas y estados de fase luego de la incorporación de los anfifilos.**

En el capítulo 3 mostramos resultados y datos bibliográficos que evidencian que las moléculas anfifílicas empleadas en esta tesis tienen la capacidad de autorganizarse en

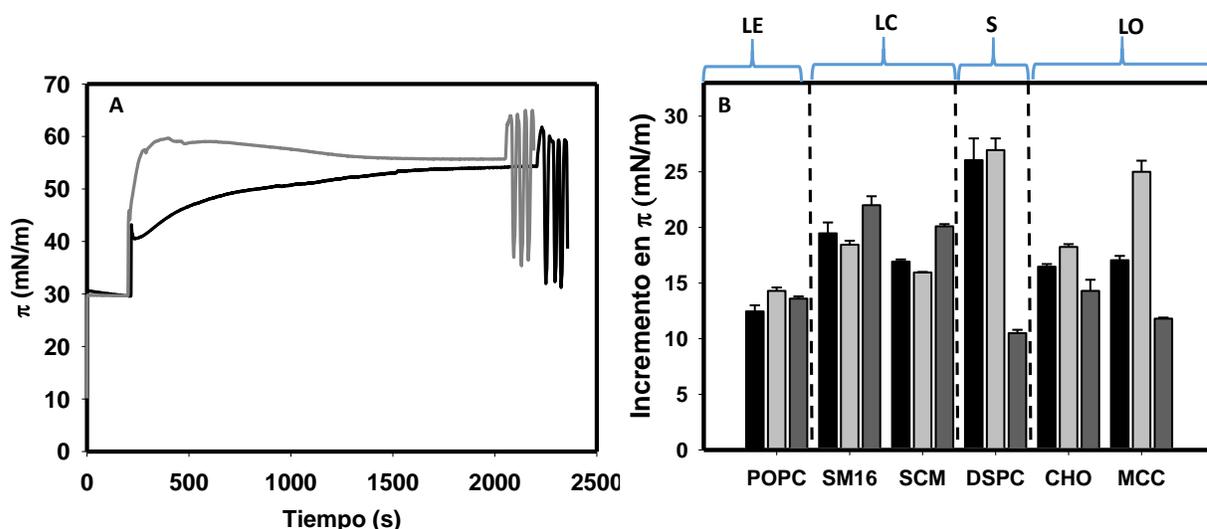
agregados micelares o lamelares, una vez se inyecta en la subfase de una solución salina en concentraciones en el orden de los micromolares. Los mismos se adsorben rápidamente a la interfase de la solución salina/ aire; disminuyendo la  $\gamma$  (o incrementando la  $\pi$ ) alcanzando una  $\pi \sim 30\text{-}39$  mN/m en el equilibrio. Sin embargo, cuando una monocapa de lípido se coloca previamente en la interfase, estos anfifilos pueden penetrar la membrana alcanzando presiones superficiales más altas <sup>27</sup>. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos evaluar la capacidad de estos anfifilos para incorporarse en monocapas de diferente carácter reológico (previamente caracterizadas, ver capítulo 4). Para este propósito, realizamos experimentos de penetración de monocapas lipídicas (ver la Fig 2.2 en Materiales y métodos para un experimento representativo).

A partir de estos ensayos, determinamos los valores de  $\pi$  obtenidos después de la inserción de ASCn o HePC en las monocapas lipídicas ( $\pi_{\text{eq}}$ ). La Fig 5.1B muestra que ASC<sub>16</sub> y ASC<sub>14</sub> pueden aumentar la  $\pi$  de una monocapa sólida, como la formada por DSPC puro de 30 a 55-57 mN/m, es decir  $\sim 13$  mN/m más que cuando penetran en monocapas POPC. Los valores de  $\pi_{\text{eq}}$  representan un aumento total de  $\pi$  de hasta 27 mN/m y una disminución de la  $\gamma$  a valores tan bajos como 15 mN/m. Además, vale la pena señalar que la  $\pi_{\text{eq}}$  alcanzadas para esas monocapas fue  $\sim 20$  mN/m mayor que las alcanzadas cuando los ASCn se adsorben a una interfaz de solución salina/aire. La incorporación de los mismos en monocapas de SM<sub>16</sub> puro, que forman una fase LC, mostró un comportamiento intermedio entre los observados para monocapas de DSPC y POPC.

Por otro lado, cuando los ASC<sub>16</sub> se incorporan a una monocapa fluida que contiene CHO (CHO puro y MCC) la  $\pi_{\text{eq}}$  alcanza valores apenas superiores a los obtenidos con POPC. Cabe destacar que la incorporación de ASCn en monocapas SCM, que muestran un carácter LC (en relación con la  $C_s^{-1}$  y la difusión lateral) se asemeja a los valores obtenidos para las películas fluidas y no mostró altos valores de  $\pi_{\text{eq}}$  observados para las monocapas DSPC sólidas (consulte la Fig 5.1B).

En el caso de los valores de  $\pi$  alcanzados luego de la inserción de la HePC en las diferentes monocapas encontramos que el fármaco puede aumentar la  $\pi$  en 10–23 mN/m en monocapas

lipídicas que inicialmente mostraban una  $\pi$  de 30 mN/m. El mayor efecto se obtuvo para membranas con carácter LC (SM<sub>16</sub> y SCM), cuyo incremento en  $\pi$  alcanza el doble del observado en el resto de las membranas. Nuestros resultados muestran que el aumento en  $\pi$  sigue aproximadamente el orden LC > LO > LE > S para HePC (Fig 5.1B). El aumento de  $\pi$  de ~ 14 mN/m para la inserción de HePC en monocapas de POPC y ERG se aproxima a los valores reportados previamente de 12 mN/m<sup>77</sup>, y por lo tanto, de estos datos podemos inferir que ocurre una incorporación similar para ambas monocapas (que no es el caso, como discutiremos a continuación).



**Figura 5.1:** Inserción de ASCn o HePC a monocapas con diferentes características reológicas a 30 mN/m. (A) Curvas representativas de penetración de ASC<sub>16</sub> (línea negra) o ASC<sub>14</sub> (línea gris) en monocapas puras de DSPC. La inserción en el panel A muestra la compresión / expansión consecutiva de una monocapa representativa después de la inserción ASCn. (B) Valores de incremento en  $\pi$  después de la inserción de los anfifilos en las monocapas aceptoras. ASC<sub>16</sub> (barras negras), ASC<sub>14</sub> (barras grises claro) y HePC (barras gris oscuro). Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Las letras indican las diferentes fases de las membranas aceptoras: LE (liquido-expandido); LC (liquido-condensado); S (sólido) y LO (liquido-ordenado).

Es importante señalar que varios estudios han explorado la interacción superficial entre HePC y esteroides en comparación con la interacción HePC-fosfolípido mediante el uso de películas de Langmuir<sup>77,79,111,112</sup>. Esos estudios no exploraron la inserción de HePC desde la subfase acuosa (estudios de penetración), para los mismos emplearon monocapas mezclas con coexistencia lateral en la interfaz aire/agua durante el tiempo experimental. A partir de esos trabajos, se observó una interacción favorable de HePC y esteroides, basándose en el hallazgo

de un efecto de condensación del área molecular y un exceso favorable de energía libre de mezcla. Estas fuertes interacciones laterales atractivas entre CHO y HePC se entendieron como la formación de un complejo de superficie, como consecuencia de una geometría molecular complementaria de las moléculas que interactúan: HePC posee una forma cónica, que en combinación con CHO, una molécula en forma de cono invertido, garantiza una compactación favorable de la monocapa mezcla<sup>79</sup>.

Nuestros resultados no demostraron que esta interacción lateral favorable con HePC-esterol influyera en la incorporación del monómero HePC (de la subfase acuosa) en monocapas que contienen esteroides, en condiciones de equilibrio. Por ende, exploramos más a fondo si la presencia de esteroides (y en general las propiedades reológicas de las membranas) alteran la dinámica de la inserción de HePC en las mismas.

Con el objetivo de estudiar la cinética de inserción no solo de HePC sino también de los ASCn en las membranas de diferentes características reológicas cuantificamos el parámetro  $t_{50}$ . El mismo se obtuvo a partir de las curvas de tiempo para la penetración de los anfifilos (a las monocapas lipídicas aceptoras) ajustando la Ec. 2.3. La Fig 5.2A indica que los ASCn mostraron una cinética de inserción más lenta para las monocapas condensadas o sólidas que para las fluidas (notar la ruptura en la escala del eje Y). Además, ASC<sub>16</sub>, el fármaco que forma monocapas LC cuando está puro a  $\pi > 25$  mN/m<sup>82</sup> indujo un  $\pi_{eq}$  similar pero con un  $t_{50}$  más grande que el ASC<sub>14</sub> para todos los casos estudiados. Las diferencias observadas pueden deberse a las diferentes propiedades reológicas que resultan en la monocapa enriquecida con estos fármacos.

En el caso de HePC calculamos otro parámetro cinético  $t_{50}$  a partir de las curvas de desorción de monocapas saturadas con HePC (estudios de titulación superficial, ver capítulo 2.2.3). Como se muestra en la figura 5.2 B las monocapas más fluidas mostraron una cinética de adsorción / desorción más rápida que las membranas condensadas. La desorción lenta encontrada en membranas que contienen esteroides puede estar relacionada con las fuertes interacciones laterales entre el CHO o ERG con HePC cuando coexisten en el plano de la membrana<sup>77,79,111,112</sup>. La diferencia de casi dos órdenes de magnitud en los parámetros cinéticos

de adsorción / desorción implican una estabilización de las moléculas de HePC incorporadas en membranas ricas en esteroides.

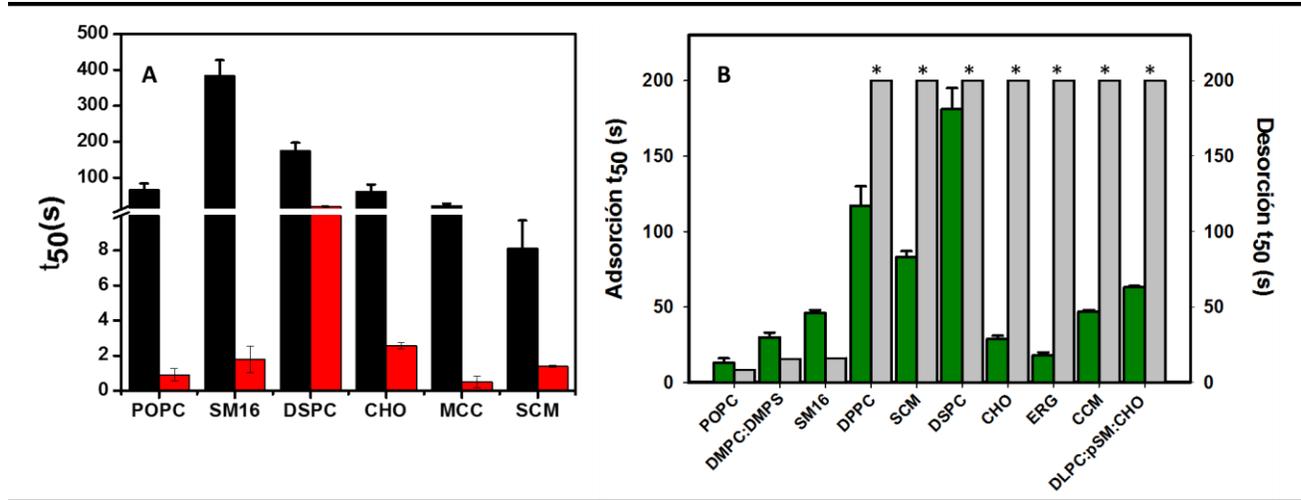


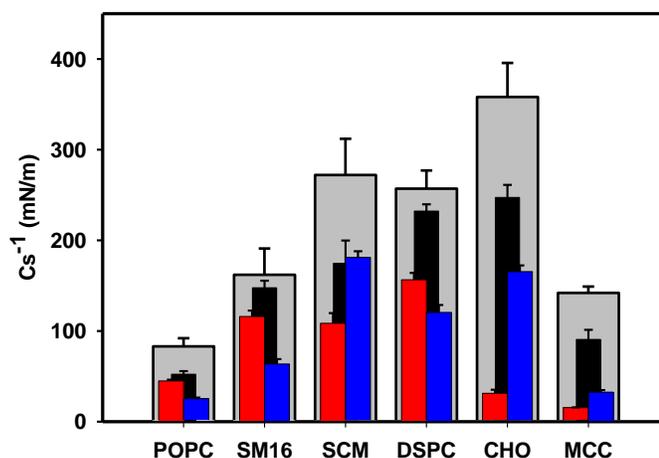
Figura 5.2: Parámetros cinéticos determinados a partir de los estudios de penetración de ASC<sub>n</sub> y HePC en monocapas de diferentes características reológicas a una  $\pi = 30$  mN/m. (A) Cinética de inserción de ASC<sub>n</sub> en monocapas aceptoras expresado como  $t_{50\%}$ . Las barras representan los valores después de la inserción de ASC<sub>16</sub> (negro) o ASC<sub>14</sub> (rojo). (B) Parámetros cinéticos de la inserción de HePC en las monocapas aceptoras: las cinéticas de adsorción (barras negras) y desorción (barras grises) se calcularon ajustando una función hiperbólica del curso temporal de la penetración de HePC y la relajación después de la saturación de la superficie, respectivamente.  $t_{50}$  representa el tiempo para alcanzar el 50% del proceso de adsorción o desorción. Los asteriscos indican un valor de  $t_{50} > 1200$  s y las barras de error corresponden al error estándar de la media.

En concordancia con nuestros resultados, se ha informado una desorción lenta para un fármaco de la familia de los alquilfosfolípidos y estructuralmente similar a HePC, la edelfosina, cuando está enriquecida en liposomas conteniendo CHO en comparación con liposomas de fosfolípidos<sup>113</sup>. Esto fue interpretado como una consecuencia de una forma molecular complementaria que favorece la estabilidad de las bicapas planas. Estos autores han relacionado este efecto con la actividad hemolítica de la preparación binaria.

Para evaluar cómo los anfifilos alteran las propiedades de la película cuando se incorporan a la membrana, comparamos el parámetro  $Cs^{-1}$  de las películas antes y después de alcanzar  $\pi_{eq}$  (Fig 5.3). Los últimos valores de  $Cs^{-1}$  se obtuvieron mediante la compresión /expansión de la película equilibrada con los anfifilos en la subfase varias veces, y calculando

la pendiente de la gráfica  $\pi$  versus área durante cada compresión (vea el recuadro en la Fig 2.2) y empleando la Ec. 2.3.

Nuestros resultados indican que después de la incorporación de ASC<sub>14</sub>, las películas se hicieron más fácilmente compresibles para todas las monocapas probadas pero con un efecto notable en las películas que contienen CHO (CHO puro, MCC y SCM). También se puede observar un comportamiento similar para ASC<sub>16</sub> pero en menor medida. Este efecto puede estar relacionado con una inserción más favorable de ASC<sub>14</sub> en comparación con ASC<sub>16</sub>. La reducción en el carácter condensado y en las fuerzas intermoleculares de cohesión, probablemente disminuyan la energía requerida para comprimir lateralmente la monocapa e insertar nuevas moléculas de fármaco una vez que se haya incorporado una cantidad determinada.



**Figura 5.3:** Comparación de los medios del módulo de compresibilidad ( $Cs^{-1}$ ) de las monocapasceptoras en ausencia (barras gris) y después del equilibrio con los anfifilos en la subfase. Las barras negras corresponden a ASC<sub>16</sub>, las barras rojas a ASC<sub>14</sub> y las barras azules a HePC a una presión superficial de 30 mN/m. Las barras de error en todos los gráficos corresponden al error estándar de la media (SEM) de experimentos por triplicado.

Cabe señalar que estos anfifilos pueden insertarse en monocapas lipídicas a una  $\pi=30$  mN/m, una presión a la que se propone similar densidad que la bicapas fosfolipídicas<sup>114</sup>. En este sentido HePC altera las propiedades de la película cuando se incorpora a la membrana, como es evidente al comparar el parámetro  $Cs^{-1}$  de las películas antes y después de que el proceso de penetración alcanzara el equilibrio. Nuestros resultados muestran que HePC tiene la capacidad de convertir las películas en monocapas más compresibles en todos los casos. Esta disminución fue aproximadamente del 50% en todas las membranas estudiadas, con la

excepción de las películas DMPC: DMPS y SCM. Esas monocapas aniónicas mostraron una mayor resistencia a la compresión (la disminución de  $Cs^{-1}$  fue solo 30 a 35%), probablemente debido a la repulsión electrostática en el plano dado por una alta densidad de cargas negativas. Como se comentará más adelante, este efecto también explica una inserción más escasa de HePC en membranas cargadas negativamente. Esta disminución de  $Cs^{-1}$  inducida por HePC está de acuerdo con informes anteriores que apoyan un aumento de la fluidez de la membrana celular después de la incorporación del fármaco <sup>80,115,116</sup>.

En el caso de la Psy empleamos tres membranas modelos (POPC, DPPC y MM), representativas de tres estados de fases LE, LC y LO. En general observamos una disminución en los valores  $Cs^{-1}$  en todos los casos de manera similar a los resultados obtenidos para HePC y ASCn. Siendo este efecto más marcado en membranas de DPPC puro que disminuyó los valores de  $Cs^{-1}$  de  $227 \pm 3$  a  $94 \pm 4$  mN/m (25% en moles de Psy) a  $\pi = 30$  mN/m. (ver tabla 5.2).

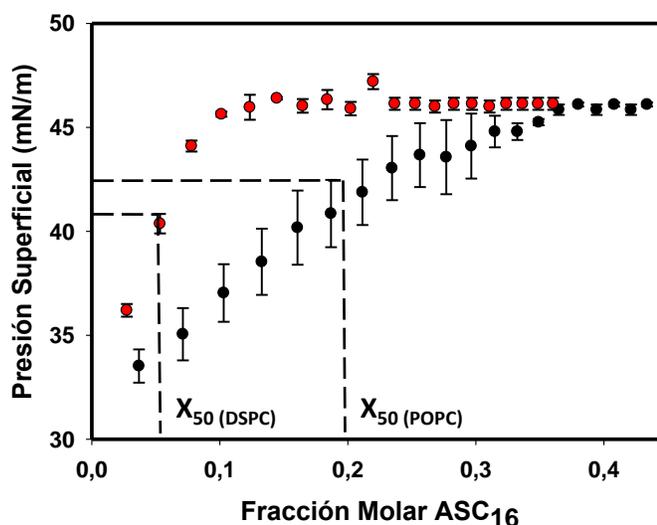
### **5.3 Estimación de la cantidad de anfifilo incorporado en monocapas lipídicas de diferentes características reológicas.**

Nuestra hipótesis de trabajo plantea que la magnitud en que  $\pi$  aumenta como consecuencia de la inserción de los anfifilos en las monocapas lipídicas podría depender de al menos dos factores, (i) la cantidad de fármaco incorporado en la película lipídica y (ii) la sensibilidad/ respuesta de la película lipídica luego de la incorporación del anfifilo, es decir, de las propiedades mecánicas de la monocapa aceptora. Este último factor debe regirse por las respuestas de compresión y deformabilidad de la membrana aceptora. Para explicar por separado ambos términos, es necesario determinar la capacidad de las diferentes membranas lipídicas para incorporar estos anfifilos.

Con el propósito de estimar la capacidad de captación de anfifilos a las monocapas lipídicasceptoras a 30 mN/m realizamos estudios de titulación superficial. Para ello esparcimos una cantidad conocida de lípidos en la superficie de la solución salina (área de la monocapa constante) hasta 30 mN/m. Luego gota a gota añadimos una solución clorofórmica

de los anfifilos de interés (ver capítulo 2.2.3) y registramos el aumento  $\pi$  resultante después de la evaporación del solvente.

Para todos los sistemas de membrana/anfifilo estudiados, se alcanzó un valor de  $\pi$  de saturación, es decir que no aumentó la presión con mayor adición de anfifilo. Luego, determinamos la fracción molar de ASC<sub>n</sub> a la cual la  $\pi$  alcanzada fue del 50% de la  $\pi$  de saturación ( $X_{50}$ ) (ver Fig 5.4). Nuestros resultados se resumen en la Tabla 5.1. Como observación general, ASC<sub>14</sub> se incorporó en mayor proporción que el ASC<sub>16</sub>, y esto a su vez depende de las propiedades reológicas de la película lipídica.



**Figura 5.4:** Titulación de superficie de monocapas por adición de ASC<sub>n</sub>. Curvas representativas de la  $\pi$  alcanzada después de la adición gradual de ASC<sub>16</sub> en DSPC (símbolos rojos) o POPC (símbolos negros) inicialmente puros a 30 mN/m en función de la fracción molar resultante de ASC<sub>16</sub>. Las líneas discontinuas ilustran la fracción molar necesaria para alcanzar el 50% de la saturación en  $\pi$  ( $X_{50}$ ).

Las monocapas de POPC, con carácter neto LE, pudieron incorporar hasta 20 y 30% en moles de ASC<sub>16</sub> o ASC<sub>14</sub> antes de alcanzar una  $\pi$  correspondiente al 50% de la presión de saturación, mientras que DSPC, nuestra monocapa más condensada solo pudo incorporar <10 mol% de ASC<sub>n</sub>. SM<sub>16</sub> mostró un comportamiento intermedio para todos estos parámetros. Por lo tanto, nuestros resultados del estudio de monocapas que no contienen CHO y que muestran

un creciente carácter condensado en el orden POPC < SM<sub>16</sub> < DSPC (LE < LC < S), mostraron una correlación inversa con la capacidad de incorporar ASCn.

Por otro lado, las películas que contienen CHO mostraron un aumento moderado de  $\pi$  (en comparación con DSPC) después de la penetración de ASCn (15-18 mN / m) ver Fig 5.1, independientemente de si las películas se comportan como fases LO o LC con respecto a su fluidez. Este hecho puede explicarse por una capacidad de absorción de ASCn muy escasa ( $X_{50} \leq 0.04$  y para las tres películas de lípidos exploradas (CHO puro, MCC y SCM).

En la Tabla 5.1 se muestran los resultados de la capacidad de incorporación de HePC a monocapas lipídicas a 30 mN/m evaluado mediante los experimentos de titulación superficial. Se muestra la fracción molar de HePC necesaria para lograr una saturación del 50%  $\pi$  ( $X_{50}$ ). Estos resultados indican claramente que un gran aumento en  $\pi$  no es necesariamente indicativo de una mayor incorporación del fármaco en dichas monocapas. Las membranas con carácter LE mostraron un aumento  $\pi$  más pequeño que las membranas LC pero alcanzaron la mayor incorporación reflejada en los altos valores de  $X_{50}$  (0.18-0.28). Mientras que las membranas con estado de fase S mostraron el menor aumento en  $\pi$  y una inserción pobre de HePC. La presencia de una membrana con carga negativa aparece como un factor inhibitorio para la incorporación de HePC. Esto puede explicarse como el resultado de una repulsión electrostática que se opone a la compresión lateral de las moléculas aniónicas por la molécula de fármaco entrante. Por otro lado, las membranas que contenían esteroides mostraron un comportamiento intermedio con poca incorporación del fármaco.

Además calculamos la fracción molar del HePC a presión de equilibrio, asumiendo un comportamiento de mezcla ideal para el sistema de fármaco / lípido como se describe en la Ref <sup>78</sup> y se obtuvo resultados con una tendencia similar a los obtenidos para  $X_{50}$  para las diferentes monocapas (datos no mostrados).

Tabla 5.1 Estimación de la cantidad de anfifilo incorporado en monocapas lipídicas de diferentes características reológicas expresado como  $X_{50}$ .

Composición Lipídica	$X_{50}$ (ASC <sub>16</sub> )	$X_{50}$ (ASC <sub>14</sub> )	$X_{50}$ (HePC)
POPC	0.20±0.01	0.30±0.01	0.28±0.02
SM <sub>16</sub>	0.15±0.01	0.27±0.04	0.18±0.02
DPPC	nd	nd	0.12±0,01
DSPC	0.05±0.01	0.06±0.01	0.13±0.01
CHO	0.02±0.01	0.04±0.01	0.10±0.01
ERG	nd	nd	0.12±0.02
MCC	0.03±0.01	0.04±0.01	0.15±0.02
SCM	0.02±0.01	0.03±0.01	0.13±0.02
DMPC:DMPS	nd	nd	0.18±0.01
DLPC:SM <sub>16</sub> :CHO	nd	nd	0.18±0.05

nd: no determinado

Nuestra hipótesis propone que el proceso de incorporación del fármaco estaría relacionado con la energía requerida para interrumpir las interacciones atractivas lípido-lípido (van der Waals) necesaria para introducir una nueva molécula en la monocapa. Estas fuerzas intermoleculares, tradicionalmente expresadas como “presión cohesiva”<sup>92</sup> dependen del estado de fase de la película en el orden  $S > LC > LE > G \sim 0$  ya que las fases altamente incompresibles son el resultado de una disposición molecular compacta y cohesiva. Se ha propuesto que estas fuerzas son muy altas para las membranas que contienen CHO<sup>98</sup>. La tabla 5.2 muestra una correlación inversa entre el  $Cs^{-1}$  de las películas lipídicas y su capacidad de incorporar ASC<sub>n</sub> o HePC ( $X_{50}$ ), independientemente de sus propiedades de difusión. Este efecto refleja la importancia de las propiedades de compresibilidad de la membrana en el proceso de inserción.

**Tabla 5.2:** Capacidad de los anfifilos a incorporarse en monocapas lipídicas con diferentes estados de fase a  $\pi$  inicial = 30 mN/ m.

Anfifilos	Membrana empleada	Membranas LE			Membrana empleada	Membranas LC			Membrana empleada	Membranas LO		
		* $\Delta C_s^{-1}$ (%)	**Incremento en $\pi$ (mN/m)	*** $X_{50}$		* $\Delta C_s^{-1}$ (%)	**Incremento en $\pi$ (mN/m)	*** $X_{50}$		* $\Delta C_s^{-1}$ (%)	**Incremento en $\pi$ (mN/m)	*** $X_{50}$
ASC <sub>14</sub>	POPC	45±1	14±1	0.30±0.02	SCM	60± 11	16±1	0.03±0.01	MCC	89±4	15±1	0.04±0.01
ASC <sub>16</sub>	POPC	37±3	13±1	0.20±0.03	SCM	35± 12	17±1	0.02±0.01	MCC	36±3	17±1	0.03±0.01
HePC	POPC	70±1	13.5±0.2	0.28±0.02	DPPC	34±7	11.7±0.1	0.12±0.01	DLPC:SM16:CHO	37±5	11±1	0.18±0.05
Psy	POPC	2±1	nd	0.32±0.04	DPPC	51±3	nd	0.15±0.02	MM	39±2	nd	0.15±0.01

\* $\Delta C_s^{-1}$ : representa la diferencia en los valores de  $C_s^{-1}$  de la membrana pura con respecto a la membrana luego de la inserción del anfifilos expresado como porcentaje de disminución.

\*\* **Incremento en  $\pi$**  : Refleja cuanto aumentó la  $\pi$  luego de la inserción de los anfifilos en las membranas a una  $\pi$  inicial de 30 mN/ m.

\*\*\*  $X_{50}$ : fracción molar de anfifilo necesaria para lograr una saturación del 50 %  $\pi$  mediante la prueba de titulación de la superficie.

nd: no determinado.

Analizando en conjunto los datos se desprende que una pequeña cantidad de ASC<sub>n</sub> puede ser responsable del aumento  $\pi$  de 26-27 mN/m en monocapas DSPC, mientras que sería necesario incorporar una cantidad mucho mayor de ASC<sub>n</sub> en monocapas de POPC para alcanzar incluso un aumento menor en  $\pi$  (13-14 mN/m). Luego, la  $\pi_{eq}$  resultante después de la incorporación de estos anfifilos aparece como una combinación ponderada tanto de la capacidad de absorción del fármaco como de la respuesta de las películas lipídicas a tal incorporación.

Por otro lado la fracción molar de Psy necesaria para alcanzar el 50% de la saturación en  $\pi$  ( $X_{50}$ ) se muestra en la (tabla 5.2). Las monocapas de POPC permitieron una mayor captación de Psy que las películas de DPPC y MM. Esto concuerda con las observaciones anteriores de que el estado de la fase de la monocapa aceptora modula la incorporación de otros anfifilos,

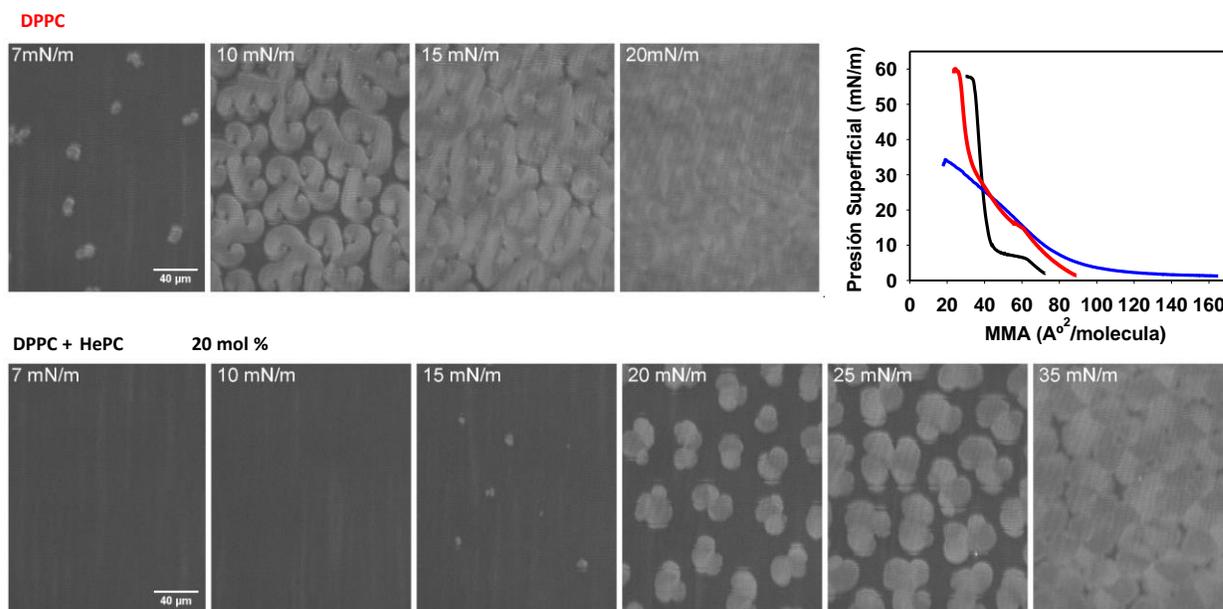
como los fármacos anfipáticos previamente discutidos<sup>29,78</sup>. Cabe destacar que en comparación con el resto de los anfifilos estudiados HePC muestra una mayor incorporación a membranas LO. Esto concuerda con los reportes que evidencian una favorable interacción HePC-CHO, con nuestros estudios cinéticos. En este contexto, la inclusión de una molécula de Psy en la película induce la compresión lateral de los otros componentes de la membrana, que a su vez contrarresta esta presión de acuerdo con la compresibilidad de la película. Por lo tanto, una membrana en la fase LE, que muestra un bajo  $Cs^{-1}$ , puede acomodar una cantidad mayor de moléculas Psy que las más compactas.

#### **5.4 Partición preferencial de anfifilos en membranas heterogéneas por microscopía de ángulo de Brewster.**

Los resultados anteriores indican que HePC tiene una mayor inserción en membranas con un carácter LE en comparación con las membranas que contienen esteroles o en fases condensadas. Para probar aún más esta hipótesis, extendimos este estudio al efecto de HePC en membranas heterogéneas. La partición preferencial del fármaco se evaluó en monocapas de DPPC con coexistencia de fase LE / LC<sup>117,118</sup> y membranas DLPC:SM<sub>16</sub>:CHO, que muestran coexistencia de fase LE / LO<sup>84</sup>, mediante BAM. Esta técnica permite evaluar la microestructura de las monocapas, dado que el nivel de gris de las imágenes de BAM depende tanto del índice de refracción de la película como del grosor de la misma<sup>58</sup>, la fase LE aparece como regiones más oscuras en la imagen en comparación con los dominios LC o LO, que muestran mayor espesor y / o naturaleza más compacta.

Las monocapas de DPPC puras mostraron una transición de fase LE-LC con coexistencia de fase en el rango de  $\pi$  de 5-17 mN / m (Fig 5.5), como se informó en bibliografía<sup>117</sup>. Los dominios LC se nuclean y crecen por encima de  $5 \pm 1$  mN / m, formando dominios que muestran ramas curvas. Estas formas típicas responden a una estructura cristalina anisotrópica debido a la quiralidad de las moléculas de DPPC en la fase LC<sup>118</sup>. La estructura cristalina se evidencia mediante imágenes por BAM, que revelan una anisotropía óptica debida a una disposición inclinada de las cadenas de acilo ordenadas de la DPPC<sup>119</sup>. Este efecto se observa

como una variación continua del nivel de brillo a medida que uno sigue el eje longitudinal de las ramas. Por encima de 17 mN/m, se observó una fase casi uniforme de carácter LC, que conserva la organización anisotrópica (Fig 5.5). Por otro lado, se ha informado que las monocapas de Langmuir de HePC puras forman películas LE desde  $\pi=0$  hasta el colapso a  $\sim 35$  mN / m<sup>77,83</sup>, como se muestra en la Fig 5.5 y en el capítulo 3).



**Figura 5.5:** Visualización mediante microscopía de ángulo de Brewster de monocapas de DPPC en ausencia y presencia de 20 mol% de HePC. Las áreas grises claro corresponden a la fase LC en equilibrio con la fase LE (áreas oscuras). Para una mejor visualización, se seleccionó un rango de 40-120 de nivel de gris (de la escala original 0-255). Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes. El tamaño de la imagen es de  $200 \times 250 \mu\text{m}$ . T:  $22 \pm 1$  ° C. Gráfico a la derecha: isoterma de compresión de las monocapas de Langmuir, HePC (azul), DPPC (negro) y DPPC + 20 moles% de HePC (rojo). Las curvas son experimentos representativos que varían a menos de 2 mN / m de sus réplicas correspondientes.

Las películas de DPPC que contienen 20 mol % de HePC mostraron una expansión de la región de coexistencia de fase, desplazadas a  $\pi$  más altas (15 a 35 mN/m), como se puede ver en las imágenes de BAM y la isoterma de compresión (Fig 5.5). Concomitantemente, los dominios LC mostraron formas redondeadas pero aun manteniendo el efecto de anisotropía óptica. Este hallazgo indica el mantenimiento de una estructura cristalina de DPPC casi pura.

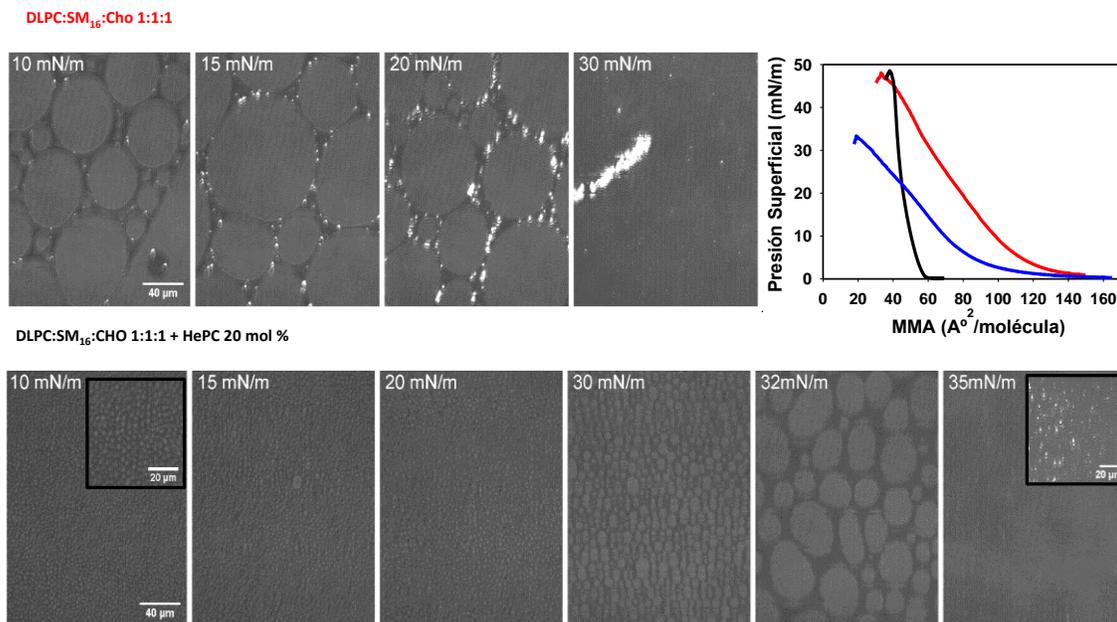
Se realizó un análisis cuantitativo de las imágenes de BAM, a 15 mN / m, y se cuantificó que el área ocupada por la fase LE aumentó de  $4 \pm 1$  a  $96 \pm 1\%$  como consecuencia de la

presencia de HePC (20% en moles). Esto evidencia una estabilización termodinámica de la fase LE sobre la LC, lo que implica que HePC se mezcla preferentemente con la fase LE y escasamente en la fase LC cuando están en coexistencia. Este efecto está en concordancia con los resultados obtenidos de titulación superficial mostrados en tabla 5.1.

La Fig 5.5 también muestra que la isoterma de compresión de la monocapa de Langmuir mixta tiene características intermedias en relación con las isotermas de componente puro. Sin embargo, a  $\pi$  altas, el comportamiento se parece mucho al de DPPC puro, mostrando valores de  $Cs^{-1}$  y  $\pi$  de colapso similares, probablemente debido a la expulsión parcial del fármaco de la monocapa.

Por otra parte la monocapa mezcla DLPC:SM<sub>16</sub>: CHO (1:1:1), que muestra coexistencia de fase LE/LO (LLC) también fue inspeccionada por BAM (Fig 5.6 y Ref <sup>78</sup>). De manera general obtuvimos que en presencia de 20% en moles de HePC la  $\pi$  a la cual ocurre la fusión de las fases (presión de miscibilización) cambió a valores más altos (de  $20 \pm 1$  a  $34 \pm 1$  mN/m). Además, la HePC indujo la formación de dominios pequeños a partir de  $\pi$  muy bajos que se convierten en dominios más grandes cerca de la  $\pi$  fusión (Fig 5.6). Esto sugiere que la presencia del fármaco favorece la nucleación del dominio, probablemente alterando la tensión de línea entre las fases coexistentes <sup>120,121</sup>.

Un análisis cuantitativo de estas imágenes de BAM a una  $\pi=15$  m N/m reveló que el porcentaje del área ocupada por la fase LE aumentó de  $11 \pm 1$  a  $49 \pm 1\%$  en presencia del fármaco. Además, calculamos los niveles de reflectividad de cada fase coexistente a partir de los datos del nivel de gris de la imagen <sup>58</sup> y encontramos que la fase LE disminuyó  $\sim 28\%$  su reflectividad en presencia del fármaco, mientras que la fase LO se mantuvo constante. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el HePC se integra preferentemente a la fase LE cuando coexiste con una fase LO, en concordancia con los resultados de titulación de superficie. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en vesículas lipídicas que informan un coeficiente de partición LO/L $\alpha$  de  $\sim 0.5$  para un análogo de fluorescencia de HePC <sup>115</sup>.



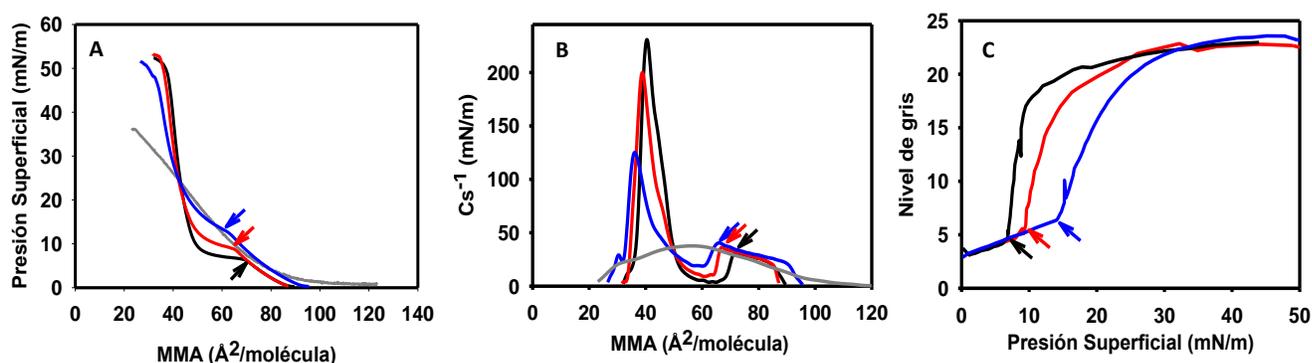
**Figura 5.6:** Visualización por BAM de Mezclas Ternarias que contienen colesterol DLPC: SM<sub>16</sub>: CHO 1: 1: 1 (LLC) en ausencia y presencia de HePC 20 mol%. Las áreas claras corresponden a una fase LO en equilibrio con fase LE (áreas oscuras). Para una mejor visualización de un rango de nivel de gris 40-120 (a partir de 0-255 escala original) fue seleccionado. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes. Tamaño de la imagen 200 × 250 μm. Las inserciones muestran la monocapa mezcla a  $\pi = 40$ , tamaño de la imagen 100x100 μm. T: 22 ± 1 °. Gráfica derecha: Isotherma de compresión de monocapas de Langmuir, HePC (azul), LLC (rojo) y LLC añadido 20 mol% de HePC (negro). Las curvas son experimentos representativos, que varían en menos de 2 mN / m de sus réplicas correspondientes.

En el caso de la Psy realizamos un estudio similar al previamente descrito para evaluar el efecto de la misma en membranas heterogéneas. Para ello empleamos también monocapas de DPPC que muestran la coexistencia de fase LE/LC en el rango de presión de 6–17 mN/m<sup>78,118</sup> y una mezcla que imita la membrana de mielina (MM) que presenta coexistencia de fase LE/LO.

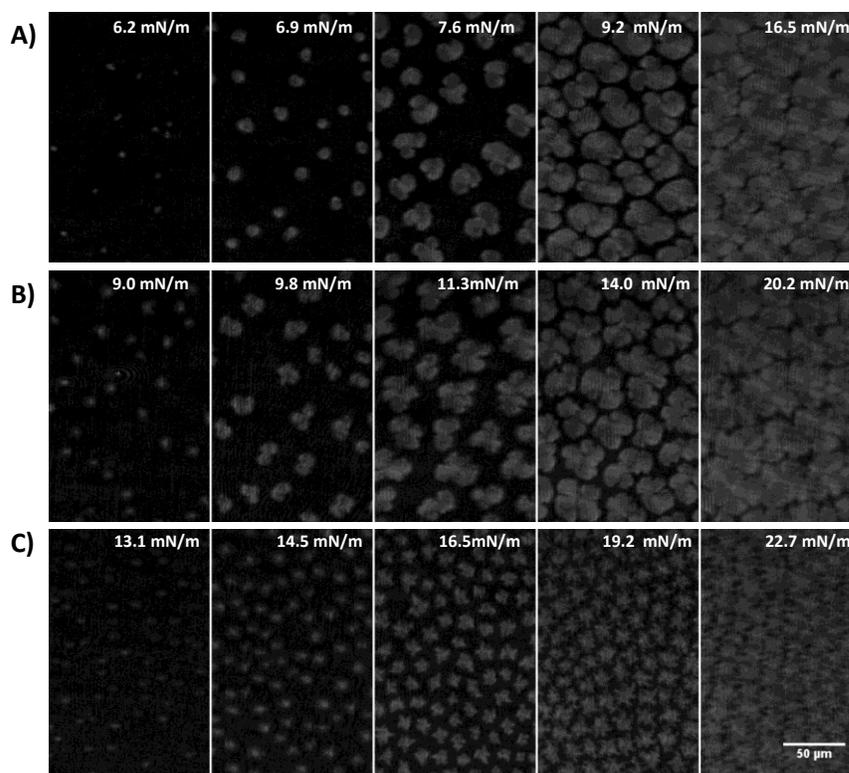
La adición de 10 o 25% en moles de Psy a monocapas de DPPC alteró el equilibrio de fase del sistema, así como su textura superficial. El aumento progresivo en el contenido de Psy corrió el inicio de la transición de fase a  $\pi$  más altas (de  $6.4 \pm 0.1$  mN/m para DPPC puro a  $12.5 \pm 0.1$  mN/m cuando contiene 25% en moles de Psy). Esto se evidencia por análisis de las isothermas de compresión (Fig 5.7) y de las imágenes de BAM en la Fig 5.8. Para resaltar este efecto, se analizó el valor de gris promedio de todas las imágenes adquiridas en cada experimento, donde el aumento súbito indica la aparición de dominios LC. Este efecto

evidencia una partición preferencial de Psy para la fase LE, que estabiliza termodinámicamente esta fase y altera el equilibrio de fase.

Por otro lado, cuando una alta proporción de Psy estaba presente, también afectó las propiedades de la fase LC. Esto se concluye a partir del cambio en la estructura de los dominios de LC de forma ramificado curvo a estrellado (comparar Figura 5.8 A y C). Este efecto puede ser consecuencia de una mayor repulsión electrostática dentro del dominio <sup>122</sup> debido a la presencia de la molécula Psy que se encuentra parcialmente cargada. Este cambio en la propiedad de la fase LC también fue evidenciado por la disminución del  $C_s^{-1}$  de  $227 \pm 3$  (DPPC puro) a  $94 \pm 4$  mN/m (25% en moles de Psy) a 30 mN/m (ver tabla 5.2 y Fig 5.7).



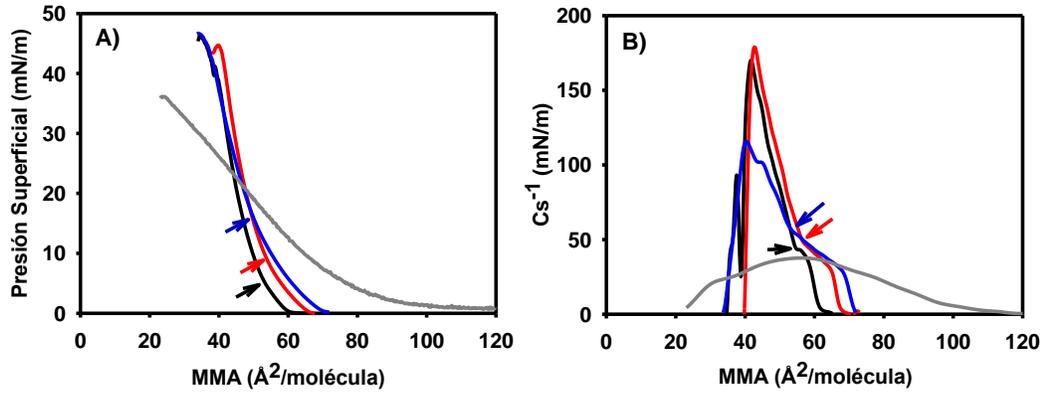
**Figura 5.7:** Isotermas de compresión de monocapas de Langmuir mixtas de DPPC y Psy. A) Isotermas de compresión, (B) Módulo de compresibilidad de películas puras y mixtas y C) Nivel de gris promedio después de restar el fondo de micrografías, como se muestra en la Fig. 5.8 (~ 50 imágenes / experimento), a lo largo del proceso de compresión. Composición de las películas: DPPC puro (línea sólida negra), Psy puro (líneas grises completas) y que contiene 10 (líneas rojas) o 25 % en moles (líneas azules) de Psy. T:  $22 \pm 1$  ° C. Las flechas indican el comienzo de la transición de fase LE - LC para cada caso. Las curvas de compresión son representativas de dos experimentos independientes que varían menos de 2 mN / m de sus réplicas correspondientes.



**Figura 5.8:** Microscopía de ángulo de Brewster de monocapas mixtas de DPPC y Psy. Las micrografías de DPPC (A) puro o DPPC que contienen 10 (B) o 25% en moles (C) de Psy se muestran a las presiones de superficie indicadas. Para una mejor visualización, se restó el fondo y se modificó el nivel de gris de las imágenes seleccionando el rango 0-100 de la escala original de 0-255. T:  $22 \pm 1$  ° C. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes.

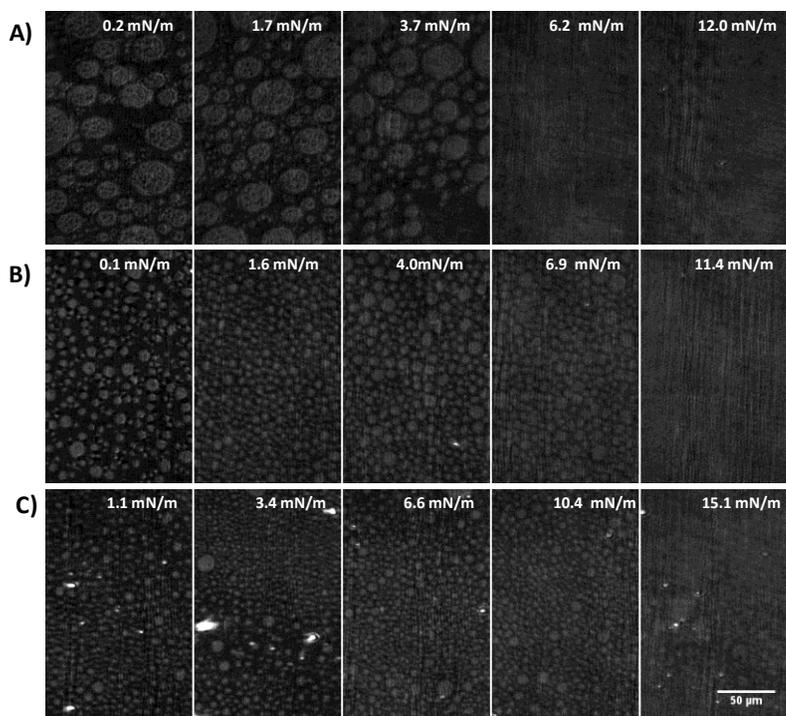
La mezcla de MM mostró coexistencia de fase LE y una fase más brillante con dominios redondeados a  $\pi$  bajas (Fig 5.10). Este es el patrón típico para la coexistencia líquido-líquido y la fase más brillante corresponde a la fase LO enriquecida con CHO<sup>84</sup>. Tras la compresión, las fases se fusionaron probablemente debido a la reducción de la brecha de composición aumentando la miscibilidad de las fases<sup>84</sup>, lo que resultó en una película homogénea.

Como se esperaba para una película que contiene una alta proporción de CHO, su isoterma de compresión mostró una abrupta pendiente vertical por encima de su  $\pi$  de miscibilidad, revelando una organización de superficie compacta (Fig 5.9). Este comportamiento coincide con el observado para las películas de Langmuir formadas por el extracto lipídico de mielina<sup>49,107</sup>.



**Figura 5.9:** Isotermas de compresión de las monocapas de Langmuir de la mezcla similar a la mielina (MM) en ausencia o presencia de SPY. A) Isotermas de compresión y (B) módulo de compresibilidad de películas puras y mixtas. Composición de las películas: MM \* (líneas negras), PSY puro (líneas grises) y que contiene 10 (líneas rojas) o 25% en moles (líneas azules) de PSY. T:  $22 \pm 1$  ° C. Las flechas indican la presión superficial y el área molecular en la que se produce la transición de miscibilidad en cada condición. Las curvas de compresión son representativas de dos experimentos independientes que varían menos de 2 mN / m de sus réplicas correspondientes.

La presencia de Psy indujo un cambio de la  $\pi$  a la cual se observa la fusión entre las dos fases a valores de  $\pi$  más altos (de  $5.3 \pm 0.4$  para MM a  $16.2 \pm 0.4$  mN/m para MM + 25% en moles de Psy, ver Fig 5.10). Esto nuevamente evidenció una partición preferencial de Psy a una de las fases, aumentando la brecha de composición entre ambas y favoreciendo la separación de las mismas. En concordancia con su carácter LE, Psy también indujo una disminución en los valores de  $Cs^{-1}$  para monocapas de MM (de  $174 \pm 9$  para MM a  $106 \pm 2$  mN/m para MM + 25% en moles) a  $\pi = 30$  mN / m, ver tabla 5.2 y Fig 5.9).



**Figura 5.10:** Microscopía de ángulo de Brewster de monocapas de Langmuir de la mezcla que simula mielina (MM) en ausencia o presencia de PSY. Micrografías de MM (A) o MM con 10 (B) o 25% en moles (C) de PSY se muestran a las presiones de superficie indicadas. Para una mejor visualización, se restó el fondo y el nivel de gris de las imágenes se modificaron seleccionando el rango 0–60 de la escala original 0–255. T:  $22 \pm 1$  ° C. Las imágenes corresponden a un solo experimento, que es representativo de dos experimentos independientes.

Por otro lado, cuando Psy se mezcló con POPC (en una fase LE), la película resultante mostró un carácter homogéneo (no se muestra). Esto, junto con el  $X_{50}$  más grande encontrado para las películas de LE que para las más compactas en experimentos de titulación de superficie, sugiere que cuando se coloca Psy en una película heterogénea (como MM) probablemente particione preferentemente en la fase LE con respecto a la fase LO. Apoya esta hipótesis el hallazgo informado por Oliveira y Maggio en el cual todos los componentes cargados analizados en películas de extractos de mielina (recordar que Psy está parcialmente cargado al pH utilizado) están presentes en la fase LE, mientras que solo se encuentran componentes neutros en la fase LO<sup>89</sup>. Este efecto es de esperar, ya que la repulsión electrostática en el plano evitará la aparición de una organización lateral altamente compacta, como la presente en la fase LO.

## 5.5 Conclusiones

Nuestra hipótesis de trabajo propone que la asociación e inserción de pequeñas moléculas anfifílicas a las membranas lipídicas es controlado por las características fisicoquímicas de continuo (del tipo de materia blanda) de las membranas y no por interacciones moleculares específicas. Cuando una molécula se inserta en una biomembrana debe ejercer presión sobre el resto de los componentes de la membrana, de forma tal que se oponga a la presión lateral. De allí surge la capacidad de la película lipídica de responder ante la compresión isométrica (compresibilidad) y al desplazamiento lateral de los componentes (deformación y difusión lateral), además de factores electrostáticos (repulsión lateral o entre la membrana y los monómeros solubles de anfifilos cargados) que condicionarían la posibilidad de inserción de una nueva molécula a la membrana. Esto, sumado a que estas propiedades pueden cambiar a lo largo del proceso cinético de inserción del anfifilo por enriquecimiento del mismo, constituye un panorama complejo desde el punto de vista biofísico.

De manera general concluimos que:

- ✓ Las monocapas con diferentes estados de fases regulan la extensión del proceso de penetración. Las membranas con carácter más fluidas mostraron una mayor inserción de anfifilos en comparación con las membranas que contenían CHO o estado de fase LC.
- ✓ El incremento en la presión después de la incorporación de los anfifilos en las monocapas previamente formadas es función de la capacidad de las membranas de incorporar al anfifilo, así como de la respuesta de las monocapas a la compresión (estrés dilatacional).
- ✓ Las membranas modelos empleadas sufrieron cambios en sus propiedades reológicas luego de la inserción de los anfifilos, los cuales se evidenciaron como una disminución en  $C_s^{-1}$ , convirtiéndolas en monocapas más fácilmente compresibles en todos los casos.
- ✓ Tanto en mezclas heterogéneas conteniendo CHO con coexistencia de fase LO/ LE como en monocapas con coexistencia de fase LC/LE, la inserción de los anfifilos mostró una partición preferencial por la fase LE, coexistencia de fase a mayores  $\pi$  y cambios en la textura interfásial.

- ✓ Las monocapas LE mostraron mayor velocidad de adsorción/desorción en comparación con las LC. Mientras que monocapas LO mostraron escasa incorporación pero rápida inserción y en el caso de HePC una desorción lenta.

## **Capítulo 6: Acción de los ASCn en las membranas del modelo del estrato córneo: una visión del mecanismo para mejorar la permeación de la piel.**

### **6.1 Introducción**

Los ASCn han sido propuestos como nuevos potenciadores de la permeación ocular y de la piel <sup>31,123,124</sup>. Esta función parece estar relacionada con su alta actividad superficial <sup>27</sup> y su capacidad para incorporarse en las membranas lipídicas <sup>27,29,47</sup>. En esta tesis, encontramos que la capacidad de los fármacos anfifílicos para penetrar en una membrana lipídica depende en gran medida de la compresibilidad y por ende, del estado de fase de la membrana huésped <sup>29,78</sup>. Además, la incorporación espontánea de ASCn en membranas que simulan estrato córneo (SC) como SCM disminuye su  $Cs^{-1}$  <sup>29</sup>, lo que puede favorecer la incorporación de otros fármacos anfifílicos en estas membranas de SC. En este contexto, nuestra hipótesis de trabajo propone que este fenómeno puede estar relacionado con la función de los ASCn como potenciadores de la permeación de la piel.

En esta tesis evaluamos las propiedades fisicoquímicas y de interacción fármaco-membrana que son importantes para el efecto de “permeación dérmica facilitada de fármacos”, <sup>125</sup> un efecto poco estudiado a nivel de los mecanismos involucrados. Esto nos permitió correlacionar nuestros hallazgos con el mecanismo propuesto en la literatura para la mejora de la permeación de la piel. Para ello utilizamos el compuesto comercial ASC<sub>16</sub> y las formas no comerciales del ASCn (ASC<sub>12</sub> y ASC<sub>14</sub>). A diferencia de ASC<sub>16</sub>, éstos han sido escasamente explotados en la literatura con el fin de potenciar la permeación dérmica. La incorporación en este estudio del agente de permeación clásico, ácido oleico (OA) nos permitió interpretar comparativamente nuestros resultados.

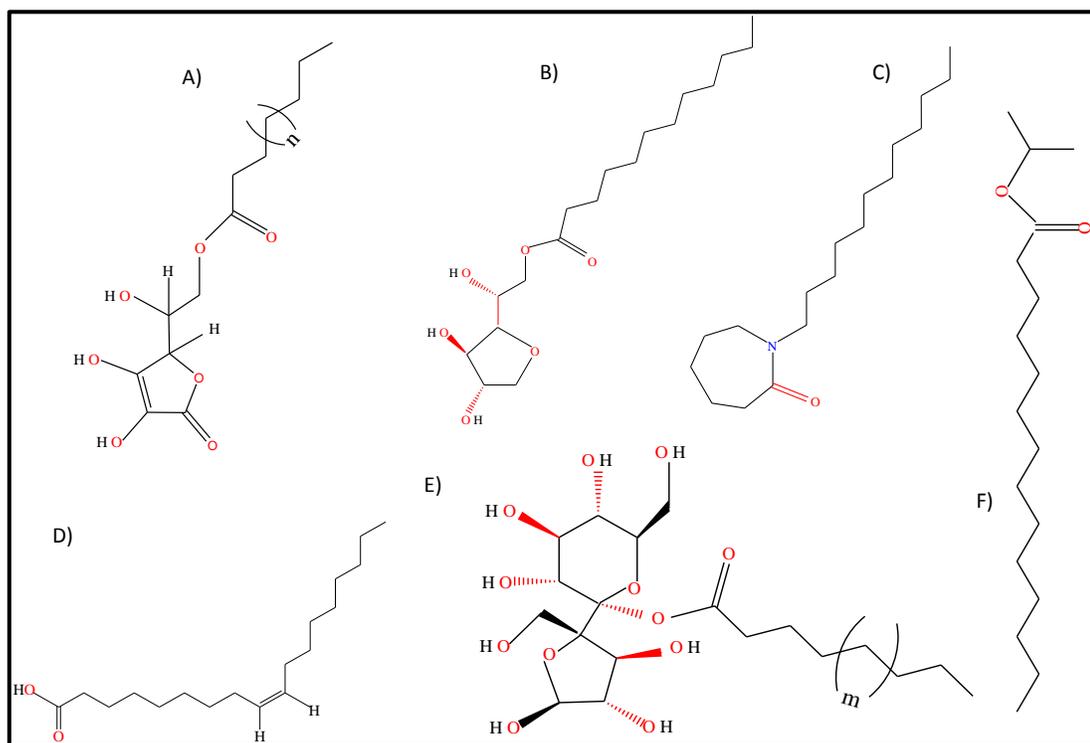
Utilizamos monocapas lipídicas como modelo de membrana artificial de SC, ya que simula una de las múltiples capas de esta compleja estructura anisotrópica de la piel. Esto nos permitió explorar la estructura en el plano y la compresibilidad de los sistemas lipídicos donde

incluimos potenciadores de la permeabilidad dérmica, examinados tanto a escala macroscópica como a escala micro y nanoscópica.

## **6.2 Los agentes potenciadores de la permeación dérmica afectan la compresibilidad de las membranas lipídicas SC.**

Como se evidenció en capítulos anteriores, la membrana que simula SC (SCM) muestra una isoterma de compresión compacta (Fig 6.1A y Ref <sup>29,126,127</sup>) con baja difusión y propiedades de compresibilidad compatibles con una fase líquida condensada (LC) <sup>29</sup>.

Varios reportes bibliográficos han informado que la incorporación al sistema SCM de diferentes fármacos anfifílicos con actividad como potenciadores de la permeación de la piel, como el OA y algunos surfactantes no iónicos, reduce el  $Cs^{-1}$  de las películas de SCM <sup>126,128-131</sup> (ver Tabla 6.1). Todos estos potenciadores tienen en común una estructura química compuesta por un grupo polar relativamente pequeño y una sola cadena saturada de acilo de 12-16C, con la excepción del OA, que contiene una cola monoinsaturada de 18C (Esquema 6.1). También muestran alta actividad de superficie, una CMC en el rango de micro a milimolar <sup>132,133</sup> y forman películas LE con bajos  $Cs^{-1}$  ( Ref <sup>129-131</sup> ).

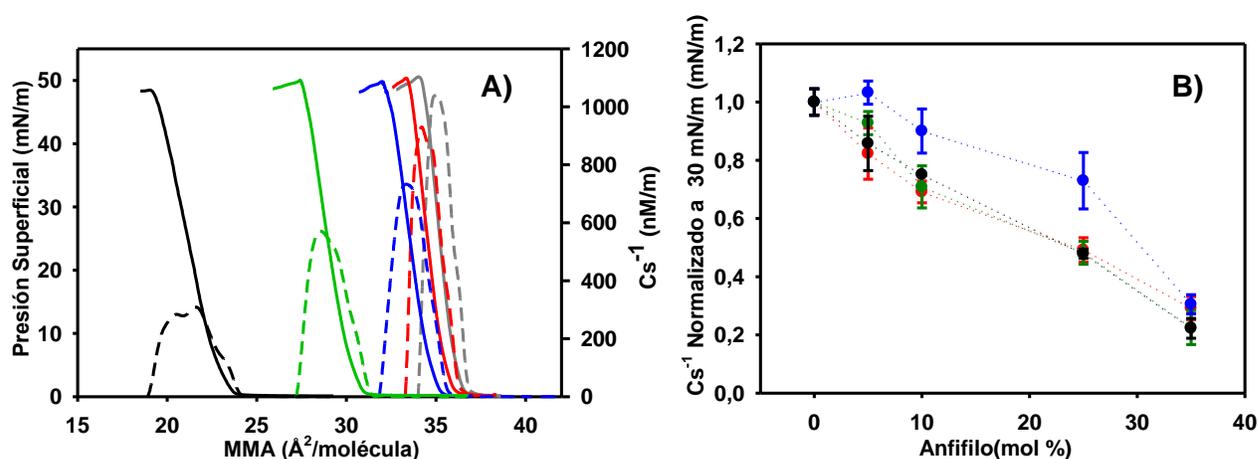


**Esquema 6.1:** Estructura química de los potenciadores de la permeación de la piel anfífilos estudiados en este trabajo (A, D) y extraídos de la literatura (B, C, E y F). A) ésteres alquílicos del ácido L-ascorbilo (ASCn) "n" significa 12 (ASC<sub>16</sub>), 10 (ASC<sub>14</sub>) u 8 (ASC<sub>12</sub>); B) laurato de sorbitán o span 20; C) 1-dodecilazacycloheptan-2-one o Azone; D) ácido oleico u AO; E) Ésteres de sacarosa "m" significa 10 (laurato de sacarosa o SL) o 12 (Miristato de sacarosa o SM); F) miristato de isopropilo (MIP). Fuente:pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.

De acuerdo con nuestros resultados expuestos en el capítulo anterior, una reducción del  $Cs^{-1}$  se correlaciona con una mayor capacidad para incorporar fármacos anfífilos en las membranas lipídicas<sup>29,78</sup>. Para evaluar si los potenciadores de la permeación de la piel pueden disminuir  $Cs^{-1}$  como mecanismo general, probamos el efecto de los ASCn sobre monocapas. Los ASCn, propuestos como una nueva familia de potenciadores de la permeación dérmica, también comparten las características estructurales comunes mencionadas anteriormente (Esquema 6.1), así como una alta actividad de superficie<sup>27</sup>.

La incorporación de ASC<sub>12</sub> en las membranas SCM dio como resultado películas lipídicas más fácilmente compresibles, con una disminución de los valores de  $Cs^{-1}$  dependiente de la dosis (Fig 6.1A). Se encontró un efecto similar después de la incorporación de ASC<sub>14</sub>, ASC<sub>16</sub> u OA a las películas SCM formando monocapas mezclas. Una inspección de los valores de  $Cs^{-1}$  a

30 mN/m muestra una clara disminución casi lineal de  $Cs^{-1}$  para los sistemas SCM/ASC<sub>12</sub> y SCM/ASC<sub>14</sub>, que muestran efectos idénticos a los inducidos por la adición del mejorador de permeación clásico OA (Fig 6.1B). Esta  $\pi$  (30 mN/m) es relevante en el contexto biológico estudiado, ya que tiene compactación similar a una bicapa. A su vez, ASC<sub>16</sub> muestra un efecto similar aunque más modesto (menor disminución del  $Cs^{-1}$  a bajas concentraciones), pero aún importante. En general, este hallazgo se asemeja al efecto dosis- dependiente reportado para los potenciadores anfífilo no iónico Span 20 y Azone en películas lipídicas SC<sup>130</sup>.



**Figura 6.1:** Influencia de los ASCn en las propiedades de compresibilidad de las membranas que simulan el estrato córneo (SCM). A) Presión superficial (líneas continuas) y módulo de compresibilidad ( $Cs^{-1}$ , líneas discontinuas) en función del área molecular promedio (MMA) de la monocapa de SCM en ausencia (gris) o presencia de 5 (rojo), 10 (azul), 25 (verde) y 35 (negro)% en moles de ASC<sub>12</sub>. Las curvas son representativas de experimentos por triplicado, que no difieren en más de 1 Å<sup>2</sup> / molécula. B)  $Cs^{-1}$  normalizado de monocapas de SCM en ausencia o presencia de OA (negro), ASC<sub>12</sub> (rojo), ASC<sub>14</sub> (verde) o ASC<sub>16</sub> (azul) en el % en moles indicado. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes y las barras son SEM.

La incorporación espontánea de monómeros de ASCn en monocapas de SCM reduce el valor  $Cs^{-1}$  de las películas lipídicas SC en un 64% (ASC<sub>14</sub>) o 40% (ASC<sub>16</sub>)<sup>29</sup> (ver capítulo 5). Un efecto similar se logra al agregar > 25% en moles de ASCn a las películas SCM. Vale la pena señalar que una comparación sistemática ha reportado que el ASC<sub>12</sub> es el más activo de la familia de los ASCn en su capacidad de mejorar la permeación de la piel (efectividad en el orden ASC<sub>12</sub>> ASC<sub>14</sub>> ASC<sub>16</sub>)<sup>123</sup>. Por lo tanto, la capacidad para reducir  $Cs^{-1}$  y hacer que la membrana SC sea más fácilmente compresible se correlaciona hasta ahora con la capacidad de

los ASCn para actuar como mejoradores de la permeación de la piel, como se ha señalado anteriormente con otros potenciadores <sup>123,134,135</sup>.

La permeación a través de SC implica un proceso de difusión- partición- solubilidad. En el capítulo anterior propusimos que la partición de un fármaco anfifílico a una membrana lipídica está relacionada con la energía requerida para interrumpir las interacciones intermoleculares lípido-lípido (van der Waals) e introducir una nueva molécula de fármaco desde compartimento acuoso a la película lipídica. Así encontramos una correlación inversa entre el  $Cs^{-1}$  de las películas lipídicas y su capacidad para incorporar fármacos anfifílicos, independientemente de la propiedad difusional de las membranas <sup>29,78</sup>. En esta sección concluimos que la capacidad de disminuir  $Cs^{-1}$  de las membranas lipídicas que simulan SC es una característica común a muchos potenciadores de la permeación de piel de carácter anfifílico <sup>29,78</sup>. Esta interpretación proporciona un marco teórico para la correlación observada entre la disminución de  $Cs^{-1}$  de la membrana SC y el aumento de la permeación de la piel.

**Tabla 6.1:** Informes bibliográficos de alteraciones en la compresibilidad de las monocapas lipídicas SC mediante la incorporación de potenciadores de la permeación de la piel. Las abreviaturas son: ASC<sub>12</sub>: laurato de L-ascorbilo, ASC<sub>14</sub>: miristato de L-ascorbilo; ASC<sub>16</sub>: palmitato de L-ascorbilo; OA: ácido oleico; IPM: isopropilo miristato; SL: laurato de sacarosa; SM: miristato de sacarosa; Span 20: laurato de sorbitán; Azone: 1- dodecil-azacicloheptan-2-ona.

*Capítulo 6: Acción de los ASCn en las membranas del modelo del estrato córneo: una visión del mecanismo para mejorar la permeación de la piel.*

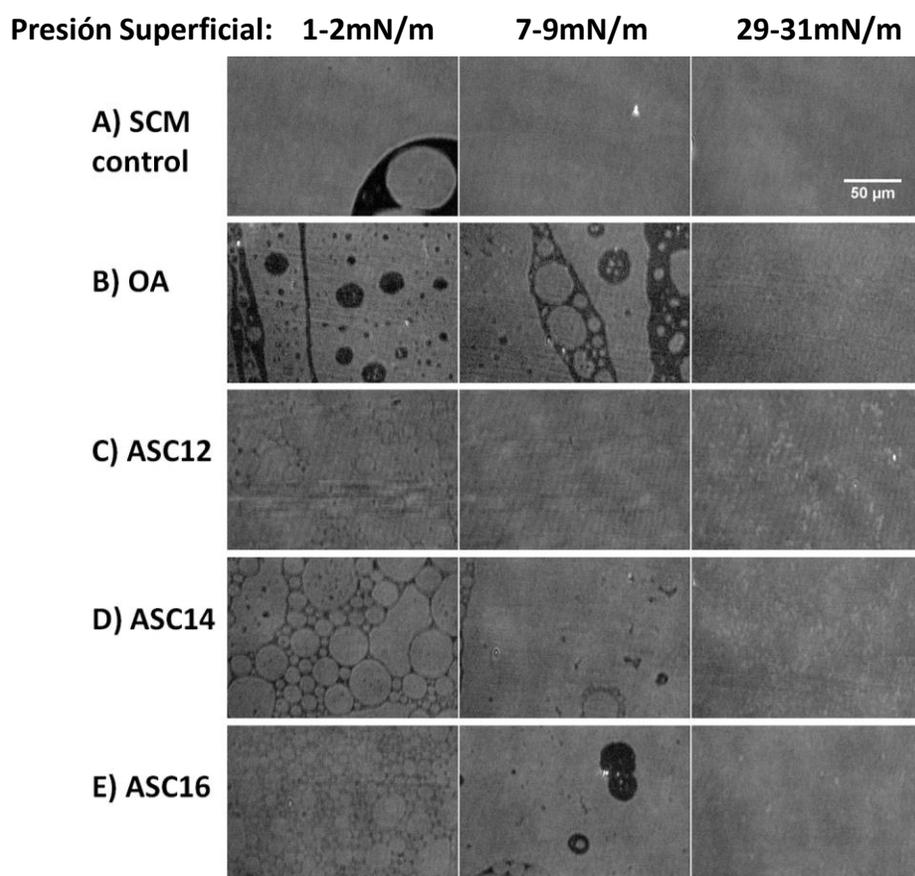
Potenciador Anfifílico	Sistema Lipídico	Observación	Ref.
ASC <sub>12</sub> ; ASC <sub>14</sub> ; ASC <sub>16</sub> ; OA	Mezcla lipídica SC (Cer <sub>24:0</sub> /CHO/ácido lignocérico / ChoS)	Las películas de SCM se hicieron más compresibles, reduciendo el Cs <sup>-1</sup> de SCM en ~ 70-78% a 30 mN / m con la incorporación de 35% en moles de ASCn o OA.	Este trabajo
OA	Mezcla lipídica de SC (Cer de cerebro /CHO/ácido palmítico, 1:1:1)	Al aumentar los niveles de OA en la monocapa, las películas se volvieron más fluidas y más compresibles. Cs <sup>-1</sup> cayó ~ 60% del valor de la película SCM a 30 mN / m con la incorporación de 30% en moles de OA.	126
IPM	Mezcla lipídica de SC (Cer AS/CHO/ácido esteárico, 1:1:0.7)	La incorporación del 30% en moles de IPM en la monocapa lipídica SC disminuyó la pendiente de las isotermas de compresión en comparación con las películas SC. Además la adición reflejó la inmiscibilidad de IPM con componentes lipídicos SC.	136
SL; SM	Mezcla lipídica de SC (Cer AP/CHO/ácido esteárico)	Al aumentar la concentración de éster de sacarosa (laurato de sacarosa o miristato de sacarosa), las películas de monocapa resultantes se volvieron más fluidas y más compresibles que la película de lípidos SC. Cs <sup>-1</sup> a 30 mN / m cayó ~ 43-45% en presencia de 25% en moles de ésteres de sacarosa.	137
Span®20; Azone®	Mezcla lipídica de SC (cerebro Cer/CHO/ ácidos grasos libres)	Se observó una caída de ~ 54 y ~ 63% del valor Cs <sup>-1</sup> de las monocapas lipídicas SC cuando contenían 40% en moles de Span 20 o Azone, respectivamente.	138

### 6.3 Los ASCn, así como OA, alteran la estructuración en el plano de las películas SCM

Se ha encontrado que los potenciadores de la permeación de la piel, como los ésteres de sacarosa, el miristato de isopropilo (IPM) y la OA, alteran el comportamiento de fase de las películas de Langmuir de SCM exploradas por microscopía de ángulo de Brewster<sup>126,131,132</sup>. Las monocapas de SCM muestran una coexistencia de fase LE-LC de hasta 5 mN / m (Fig 6.2). Por encima de esta  $\pi$ , se puede observar en las imágenes de BAM una única fase homogénea, cuya alta reflectividad (o nivel de gris) corresponde a una fase LC gruesa<sup>29</sup>. La incorporación de 35% en moles de ASC<sub>14</sub>, ASC<sub>16</sub> u OA altera el equilibrio de fases y muestra la presencia de una fase LE con menor nivel de gris (más delgada) en el rango de 5-20 mN/m. Este cambio en la presión crítica de miscibilidad refleja la mezcla parcial de los potenciadores anfifílicos con algunos componentes lipídicos SC, estabilizando una fase LE<sup>139</sup>. Un efecto similar ha sido

reportado para los ésteres de sacarosa <sup>137</sup>.

Las imágenes de BAM muestran una alta reflectividad (nivel de gris) a  $\sim 30$  mN / m, una  $\pi$  cercana a la esperada para una disposición laminar de lípidos (Fig 6.2, panel derecho). No se encontró fase LE en ninguno de los sistemas de fármacos lipídicos estudiados a esa  $\pi$ . Sin embargo, la fase condensada observada por BAM muestra una rugosidad en su textura mayor en presencia de fármacos que en ausencia de estos. Esto puede reflejar la coexistencia de fases condensadas/sólidas a una escala más pequeña que el límite de resolución de BAM (0.22  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ).



**Figura 6.2:** Imágenes de BAM de películas de Langmuir de SCM en ausencia (control) o presencia de 35% en moles de ASCn y OA . Las imágenes se tomaron dentro del rango de presión de superficie indicado. Tamaño de imagen 250 x 190  $\mu\text{m}$ . Las imágenes son representativas de experimentos por triplicado.

La separación de fases y la formación de dominios es altamente relevante para la discusión del mecanismo de acción de los agentes potenciadores de la permeación de la piel

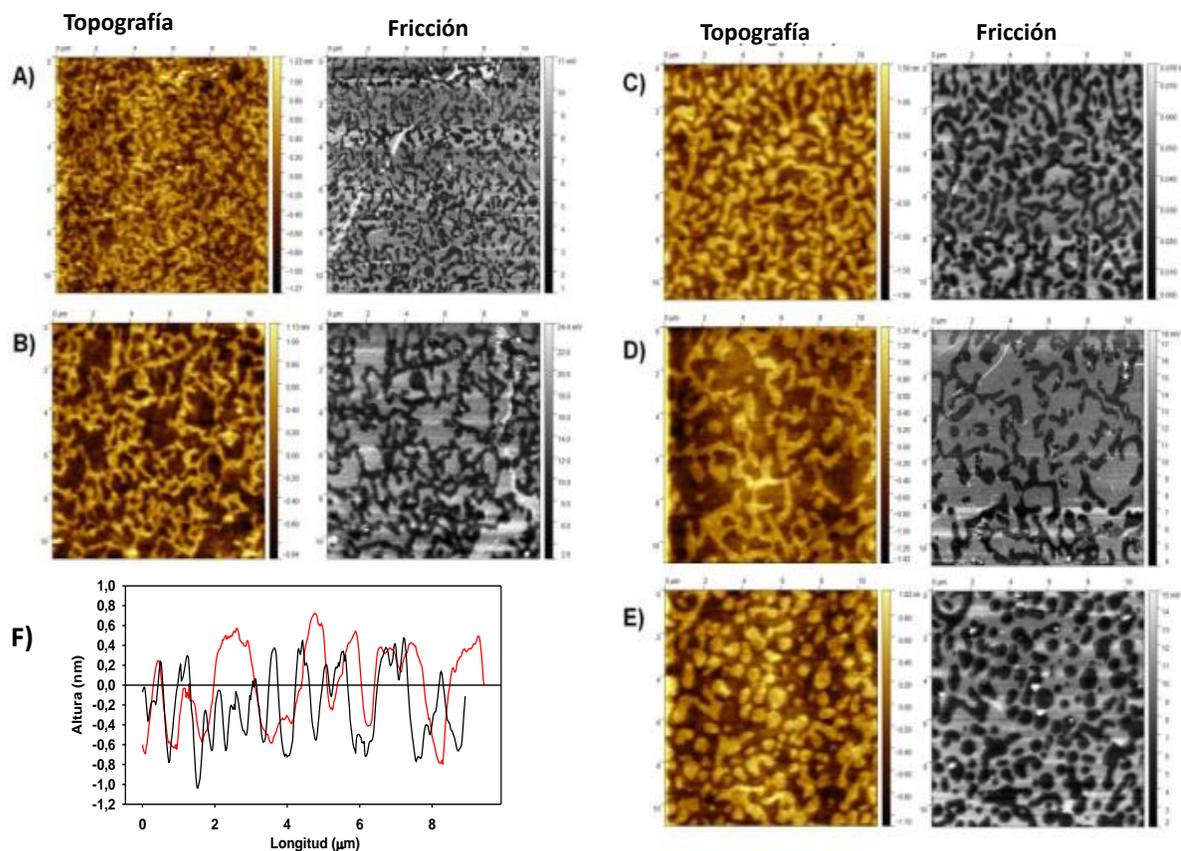
<sup>137,140-142</sup>. La formación de una fase con mayor fluidez y capacidad de incorporación del fármaco se ha propuesto como esencial para la aparición de canales intercapas en el SC en los cuales la difusión-partición-solubilidad de un fármaco de interés sería más eficiente <sup>143</sup>. Por lo tanto, examinamos la estructura lateral de los sistemas potenciadores de permeación de la piel / SCM en la nanoescala mediante el uso de microscopía de fuerza atómica (AFM).

La coexistencia de dos fases lamelares en SCM, particularmente en las membranas que contienen CHO-S, se ha reportado tempranamente mediante difracción de rayos X <sup>144</sup> y posteriormente se confirmó mediante visualización por AFM <sup>88,104,145</sup>. Las monocapas de SCM transferidas a soportes sólidos muestran la coexistencia de dos fases de carácter condensado / sólido<sup>88,104</sup>, con una diferencia de altura de ~1 nm y casi el 50% de la distribución del área. Nuestros resultados concuerdan con dichos reportes en que se pueden observar dos fases por microscopia de fuerza atómica (Fig 6.3A).

Cuando se visualizan superficies nanoestructuradas en el modo de contacto, la punta del cantiléver está constantemente en contacto con la superficie de la muestra y su desviación vertical se traduce a la información topográfica de la superficie. El cantiléver también gira en la dirección de exploración y el detector puede recoger una señal de desviación horizontal correspondiente al movimiento de torsión del cantiléver (Fricción), que se obtienen simultáneamente con las imágenes de topografía (altura). Las medidas de fricción pueden dar información sobre heterogeneidades en las muestras que no son causadas por diferencias de altura y, por lo tanto, son un buen complemento de las mediciones topográficas <sup>146</sup>. La fuerza de la señal de deflexión lateral está relacionada con la fuerza de la interacción entre la superficie de la muestra y la punta, que responde a una penetración más o menos profunda de la sonda en la membrana lipídica. Las fases fácilmente compresibles, como las fases LE, muestran señales de fricción altas y las fases LC muestran señales de fricción más bajas <sup>147</sup>.

La Fig 6.3A muestra la aparición de una fase alta (brillante en la imagen Topografía) con una señal de fricción más baja (aparece oscura en la imagen de Fricción) en las películas SCM. Ten Grotenhuis y col informaron que la Cer24: 0 se segrega de la fase que contiene CHO en

monocapas mixtas observadas por AFM <sup>104</sup>. Por otro lado, Eeman y col informaron la coexistencia de dos fases en las películas formadas por el péptido fengicina/SCM inspeccionadas por AFM <sup>105,148</sup>. En dicho sistema la CER se encuentra enriquecida en la fase alta con una señal de fricción baja y el péptido antimicrobiano se concentra preferentemente en la fase delgada también enriquecida en CHO, la cual presenta una señal alta de fricción <sup>105</sup>. A partir de estos antecedentes estimamos que la fase alta en nuestro sistema SCM corresponde a una fase rica en CER24:0 y la fase delgada sería rica en CHO.



**Figura 6.3:** Microscopía de fuerza atómica y de fuerza lateral de monocapas de SCM transferidas a soportes sólidos en ausencia o presencia de 35% en moles de potenciador anfifílico. Composición: A) SCM, B) SCM/OA, C) SCM/ASC<sub>12</sub>, D) SCM/ASC<sub>14</sub> y E) SCM/ASC<sub>16</sub>. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes. Tamaño de imagen 11 x 11 μm. F) Perfil representativo de altura de monocapas transferidas SCM (negro) y SCM/ASC<sub>16</sub> (rojo).

La adición de 35% en moles de OA o ASCn a los lípidos de SCM da como resultado membranas heterogéneas, que muestran algunas variaciones en la forma del dominio y la distribución de fase (Fig 6.3). Las membranas de SCM muestran una fase más alta organizada en estructuras delgadas parecidas a gusanos, que se agrandan con la adición de OA o ASCn. Esta fase aparece como la fase continua en las películas de SCM/OA que rodean los dominios formados por la fase discontinua (más delgada). Por otro lado, en las películas SCM/ASC<sub>16</sub>, se observa el efecto contrario, la fase delgada se organiza como continua y la fase alta forma dominios circulares o alargados. Por otro lado, se observó un comportamiento intermedio para las mezclas de SCM/ASC<sub>12</sub> y SCM/ASC<sub>14</sub>. Para resaltar estas diferencias en las estructuras laterales, se muestra un perfil de altura en la Figura 6.3F, donde se puede observar una longitud característica más corta para películas SCM que para películas SCM/ASC<sub>16</sub>.

La forma de los dominios mostrados en las imágenes en la Fig 6.3 fue analizada por el descriptor de forma, diámetro de Feret. Este parámetro mide la distancia entre los dos planos paralelos que restringen el objeto perpendicular a la dirección más larga del dominio, mientras que el diámetro mínimo de Feret (Min Feret) informa la distancia paralela a la dirección más larga del dominio. Los valores de ambos parámetros de forma mostraron diferencias estadísticamente significativas para los dominios en las membranas SCM/potenciador en comparación con las películas SCM (Fig 6.4A). Sin embargo, la relación entre esas longitudes, que arroja el valor de aspecto, no se alteró (no mostrado). Esto indica que los dominios mantienen su simetría general, en algunos casos ampliando sus tamaños.

La aparición de fases moduladas (dominios de tamaño finito distribuidos regularmente en el plano de la membrana) en biomembranas es el resultado de la competencia entre la tensión de línea y una fuerza repulsiva de largo alcance<sup>139,149,150</sup>. Además, en dominios de tipo sólido, las interacciones atractivas molécula-molécula de corto alcance también son importantes para la textura superficial resultante de membranas heterogéneas. Se han descrito fases moduladas para membranas enriquecidas con CER<sup>151</sup>. Este efecto se ha atribuido a las altas repulsiones dipolares intradominio debido a un alto momento dipolar de las CERs, un

parámetro que crece con la longitud de la cadena CER N-acilo <sup>152</sup>.

La membrana SCM inspeccionada en nuestro estudio contiene una alta proporción de CER24: 0, que probablemente se concentra en los dominios de fase alta y es responsable de la forma alargada y delgada del dominio. La alteración de una o más de estas propiedades, probablemente al inducir la redistribución de los componentes lipídicos, puede ser el origen de las alteraciones de la organización de la superficie promovidas por los potenciadores de la permeación estudiados aquí en las membranas SCM.

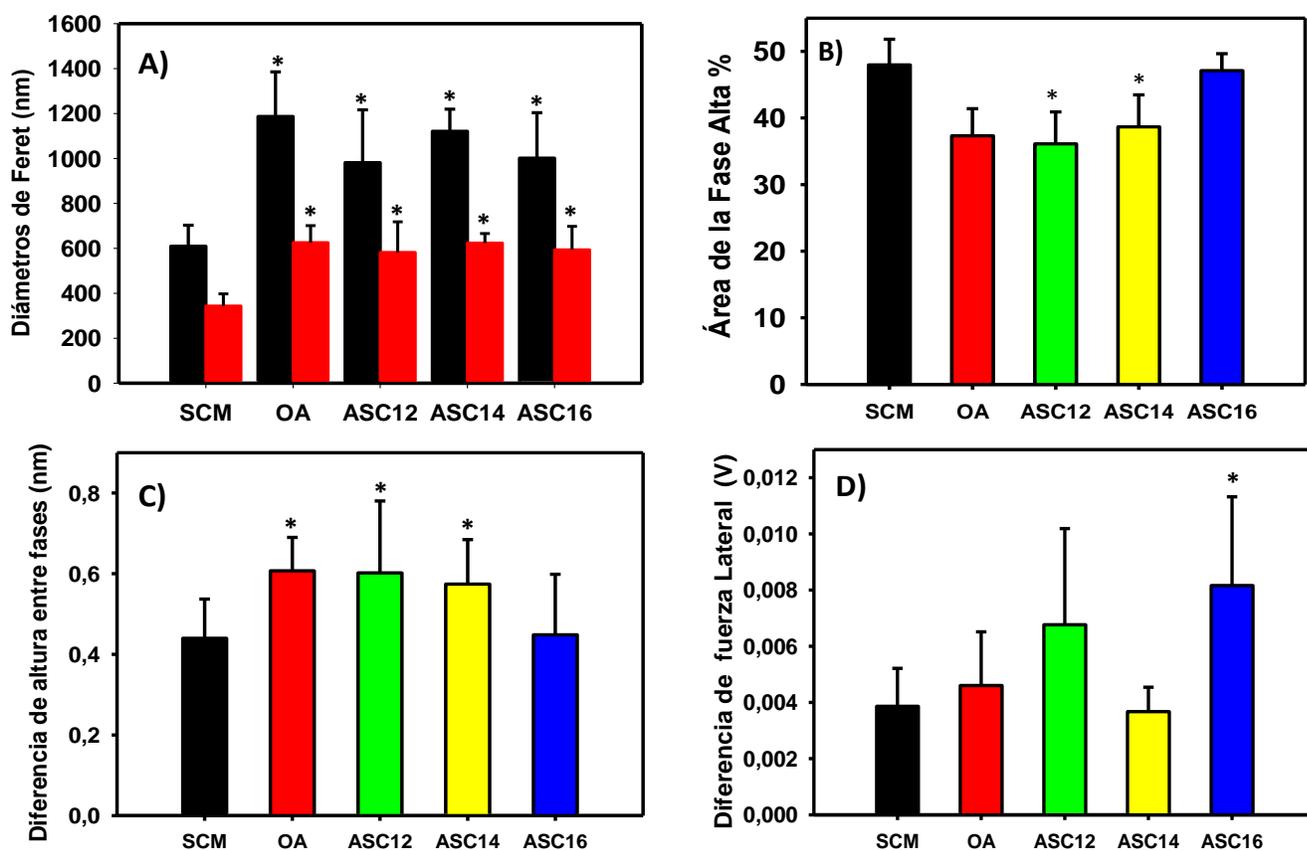


Figura 6.4: Análisis de la textura de la superficie de las monocapas transferidas de SCM / potenciador. Los diámetros de Feret (negro) y Mínimo de Feret (rojo) (A), y el porcentaje de área que ocupa la fase alta, se representan para las películas de SCM en ausencia o presencia de 35% en moles de OA o ASCn (B). La diferencia de altura de las fases (C) y la diferencia de fuerza lateral (D) entre las dos fases lipídicas de las monocapas transferidas se midieron a partir de imágenes de AFM y LFM, como se muestra en la Figura 6.3. (\*) Significancia estadística contra SCM (p < 0.05). Los datos son el promedio de 8-10 imágenes y la barra de error corresponde a SD.

Un análisis adicional de las imágenes de AFM indicó una disminución estadísticamente significativa en el área ocupada por la fase alta de las mezclas de SCM/OA, SCM/ASC<sub>12</sub> y SCM/ASC<sub>14</sub> en comparación con las películas de SCM (Fig 6.4B). Un nuevo componente agregado a una membrana lipídica puede mostrar una capacidad de partición diferente en ambas fases de una membrana heterogénea. De acuerdo con la termodinámica clásica, la partición preferencial de un componente en una de las fases induce un cambio en el diagrama de fases debido a una reducción de la energía libre de la fase preferida, similar a las propiedades coligativas en soluciones comunes <sup>139</sup>. Por lo tanto, la ampliación de la fase delgada en las membranas SCM a expensas de la fase alta, después de la adición de OA, ASC<sub>12</sub> o ASC<sub>14</sub>, indica una partición preferencial de esos componentes en la fase delgada.

#### **6.4 ASCn también altera las propiedades físicas de las fases coexistentes en las películas SC**

Las fases coexistentes en los sistemas SCM/potenciadores tienen propiedades físicas diferentes a las encontradas en las películas lipídicas SC. Las diferencias de altura entre ambas fases aumentan significativamente en los sistemas que contienen OA, ASC<sub>12</sub> y ASC<sub>14</sub> en comparación con SCM. La adición de 35% en moles de OA o ASCn indujo una mayor diferencia de altura entre las fases que la película SCM, la cual es estadísticamente significativa para todos excepto para el sistema SCM/ASC<sub>16</sub> (Fig 6.4C) Esto puede corresponder a una disminución en el espesor de la fase delgada mediante la incorporación del potenciador de permeación.

El cambio en las propiedades físicas de las fases también se puede evidenciar mediante el análisis de las imágenes de fricción. La fase más delgada en las películas de SCM muestra una señal de fuerza lateral de ~ 0,004 V más alta que la fase más alta, que son valores similares a los informados para membranas heterogéneas DSPE / DOPE <sup>147</sup>. La membrana mezcla de SCM/ASC<sub>16</sub> en cambio muestra una mayor diferencia de fuerza lateral entre sus fases coexistentes en comparación con membranas SCM (Fig 6.4D). Por lo tanto, todos los agentes

potenciadores de la permeación de la piel estudiados aquí muestran la capacidad de alterar propiedades físicas como la altura o la reología ( $Cs^{-1}$  y medida de fuerza lateral) de al menos una de las fases lipídicas de las membranas de SCM.

## **6.5 Conclusiones**

En este trabajo la incorporación de ASCn u OA en las membranas SC dio como resultado películas más fácilmente compresibles, con una disminución del  $Cs^{-1}$  dependiente de la dosis. Este fenómeno concuerda con reportes previos sobre el efecto de otros potenciadores de la permeación dérmica sobre modelos de SC, similares a los utilizados en este trabajo. Esto permite plantear un mecanismo general para estos fármacos donde la presencia del potenciador altera las propiedades reológicas de las múltiples capas del SC, de las cuales una monocapa lipídica (nuestro sistema de estudio) sería la mínima unidad. Dicha alteración, que involucra un aumento de la elasticidad del SC lo hace más susceptible a la incorporación de otros fármacos de interés en el proceso de permeación dérmica.

El análisis estructural de las monocapas de SC que contienen potenciadores de la permeación dérmica indican que dichas moléculas probablemente se concentren en la fase lipídica más delgada en las películas heterogéneas de SCM y se excluyan de la fase rica en CER más alta y sólida (ver Esquema 6.2). Por lo tanto, el adelgazamiento y el aumento de la deformabilidad de la membrana (evaluada mediante la interacción de fricción) de la fase delgada refleja los cambios en las propiedades físicas de la película a nanoescala que se pueden relacionar con el aumento macroscópico de la compresibilidad de la película (disminución de  $Cs^{-1}$ ). Esto último está de acuerdo con el mecanismo de potenciación de la penetración propuesto en los años 90<sup>128,138</sup> y apoyado recientemente por Todosijević y col, basado en el estudio de la acción de varios surfactantes no iónicos en las membranas lipídicas SC (ver Tabla 6.1 y Esquema 6.2)<sup>137</sup>.

Nuestros estudios sobre el efecto de la reología de membrana en la capacidad de captación de fármacos anfifílicos<sup>29,78</sup> proporcionan un marco teórico para la correlación observada entre la disminución de la compresibilidad de la membrana SC y el aumento de la permeación de la

piel (Esquema 6.2). El aumento de la elasticidad de la película, permitiría que un componente activo comprima lateralmente la membrana SC, favoreciendo su partición y posterior penetración de las capas lipídicas del SC.

En conjunto observamos que los ASCn alteran notablemente las membranas lipídicas de SC de una manera similar a la de los potenciadores de permeación de la piel ampliamente probados. Las ASCn pueden reducir el módulo de compresibilidad de las monocapas lipídicas SC 1.5 veces más eficientemente que los ésteres de sacarosa y de 1.7 a 1.9 veces más que los potenciadores de la permeación no iónicos San®20 y Azone®, posicionando a la familia ASCn entre los agentes potenciadores más fuertes.

En resumen, nuestros resultados y la evidencia reportada previamente indican un fuerte patrón, de acuerdo con nuestras observaciones previas, en el que las propiedades de compresibilidad de las películas lipídicas son determinantes para la incorporación de fármacos anfifílicos y, por extensión, para la permeación dérmica. Esto constituye un paso adelante en la comprensión de los cambios físicos involucrados en el mecanismo de mejora de la penetración de piel. Además, la alteración de la organización en el plano de las membranas SC a nivel de nanoescala por agentes de permeación de la piel proporciona un nuevo aspecto que enriquece el panorama actual de este efecto a la luz de las teorías de los mecanismos actuales.



**Esquema 6.2:** Ilustración del mecanismo propuesto para los potenciadores anfifílicos de permeación de la piel. La presencia del potenciador (rojo) induce el adelgazamiento y la expansión lateral de la fase pobre en Cer, a expensas de la fase rica en Cer más gruesa y más rígida. También aumenta la elasticidad de la película, permitiendo que un componente activo (amarillo) comprima lateralmente la membrana SC, favoreciendo su partición en y posterior penetración de las capas lipídicas del SC.

## **Capítulo 7: Interacción de los anfifilos con bicapas lipídicas**

### **7.1 Introducción**

En este capítulo nos propusimos estudiar la regulación de la interacción con bicapas lipídicas de los anfifilos HePC y Psy, analizándolo comparativamente con lo reportado en bibliografía para los ASCn. Estudiamos cómo la incorporación de los mismos afecta las propiedades estructurales y dinámicas de estas membranas. Para realizar estos estudios empleamos diferentes modelos artificiales de bicapas incluyendo MLVs, LUVs o GUVs.

Los liposomas, de diferentes composición química constituyen el modelo de membrana más cercano a la estructura de la membrana celular. Los LUVs permiten estudiar fenómenos de permeabilización de membranas y restructuración tridimensional: agregación y fusión de membranas, fenómenos de gran importancia en la descripción de la función de fosfolipasas. Además, la utilización de liposomas permitió el monitoreo mediante potencial z del efecto sobre la electrostática de las membranas al ser tratadas con los diferentes anfifilos. En el caso de las GUVs, su gran tamaño confiere el atractivo adicional de ser similares en dimensiones a las membranas plasmáticas de células y visualizables por microscopía confocal. Esto permite la exploración de coexistencia de fases y presencia de dominios lipídicos segregados lateralmente en bicapas.

En el capítulo 5, mostramos que los anfifilos estudiados pueden alterar transiciones de fases de monocapas lipídicas mediante la partición preferencial a la fase más expandida. En este capítulo estudiamos si el mismo efecto se produce en un modelo de membrana de bicapa. Para ello se llevaron a cabo una serie de experimentos que se discutirán a continuación y se emplearon diferentes metodologías experimentales como por ejemplo: DSC y Microscopia de fluorescencia.

### **7.2 Los anfifilos en estudio cambian el equilibrio de fases en bicapas lipídicas**

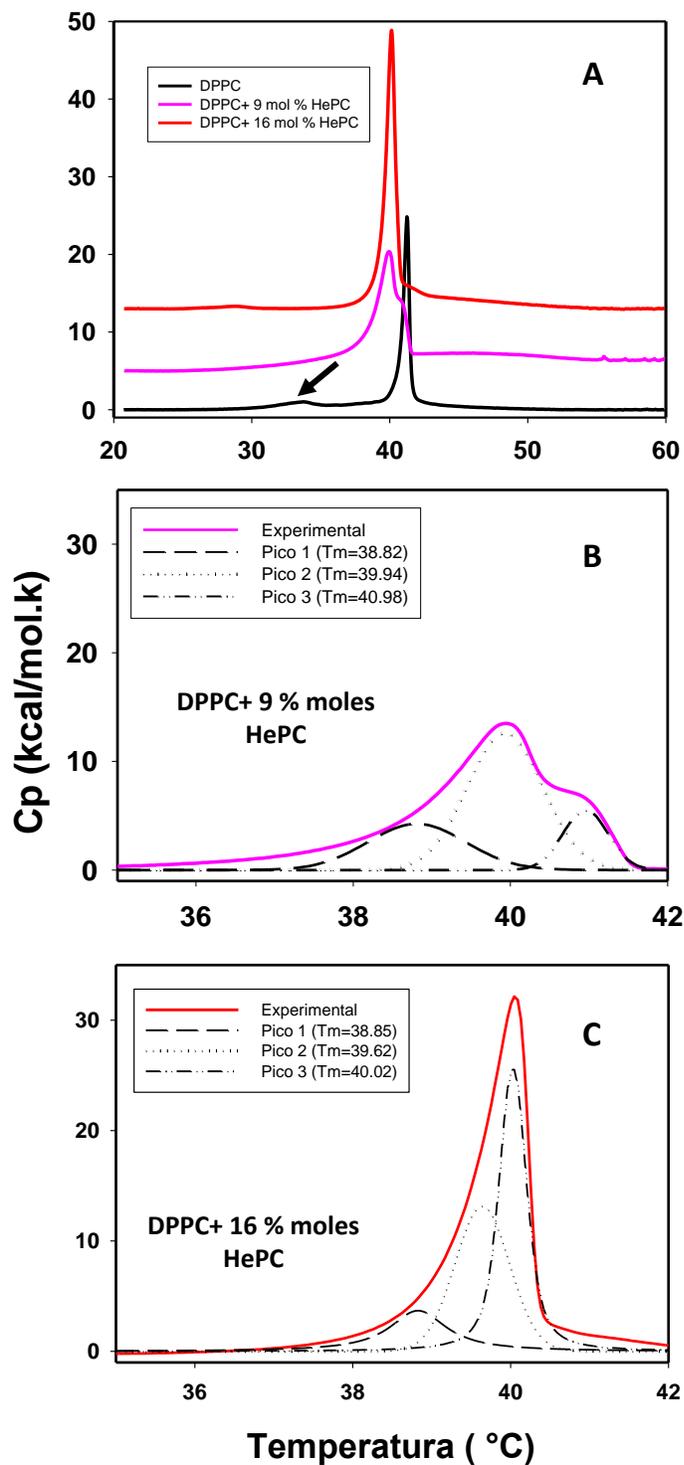
Nuestro grupo previamente reportó mediante estudios de Microscopia confocal que la familia ASCn mostró perturbación de biomembranas en diferente magnitud dependiendo de

la longitud de su cadena de acilo. El ASC<sub>14</sub> fue el que evidenció una mayor capacidad para disminuir la tensión de la membrana mientras que el ASC<sub>16</sub> también mostró propiedades de reestructuración de la membrana con la característica adicional de que una vez incorporados en la misma fue capaz de formar dominios condensados enriquecidos en el fármaco <sup>28</sup>.

En el caso de la HePC empleamos DSC para investigar las propiedades termotrópicas de las suspensiones acuosas de DPPC y DPPC-HePC. La Fig 7.1 muestra el perfil endotérmico de DSC para DPPC puro y mezclas de DPPC + 9 y 16% en moles de HePC, que corresponden a una concentración final de HePC de 0.2 y 0.4 mM. Vale la pena señalar que esos valores están muy por encima de la CMC medida para HePC en ausencia de membranas lipídicas <sup>80</sup>. Sin embargo, la organización de HePC en estructuras micelares podría verse fuertemente influenciada por la presencia de MLVs compuestas por DPPC, como se demuestra a continuación.

Las suspensiones de DPPC muestran dos picos endotérmicos correspondientes a la pretransición (gel a L $\beta$ ' ) y transición principal (L $\beta$ ' a L $\alpha$  o L<sub>d</sub>), de acuerdo con la literatura<sup>153,154</sup> (ver Fig 7.1 y Tabla 7.1). Las suspensiones acuosas de HePC puro no dieron ningún pico en los termogramas (no se muestra). La adición de HePC a las suspensiones de DPPC causó la eliminación de la pretransición, como se ha observado en otros sistemas de fármacos /fosfolípidos <sup>153</sup>. También observamos un cambio de la transición principal (T<sub>m</sub>) con un corrimiento a menor temperatura, cuantificadas como una disminución de 1.3 °C. Adicionalmente observamos, la ampliación del pico calorimétrico, evidenciado por un aumento en la mitad del ancho del pico ( $\Delta T_{1/2}$ )<sup>72</sup>, lo cual indicó una pérdida de cooperatividad del proceso (Fig. 7.1A y Tabla 7.1).

Se realizó un análisis de deconvolución del pico de la transición principal del sistema DPPC-HePC y los resultados se muestran en la Fig 7.1 B. Este sistema en presencia de 9% en moles de HePC muestra que el pico correspondiente a la transición principal es integrado por tres componentes, en el cual el tercer pico apareció a ~41 ° C y correspondería al de la DPPC casi pura. Cuando HePC estaba presente un 16% en moles en la muestra, también se calcularon tres picos que contribuyeron al termograma observado en la Fig 7.1 C.



*Figura 7.1:* Termogramas de calentamiento representativos de DSC de suspensiones acuosas de DPPC-HePC. A) Termogramas de DPPC puro (negro) y mezclas de DPPC + 9 (rosa) y 16% en moles (rojo) de HePC. Picos de deconvolución y los correspondientes termogramas de las muestras que contiene DPPC + 9 (B) o 16 (C) % en moles de HePC. La velocidad de calentamiento fue de 30 ° C/h. La flecha en (A) indica la pretransición de la DPPC.

Estos diferentes picos contribuyen en diferentes proporciones a la transición calorimétrica completa mostrada. Se puede observar que el pico con la mayor contribución se desplaza a temperaturas más bajas a medida que aumenta la concentración de HePC (Fig 7.1). Además, la falta de un pico cerca de 41 ° C en presencia de 16% en moles de HePC sugiere una saturación de la membrana lipídica en el rango de concentración de 9–16% en moles.

La tabla 7.1 muestra un fuerte aumento en la entalpía de transición ( $\Delta H_c$ ) luego de la adición de HePC. Este aumento en  $\Delta H_c$  evidencia una interacción de van der Waals más favorable entre las cadenas de la DPPC y la parte hidrofóbica de HePC en el núcleo de bicapa en fase gel<sup>155</sup>. También se obtuvo un aumento de más de dos veces para el valor de la entropía de transición ( $\Delta S$ ) en presencia de HePC, lo que puede explicarse como una mejor mezcla de HePC en la fase líquida. Esto, junto con una disminución en  $T_m$ , refleja una transición termodinámicamente más favorable a la fase  $L_\alpha$  en presencia de HePC en comparación con DPPC puro, y apoya una partición preferencial de HePC en fases fluidas, como se describió en el capítulo 5.

**Tabla 7.1:** Parámetros termodinámicos del análisis de datos DSC de DPPC en ausencia o presencia de 9 o 16% en moles de HePC.

Muestra	Pretransición		Transición Principal			
	$T_m$ (°C)	$\Delta H_c$ (kcal/mol)	$T_m$ (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	$\Delta H_c$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (kcal/mol.K)
DPPC	33.6±0.1	2.1 ± 0.2	41.3±0.1	0.46±0.03	8.6±0.1	0.027±0.001
DPPC + 9mol% HePC	-----	-----	40.1±0.1	1.79±0.06	20.7±0.8	0.066±0.002
DPPC + 16 mol% HePC	-----	-----	40.03±0.05	0.65±0.03	17±2	0.06±0.01

El error corresponde al SEM de muestras duplicadas.

Teniendo en cuenta que HePC muestra una CMC relativamente alta (en el rango micromolar) <sup>77,80</sup> en comparación con la de los fosfolípidos, que típicamente muestran CMC en el rango nanomolar <sup>155</sup>, exploramos la partición entre la forma soluble en agua y la forma unida a membrana del fármaco. Sometimos la suspensión acuosa de DPPC-HePC utilizada para el análisis por DSC a centrifugación y separación física de las fracciones solubles y de membrana (precipitado). La fracción soluble se sometió a cromatografía de fase inversa (C18) y se obtuvieron tres fracciones: acuosa, etanólica y clorofórmica. El análisis cuantitativo del contenido de fósforo en cada fracción cromatográfica se muestra en la Tabla 7.2.

La suspensión de DPPC pura mostró una recuperación de <3% en las fracciones solubles, lo que indica que el 97% de los fosfolípidos precipitaron durante el proceso de centrifugación, como se informó anteriormente <sup>28</sup>. También analizamos la suspensión acuosa de HePC, de la cual se recuperó aproximadamente el 88% del fármaco total en las fracciones solubles (Tabla 7.2). Vale la pena señalar que el tratamiento cromatográfico de la fracción soluble permitió recuperar el 95% de las moléculas de HePC en la fracción etanólica. Por lo tanto, al analizar muestras mixtas de DPPC-HePC, podemos suponer que el fósforo que aportan las moléculas de HePC se eluye principalmente en la fracción de etanol, mientras que el fósforo proveniente de las moléculas de DPPC más hidrófobas se recuperó principalmente en la fracción de cloroformo.

Tabla 7.2. Cuantificación de fosfolípidos en cromatografía de fase inversa.

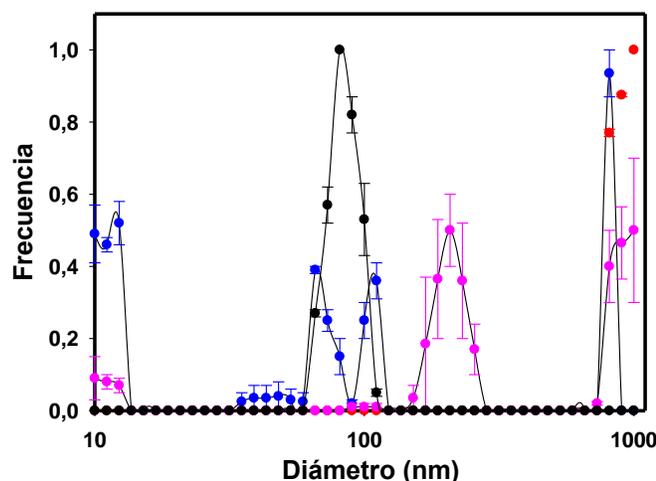
Muestras	% de Recuperación de la fracción etanólica *	% de Recuperación de la fracción clorofórmica*	% de Recuperación de la fracción acuosa*
DPPC	0.5±0.1	1.7±0.1	0.3±0.1
HEPC	84±2	3±1	0.6±0.3
DPPC+ HePC 9 mol%	16±2	3.3±0.2	1.8±0.7
DPPC+ HePC 16 mol %	46.6±0.7	9±2	3±1

\* El error corresponde al SEM de las muestras por duplicado

En muestras que contienen 9% en moles de HePC, solo el 16% del fármaco total fue recuperado en las fracciones solubles, lo que indica que el resto estaba presente en la fracción de membrana. Esto, a su vez, representa un enriquecimiento de ~ 8% en moles del fármaco en las membranas de DPPC, organizados como MLVs <sup>62</sup>. Para muestras que contienen 16% en moles de HePC, se recuperó una mayor cantidad de fármaco en la fracción soluble (Tabla 7.2). En este caso, la fracción de membrana retuvo una cantidad de fármaco que representa solo el 10% en moles de los componentes de la membrana. Estos resultados sugieren que, a la mayor concentración de fármaco explorada, el sistema estaba cerca de la saturación. Este hallazgo coincide con la desaparición del pico a 41°C observado por DSC y concuerda aproximadamente con una media de saturación ( $X_{50}$ ) de 12% en moles en monocapas de DPPC obtenido mediante experimentos de titulación de superficie (Tabla 5.2). La tabla 7.2 también muestra un aumento considerable en la fracción clorofórmica para muestras que contienen 16% en moles de HePC, lo que sugiere que aproximadamente 9% en moles de las moléculas de DPPC estaban presentes en estructuras más pequeñas que no precipitaron durante el tratamiento de centrifugación.

Analizamos el efecto de HePC en la distribución de tamaño de partículas de las suspensiones lipídicas en el rango nanométrico por DLS. La suspensión de DPPC mostró la presencia de partículas grandes (>800 nm, Fig.7.5), correspondiente a MLVs, según lo esperado. Por otro lado, las muestras de HePC puro presentaron una población de partículas pequeñas (10–20 nm), que corresponden a micelas y una población diferente en el rango de 50–100 nm que puede incluir micelas cilíndricas o vesículas pequeñas. En presencia de 9 % moles de HePC, la población de tamaño más pequeño se vuelve menos importante y aparece una nueva población a ~ 300 nm. Un aumento adicional en el contenido de HePC dio como resultado una sola población en el rango nanómetro centrado a 100 nm. Esto, junto con una mayor cantidad fósforo presente en la fracción clorofórmica, indicó que el fármaco induce la reestructuración de parte de las moléculas de DPPC en partículas de tamaño intermedio, que pueden corresponder a vesículas unilamelares, mientras que las micelas de HePC ya no estaban presentes. Nuestros resultados se correlacionan con los informes en los que un análogo fluorescente de HePC a baja concentración induce un desorden en los liposomas de DPPC

mientras que a una concentración superiores al 10% en moles promueve grandes cambios en las bicapas, incluida la pérdida de integridad y la formación de estructuras que contienen lípidos, el fármaco y la sonda fluorescente <sup>80</sup>.

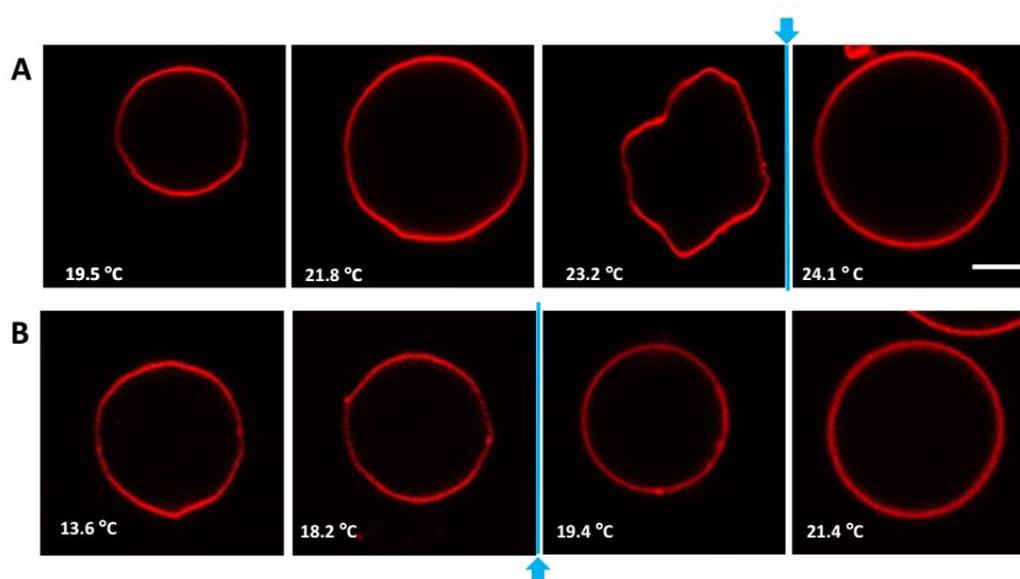


**Figura 7.5:** Análisis de la distribución de tamaño por DLS de las suspensiones DPPC y DPPC-HePC en el rango nanómetros. Las muestras fueron suspensión acuosa de HePC 0.4 mM (azul), DPPC 2 mM (rojo) y DPPC que contenía 9% en moles (rosa) y 16% en moles de HePC (negro). Los datos corresponden al valor promedio de dos experimentos independientes, las barras correspondientes al SEM.

Para explorar si la perturbación en el equilibrio de fase inducido por Psy observada en monocapas heterogeneas de Langmuir también estaba presente en bicapas lipídicas formamos GUVs de fosfolípidos puros o compuestos por la mezcla de MM. Las GUVs compuestas de DMPC puro fueron elegidas como membranas modelo porque muestran una transición de fase de gel a Ld a temperatura ambiente ( $T_m = 23.9\text{ °C}$ ) <sup>156</sup>.

Nuestros resultados empleando microscopía confocal de GUVs de DMPC mostraron un cambio en la forma de la vesícula durante el calentamiento lento de la muestra ( $\sim 10\text{ °C / h}$ ) cerca de su  $T_m$  (Fig 7.2). Este efecto ha sido anteriormente descrito en GUVs compuestas por DMPC y otras PC de cadenas alquílicas más largas <sup>157</sup>. Encontramos que las vesículas muestran formas no circulares y poca fluctuación de forma cuando se mantenían por debajo de su  $T_m$ , evidenciando la presencia de una fase lipídica rígida. Al acercarse a la temperatura de transición de fase (dentro de  $0.5\text{ °C}$ ), observamos un aumento en la fluctuación de la forma de

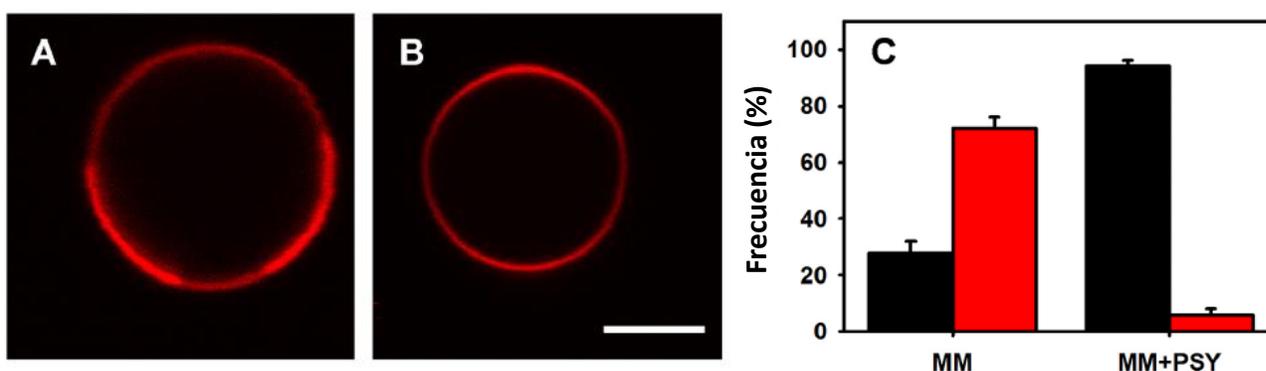
las vesículas (ver series temporales de imágenes en el Anexo 7.1) y una ausencia de ángulos definidos en la circunferencia. Por encima de  $24.0 \pm 0.2$  °C, las vesículas aparecieron circulares y mostraron una baja fluctuación de forma.



**Figura 7.2:** Imágenes de microscopía confocal de GUVs. Vesículas representativas observadas en el plano ecuatorial, compuestas de DMPC (A) y DMPC en presencia de 25% en moles de Psy (B) se muestran a la temperatura indicada. Para ambos sistemas de lípidos, se agregó 0.5% en moles de PE-Rho para la visualización de la membrana. Las imágenes son representativas de  $n > 50$  vesículas analizadas. Las flechas indican la temperatura a partir de la cual las vesículas adoptan una forma circular. La barra de escala es de 5  $\mu\text{m}$ .

Cuando se formaron GUVs de DMPC con 25% en moles de Psy, se observó un efecto similar pero a temperaturas más bajas (Fig. 7.2). Se observaron formas no circulares por debajo de  $19.0 \pm 0.5$  °C, y formas circulares por encima de esta temperatura. Esto indica que Psy induce una disminución de la  $T_m$  en  $\sim 5$  °C en las vesículas de DMPC, probablemente por partición preferencial en la fase  $L_d$ , aumentando su estabilidad termodinámica. Este efecto concuerda con la observación mostrada en el capítulo 5, en el cual se reportó un aumento en el rango de  $\pi$  en la cual ocurre la transición de fases en isotermas de monocapas de fosfolípidos (Fig 5.6) evidenciando una partición preferencial de Psy en las fases más fluidas.

También exploramos el efecto de Psy en la organización de fase lateral de GUVs compuestas por la mezcla MM. La microscopía confocal muestra, en la mayoría de las vesículas analizadas, imágenes de coexistencia de fases líquidas (Fig 7.3A). Este patrón coincide con el observado previamente en vesículas que contienen esfingolípidos y CHO<sup>158,159</sup>: la sonda fluorescente se concentra en la fase Ld y está poco presente en la fase LO, mostrando una diferencia en la intensidad de fluorescencia entre las fases.



**Figura 7.3:** Imágenes de microscopía confocal de GUVs. Las imágenes muestran vesículas representativas en el plano ecuatorial, compuestas de MM que muestran dominios segregados (A) o un patrón homogéneo (B). Se agregó 0.5% en moles de PE-Rho a los sistemas lipídicos para la visualización de la membrana. La frecuencia porcentual de la aparición de vesículas homogéneas (barras negras) o que contienen dominios líquidos (barras rojas) se muestra para GUV compuestas por MM y con adición de 25% en moles de Psy (MM + Psy) (C). Los datos corresponden al promedio de la frecuencia absoluta de cada tipo normalizado por el tamaño de la muestra (40 a 45 vesículas / condición) y las barras de error corresponden a la SEM. La barra de escala es 5  $\mu$ m.

La adición de 25% en moles de Psy a los lípidos MM induce la presencia de GUVs con una mayor proporción de vesículas homogéneas (Fig 7.3), similares a las que se observan en liposomas de fosfolípidos que contienen <15% en moles de CHO<sup>158</sup>. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones mostradas en el capítulo 5, en donde se evidencia que la incorporación de Psy altera el equilibrio de fases líquidas en monocapas compuestas por la mezcla MM (Anexo 5.2). Con estos resultados demostramos que la Psy también tiene la capacidad de cambiar el equilibrio de fases de bicapas lipídicas en la mezcla compleja que imita

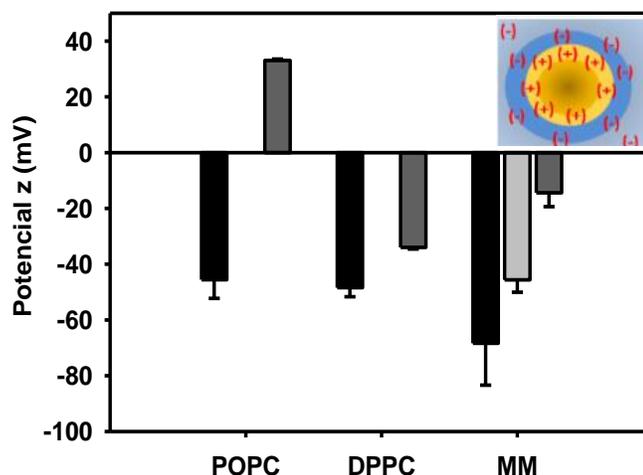
mielina. Aquí, su efecto resultó en la aparición de vesículas homogéneas, disgregando los dominios lipídicos.

### **7.3 Efecto de Psy sobre la electrostática de Superficie en Bicapas Lipídicas.**

Como mencionamos en el capítulo 2, el potencial zeta es el potencial eléctrico en el plano de deslizamiento de una partícula, que es el plano que define su migración en un campo eléctrico <sup>160</sup>. Por lo tanto, el potencial zeta mide el potencial electrostático de largo alcance y no está influenciado por los efectos de dipolos locales en la interfaz. Se sabe que los liposomas de fosfolípidos muestran potenciales zeta negativos debido a la adsorción selectiva a la superficie de los iones, que depende de la temperatura y las condiciones iónicas, así como de la molécula tampón utilizada <sup>160-163</sup>.

Benedini y col emplearon LUVs de DMPC y lo expusieron a concentraciones crecientes de ASC<sub>16</sub> en el rango de 10-30 % en moles. Obtuvieron valores de potencial zeta más negativos a mayor concentración de ASC<sub>16</sub>. Esto evidencia que bajo las condiciones experimentales empleadas (pH= 6), en donde el ASC<sub>16</sub> se encuentra mayoritariamente cargado negativamente, es capaz de incorporarse a las membranas y modificar su electrostática <sup>164</sup>. En este capítulo exploramos el comportamiento electrostático de liposomas de fosfolípidos y mezclas más complejas cuando se le adiciona un lípido catiónico como el Psy.

Nuestros resultados mostraron valores negativos del potencial zeta para LUVs compuestas de POPC y DPPC, como se informó anteriormente <sup>163</sup>, y valores más negativos para las membranas MM, como se esperaba por su naturaleza aniónica (Fig. 7.4).



**Figura 7.4:** Efecto electrostático de Psy en membranas lipídicas. Potencial zeta de suspensión lipídica extruida (0,4 mM) en ausencia (barras negras) o presencia de 10 (barra gris clara, solo para membranas MM) o 25% en moles de Psy (barras gris oscuro). Los experimentos se realizaron en condiciones bajas de sal y pH 7,4, T:  $22 \pm 1$  ° C. La composición lipídica fue POPC, DPPC o mezcla similar a la mielina (MM), como se indica. Los datos son los promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error representan ES.

La adición de Psy a cualquiera de las preparaciones de liposomas dio como resultado un cambio a valores de potencial zeta más positivos. La Psy mostró un efecto más marcado en LUVs de POPC que en las de DPPC. Esto puede ser consecuencia de una menor incorporación de Psy en las membranas de DPPC. Estos resultados están de acuerdo con los mostrados en el capítulo 5, en el cual las monocapas de DPPC mostraron una saturación en la fracción molar ( $X_{50}$ ) de Psy más baja que POPC (Tabla 5.2), y Psy se excluyó parcialmente de las películas de DPPC en el estado LC. Aquí, las LUV formadas por DPPC se encuentran por debajo de su  $T_m$  y estaban presentes en el estado gel<sup>78</sup> que es equivalente a la fase LC descrita en monocapas. Considerando que las suspensión de DPPC-Psy fueron las únicas que mostraron la presencia de partículas de tamaño micelar por DLS (datos no mostrados), es probable que Psy fuera excluida de la membrana fosfolipídica formando estructuras micelares.

Los LUVs de MM fueron altamente afectados por la presencia de Psy. En este caso, la membrana lipídica aniónica pudo aceptar suficiente cantidad de Psy (catiónica) para neutralizar casi el potencial zeta, probablemente estabilizada en la superficie de la membrana formando puentes salinos.

## 7.4 Conclusiones

De manera general observamos que cuando se integran los anfifilos en estudio a las membranas de fosfolípidos muestran una alta sensibilidad al estado de fase. HePC pudo cambiar la  $T_m$  de DPPC hacia temperaturas más bajas mostrando una entropía de transición más alta. También se evidenció el equilibrio de HePC integrado en estructuras de tamaño nanométrico con las MLV enriquecidas con DPPC. Las últimas estructuras de tamaño micrométrico mostraron una saturación del fármaco cercana al 9% en moles, lo que está de acuerdo con las condiciones terapéuticas <sup>115</sup>.

Por otra parte, evidenciamos que Psy induce la ruptura de dominios lipídicos en las bicapas MM, lo que induce la aparición de vesículas homogéneas, como se observó en la microscopía confocal. Esto evidencia una clara partición preferencial de Psy y la estabilización termodinámica de una fase lipídica en detrimento de la otra <sup>139</sup>. Por lo tanto, Psy muestra la potencialidad de regular el equilibrio de fases en mielina <sup>165,166</sup>. A pesar de que nuestros sistemas modelos de membrana están lejos de la complejidad de las membranas celulares, nuestros resultados coinciden con los informes recientes de que Psy tendría la capacidad de disminuir la aparición de dominios sub-micrométricos en glóbulos rojos y oligodendrocitos <sup>41</sup>, proporcionando un soporte termodinámico para explicar dichos procesos.

Teniendo en cuenta que la actividad de varias fosfolipasas, y en particular la esfingomielinasa, depende en gran medida de la presencia de una fase Ld <sup>167,168</sup>, la estabilización de la fase Ld a expensas de la fase LO por la presencia de Psy puede inducir un aumento en la actividad de la fosfolipasa, amenazando la integridad de la membrana de la mielina. En el caso de la HePC la regulación de la reología y textura de membrana que se evidencia en esta tesis puede ser la base del efecto observado en sistemas celulares, no solo sobre la modulación de la actividad de fosfolipasas sino también sobre la regulación de la homeostasis de CHO y lípidos que contienen colina <sup>169,170</sup>. Si consideramos además que el estado de fase de las membranas lipídicas es un factor comprobado que modula la actividad de fosfolipasas involucradas en la transducción de señales; es fácil imaginar una actividad reguladora compleja de estos anfifilos en la homeostasis lipídica.

## **Capítulo 8: Regulación de la acción de fosfolipasas sobre membranas lipídicas por HePC.**

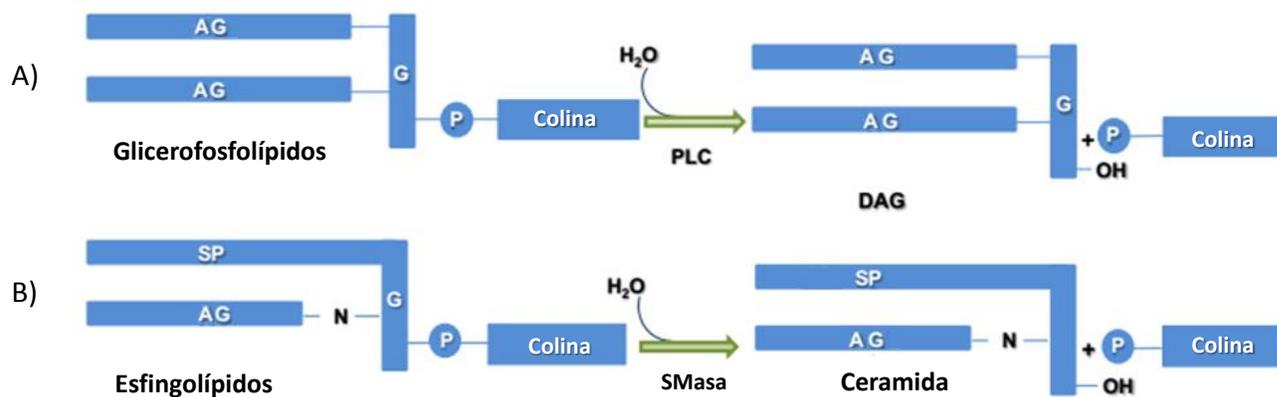
### **8.1 Introducción**

Diversos estudios sugieren que la diferente susceptibilidad celular de los alquilfosfolípidos, como la HePC está basada en una acción diferencial con diferentes membranas celulares. En el Capítulo 5 demostramos que la incorporación de HePC tiene como consecuencia cambios en las propiedades físicas de la membrana huésped. Estos cambios tienen la potencialidad de afectar la acción de fosfolipasas ya sea a nivel de actividad enzimática o sobre los cambios que la formación de productos/desaparición de sustratos tiene sobre las propiedades físicas de esas membranas. Enzimas como la esfingomielinasa (SMasa) y fosfolipasa C (PLC) producen metabolitos lipídicos (ver esquema 8.1) que permanecen en las membranas y alteran propiedades como la electrostática de superficie, el equilibrio de fases en coexistencia lateral y la topología global de la membrana. La acción de SMasa produce CER, un lípido altamente insoluble en fases LE y que se segrega formando dominios condensados ricos en este lípido <sup>46</sup>. Por otro lado, la producción de diacilglicerol (DAG) por PLC y también de CER por SMasa inducen la restructuración de membranas en agregados con alta curvatura,<sup>171</sup> afectando diversos procesos celulares. Estas alteraciones de las propiedades biofísicas de la membrana están estrechamente vinculadas con sus funciones en la señalización celular.

Por otro lado, el mecanismo por el cual la incorporación de HePC a las biomembranas induce los cambios reportados en el metabolismo lipídicos es un aspecto que debe ser explorado integralmente tomando en cuenta no sólo los aspectos bioquímicos de dichos cambios sino los biofísicos.

La acción de enzimas relacionadas al metabolismo lipídico, como las fosfolipasas, es muy susceptible a cambios en el entorno físico de la membrana y a su vez transmiten información

indirectamente a otras vías metabólicas a través de cambios estructurales, electrostáticos y de estados de fases de las biomembranas donde actúan <sup>172</sup>.



Esquema 8.1: Representación esquemática de la hidrólisis de un glicerofosfolípido por la acción de la PLC (A) e hidrólisis de la esfingomiélin por la SMasa. (B). AG: ácidos grasos; SP: esfingosina, G: glicerol y P: fosfato. Esquema tomado de Ref<sup>173</sup>.

Nuestra hipótesis de trabajo consiste en que los alquifosfolípidos podrían ejercer su función farmacológica afectando la acción de estas enzimas indirectamente mediante la modulación de dichas propiedades de membranas.

## 8.2 Determinación de la actividad enzimática de fosfolipasas (PLC y SMasa)

Se eligió una fuente bacteriana de enzima, *Bacillus cereus* por su disponibilidad y uso extensivo en estudios similares por otros autores. Tanto las PLCs como las SMasas bacterianas poseen semejanzas estructurales y mecanismo aparentemente similar a las PLC y SMasas neutra de mamíferos <sup>174</sup>. En este estudio nos focalizaremos en las consecuencias de la formación de productos de las reacciones que estas enzimas catalizan, independientemente de su origen. Estas características son comunes a las enzimas de distintas fuentes biológicas. Los sustratos en el presente estudio fueron LUVs compuestas por DOPC: DOPE o SM<sub>16</sub>: DOPE según la enzima empleada. La adición de una PE a nuestro sistema lipídico responde a los reportes de Basañez

y colaboradores que indican que lípidos que no son sustratos de estas enzimas y poseen una curvatura intrínseca negativa, como la PE o el CHO ejercen un efecto activador de la reorganización estructural inducida por la acumulación de productos<sup>174</sup>.

Cuando las LUVs compuestas por DOPC: DOPE se trataron con PLC se detectó una actividad enzimática, cuantificando el producto mediante TLC. En los primeros 6 min se obtuvo un aumento progresivo en la formación de DAG alcanzándose un 20 % tanto en ausencia como en presencia de HePC (Fig 8.1A). A partir de estos datos se determinó la velocidad enzimática de la reacción y los resultados se muestran en la tabla 8.1; indicando que la presencia de la HePC no afectó la velocidad inicial de la reacción enzimática.

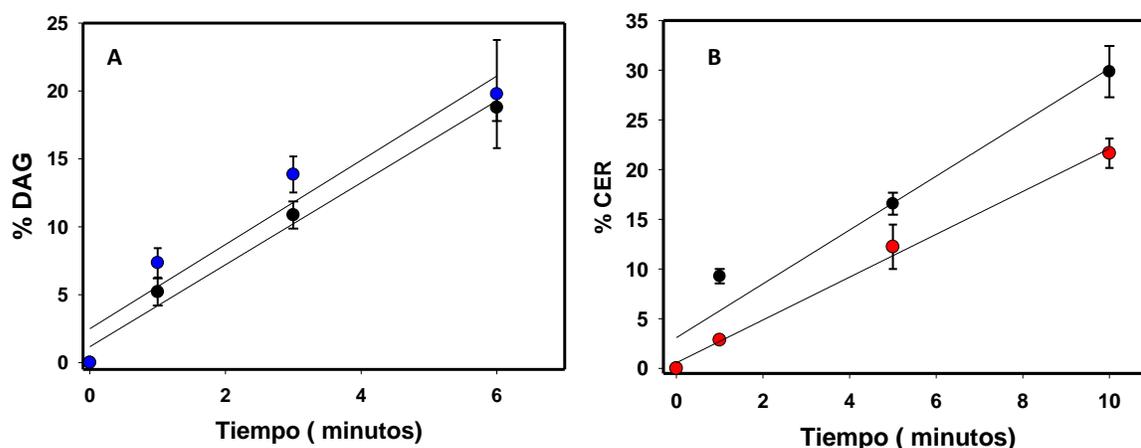


Figura 8.1: Actividad enzimática de las fosfolipasas empleadas. Acción de la PLC sobre LUVs que contienen DOPC: DOPE (relación 80:20) o en presencia de 20 mol % HePC (A). Acción de la SMasa sobre LUVs compuestos de SM<sub>16</sub>: DOPE (relación 70:30) o en presencia de 20 mol % HePC (B). Los círculos experimentales corresponden a la formación de DAG o CER en ausencia (círculos negros) y presencia de HePC (círculos azules o rojos respectivamente). Se empleó una concentración final de lípidos de 0,4 mM y se trataron en el momento cero con PLC ( $3 \times 10^{-4}$  U/ml) o SMasa ( $2,8 \times 10^{-2}$ U/ ml).

Los LUVs compuestos por SM<sub>16</sub>: DOPE expuestas a SMasa mostraron la formación de CER como consecuencia de su actividad enzimática (Fig 8.1B) alcanzándose un 30 % en la formación de producto en los primeros 10 minutos de la reacción. Las velocidades en la actividad inicial de la enzima obtenidas se muestran en la tabla 8.1. Lo cual indica que la HePC no afectó la velocidad de la reacción catalizada por SMasa, al igual que lo observado para PLC.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Berkovic y col los cuales emplearon otras fosfolipasas ( PLD y SMasa ácida) en líneas celulares de leucemia y reportaron que la HePC no afectó la actividad de esas enzimas <sup>175</sup>.

**Tabla 8.1:** Velocidad enzimática determinada para PLC o SMasa sobre LUVs que contienen DOPC: DOPE (relación 80:20) para PLC o LUVs compuestos de SM16: DOPE (relación 70:30) para SMasa en ausencia y presencia de 20 mol % de HePC. La concentración de lípidos fue 0,4 mM y de enzimas: PLC  $3 \times 10^{-4}$  U/ml y SMasa  $2,8 \times 10^{-2}$  U/ ml.

	$V_0$ (U.ml <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) PLC	$V_0$ (U.ml <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) SMasa
- HePC <sup>ns</sup>	2.98 ± 0.03	2.1 ± 0.2
+ HePC <sup>ns</sup>	3.2 ± 0.3	2.6 ± 0.1

ns :Las diferencias no son estadísticamente significativas

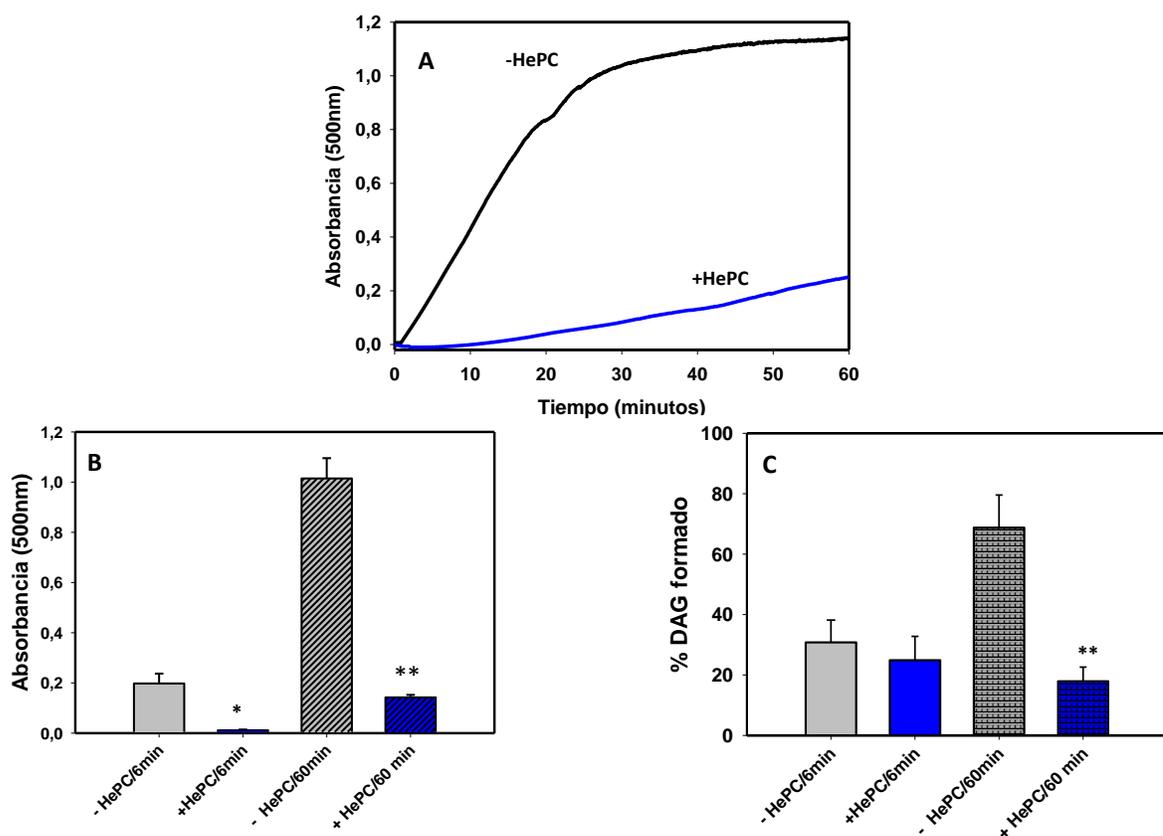
### 8.3 Efecto de HePC en la restructuración de membrana por acción de fosfolipasas.

#### 8.3.1 PLC

En paralelo a los estudios de la extensión de la hidrólisis de LUVs compuestas por DOPC: DOPE por la acción de PLC, estudiamos el cambio en la turbidez en la suspensión de LUVs ( Fig 8.2 A). Nuestros resultados muestran un aumento progresivo en la turbidez luego de añadida la enzima. Este aumento de la turbidez se interpretó como una indicación de agregación de vesículas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Basañez y col. donde describieron el mismo efecto, asociándolo a una explosión de la actividad de la enzima luego de una fase de latencia<sup>174</sup>.

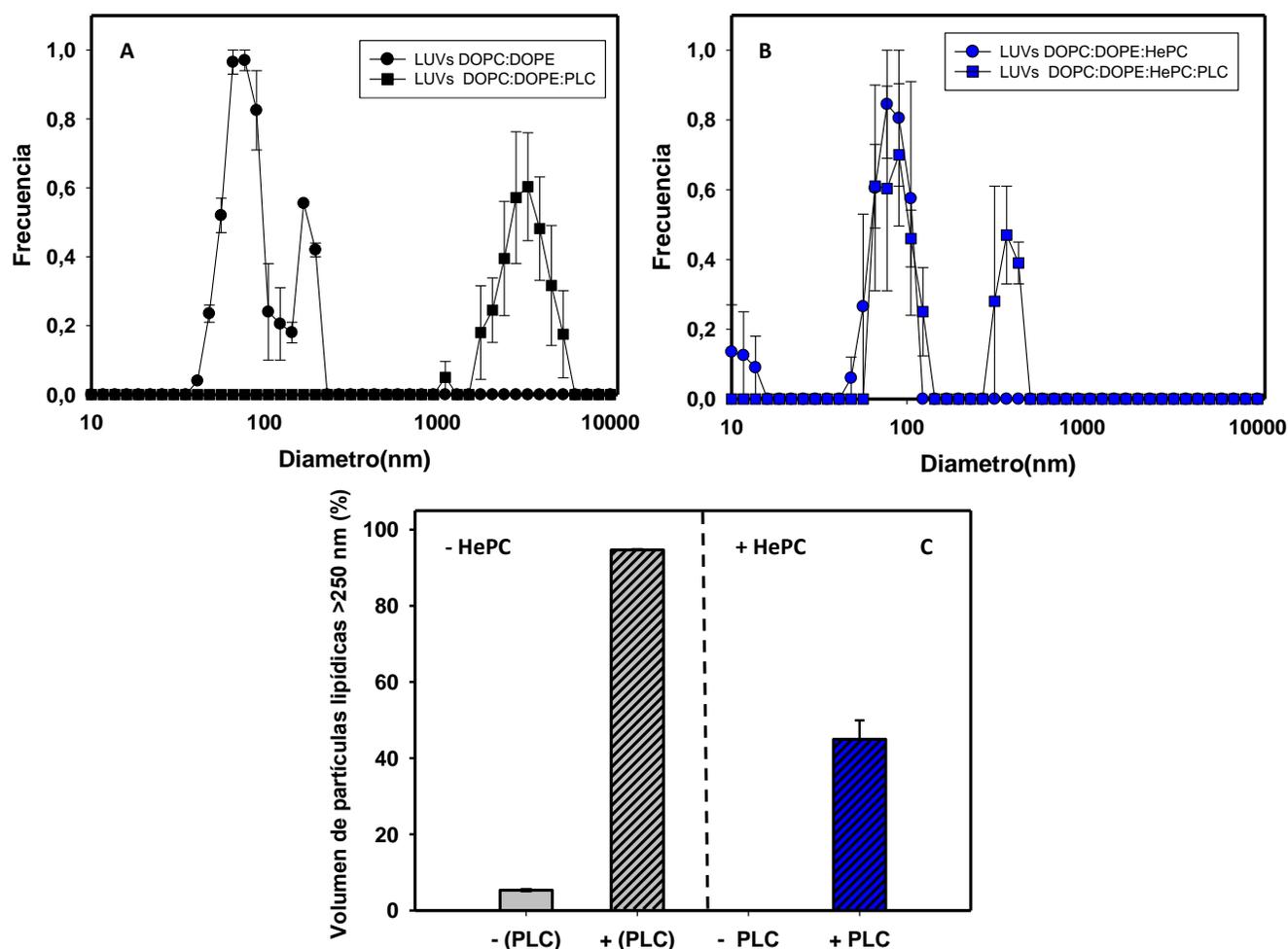
La adición de 20 % en moles de HePC a nuestro sistema claramente mostró una drástica disminución de la agregación de las vesículas, evidenciado por una disminución de la absorbancia observada en las curvas de agregación (Fig. 8.2 A). Este efecto se cuantificó a los 6 y 60 minutos, representando una disminución de la absorbancia de un 95 y 82 % respectivamente (Fig 8.2 B). A su vez, un análisis de la extensión de la hidrólisis de LUVS

(DOPC: DOPE o DOPC: DOPE: HePC) en presencia de PLC a tiempos cortos claramente mostró que no hay diferencias significativas en la formación de producto. Mientras que a tiempo final, cuando la mayor parte de la PC esta hidrolizada, se obtuvo que la HePC disminuye tres veces la formación de DAG en comparación con el control (Fig 8.2 C). Nuestros resultados evidencian por primera vez que HePC es capaz de inhibir la acción enzimática y por ende la agregación inducida por la PLC de una manera notable.



**Figura 8.2:** Acción de la PLC sobre vesículas. Curvas de Agregación de LUVs de 100 nm compuestas por DOPC: DOPE relación molar 80:20 expuestas a PLC ( $7,5 \times 10^{-3}$  U/ml) a 37°C en ausencia (línea negra) y presencia de HePC 20 % en moles (línea azul) (A). La actividad enzimática fue monitoreada por turbidimetría obteniéndose curvas de absorbancia vs tiempo. Comparación de los valores de absorbancia obtenidos a los 6 y 60 min en ausencia (barras grises) y presencia de HePC (barras azules) (B). Cuantificación de la formación de DAG medido a los 6 y 60 minutos mediante TLC en ausencia (barras grises) y presencia de HePC (barras azules) (C). En todos los casos la concentración total de lípidos fue 0,4 mM. Estos experimentos se realizaron por triplicado, valores promedio  $\pm$  SEM (n=3)\* P<0,05 o \*\*P < 0,0001.

Se confirmó la formación de partículas lipídicas grandes a partir de una población de vesículas de 100 nm por la acción de la PLC siguiendo los cambios inducidos en la distribución de tamaño de partículas por DLS (Fig 8.3). Tanto las vesículas de DOPC: DOPE utilizadas como controles, como los liposomas conteniendo HePC, mostraron una población de partículas casi monodispersa, en forma de campana centrada a 100 nm en el diámetro (Fig 8.3A). Además, las suspensiones que contenían HePC mostraron una pequeña población cercana a los 10 nm, que pudiera corresponder a micelas enriquecidas en HePC (Fig 8.3B).



**Figura 8.3:** Gráficas representativas de las diferencias en la distribución de tamaño poblacional de partículas lipídicas que inicialmente contenían DOPC: DOPE antes (círculos negros) y después (cuadrados negros) de la acción de la PLC. Las LUVs de 100 nm de diámetro preparadas con DOPC: DOPE con una relación molar 80:20, se expusieron a PLC ( $7,5 \times 10^{-3}$  U/ml) a 37 °C y se incubaron durante 60 minutos. Luego, el tamaño de los liposomas se determinó mediante DLS. Comparación de distribución de tamaño de LUVs en ausencia (círculos azules) (A) y presencia de HePC 20 mol % (cuadrados azules) (B). El análisis se realizó considerando el volumen de partículas

lipídicas mayores de 250 nm con respecto al total, calculadas como la integral de las curvas de distribución de volumen de partículas vs diámetro (C). Valores promedios  $\pm$  SEM de experimentos realizados por triplicado

La hidrólisis enzimática de PLC indujo la aparición de poblaciones más grandes en la distribución de partículas que contenían LUVs de DOPC: DOPE o DOPC: DOPE: HePC (Fig 8.3 A y B). Cabe señalar que en presencia de HePC se generaron agregados de menor tamaño y un porcentaje de la población se mantuvo cerca de los 100 nm. Esto último indica que una parte de la población no se agregó; evidenciando que la presencia de HePC inhibió la agregación de la membrana inducida por la producción de DAG. Notablemente, cuando se generó DAG; en ausencia de HePC cerca del 95 % de la población de partículas se organizó en estructuras con un diámetro mayor a 250 nm, en contraste con el 45% de las vesículas observada a tiempo final cuando contenían a HePC (Fig 8.2 C). Estos resultados evidencian que la HePC es un potente inhibidor de la acción enzimática y agregación inducida por el DAG.

El proceso catalítico ocurre de forma asimétrica ya que la enzima actúa sólo en la hemicapa externa de la membrana. Al ser DAG un lípido con una cabeza polar pequeña y alta dinámica de flip-flop, la membrana resultante da una conversión enzimática rápida se encuentra altamente tensionada y en un estado muy alejado de su equilibrio composicional y de curvatura. Todo este panorama favorece la agregación de las vesículas con formación de estructuras intermediarias con curvatura altamente negativa, lo que relaja la tensión geométrica de la membrana rica en DAG. Otros autores han planteado que la agregación de las vesículas se debe al estrés de repulsión de hidratación e incluso a la débil interacción de van der Waals entre partículas coloidales, de manera que cualquier superficie de una bicapa curva debe deformarse hasta cierto punto cuando está en contacto adhesivo con otra vesícula <sup>176</sup>. En esta zona de adhesión aumenta la tensión lateral de la bicapa<sup>177</sup> y el lípido es inducido a adoptar una disposición estresada <sup>178</sup>.

Los resultados mostrados en esta sección junto con los de la sección anterior indican que HePC no afecta la velocidad inicial de la hidrólisis de DOPC ni la producción de DAG a tiempos cortos de la reacción (6 min). Sin embargo, la presencia de HePC inhibió la restructuración de

membranas característica del proceso de formación enzimática de DAG. Ésta deficiencia en su capacidad de reestructurar las membranas lipídicas dió como consecuencia una inhibición de la posterior formación de producto (Fig. 8.2C).

Se ha reportado que la activación de la PLC se puede explicar en términos de una hipótesis según la cual (a) la actividad enzimática completa requiere la presencia de irregularidades o defectos en la superficie de la membrana; (b) el DAG generado enzimáticamente produce algún tipo de separación de fases, con formación de "parches" o dominios ricos en DAG, con alta tendencia a formar estructuras curvas, induciendo la agregación de las vesículas a través de contactos entre esos parches y (c) la agregación estabiliza las inhomogeneidades de la superficie que permiten el acceso de la enzima a mayor cantidad de sustrato (lípidos de la hemicapa interna).<sup>174</sup> A su vez, la reestructuración de membranas brinda la posibilidad de que DAG difunda lateralmente con continuidad hacia las membranas originalmente de otras vesículas disminuyendo el efecto de la inhibición por producto. Todo ello, favorece una mayor extensión en la hidrólisis enzimática de PC a tiempos largos, como se observó en la Fig. 8.2C. Por lo tanto, la cinética de la catálisis enzimática se acopla a la cinética de agregación de las vesículas lipídicas y por el contrario una inhibición de dicha agregación inhibe la evolución de la catálisis enzimática a tiempos largos.

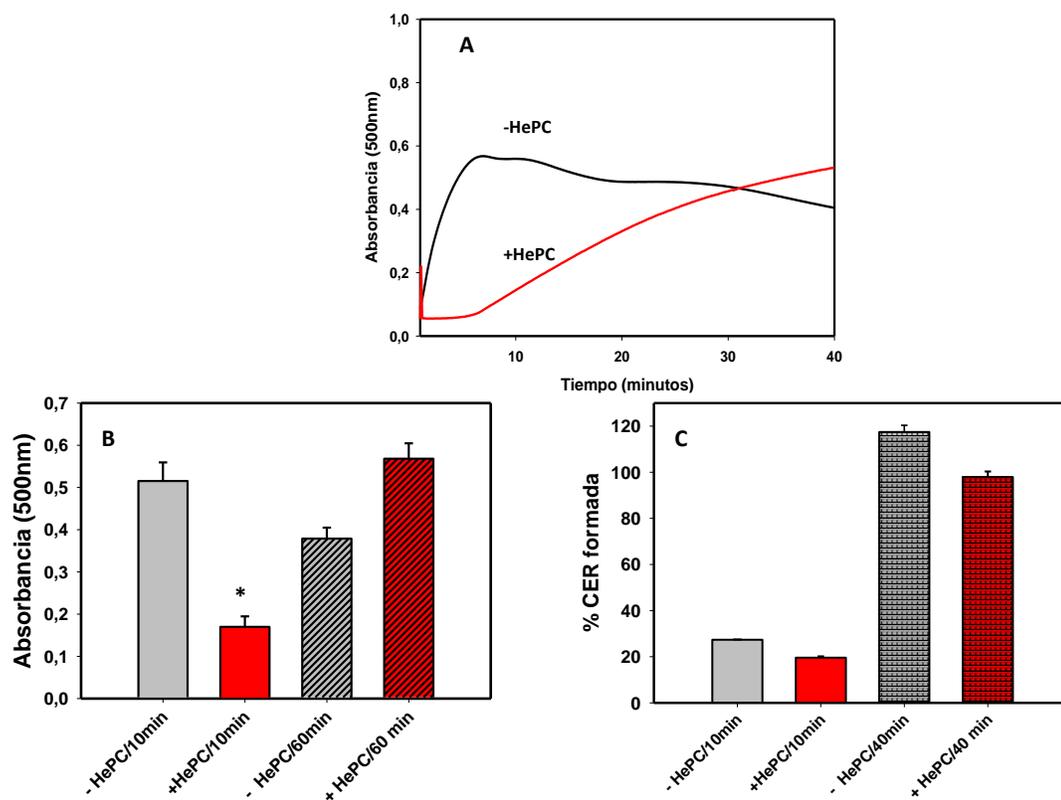
Nieva y col.<sup>179,180</sup> han descrito, que para cierta composiciones de bicapas (por ejemplo, PC de huevo: PE de huevo: CHO) la PLC induce la agregación y luego la fusión de las vesículas lipídicas. Además reportaron que el proceso de fusión se abolió, de forma semejante a lo observado para HePC, cuando se incorporó la liso-PC un lípido con similitudes estructurales con HePC en los liposomas al 10% en moles, mientras que la actividad hidrolítica de la enzima permaneció sin cambios <sup>180</sup>.

Nuestros resultados evidencian la capacidad de la HePC de inhibir la agregación de las vesículas por la producción enzimática de DAG y como consecuencia la inhibición en la extensión de reacción. HePC es un alquilisofosfolípido que presenta una geometría efectiva en

forma de cono ( $P_c = 0,29$ ), el cual al insertarse en las bicapas puede inducir una curvatura positiva contrarrestando el efecto causado por el DAG.

### **8.3.2 SMasa**

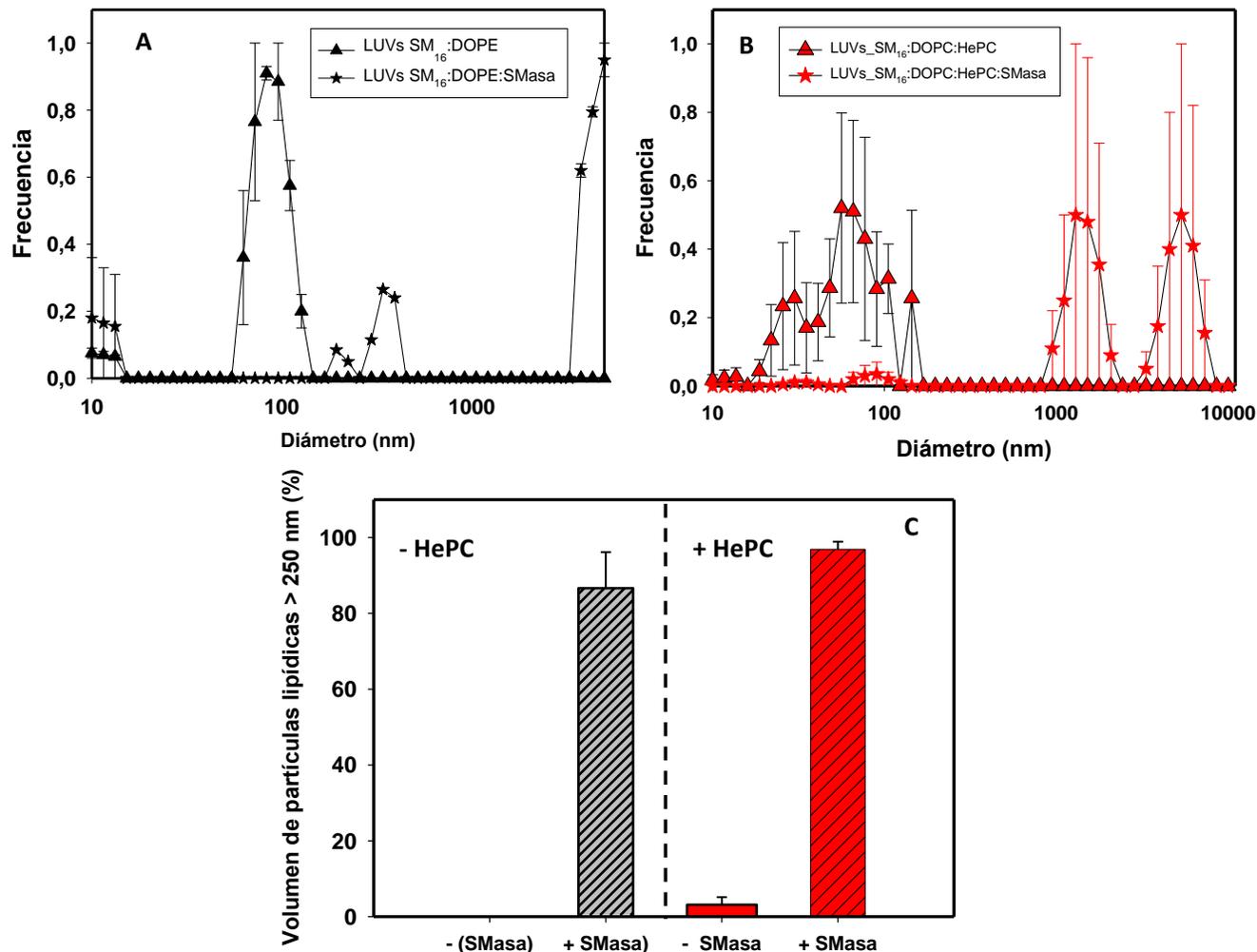
En esta sección estudiamos la acción de SMasa sobre vesículas lipídicas y el efecto de la HePC sobre las mismas de manera similar a lo descrito anteriormente para PLC. Los resultados de la Fig 8.4 A muestran que la adición de SMasa a liposomas mezclas de SM<sub>16</sub>:DOPE en ausencia y presencia de HePC induce un aumento de la turbidez con el tiempo. El análisis de estas curvas muestra que en presencia de HePC este aumento en la turbidez, relacionado a la agregación de las vesículas, tiene una cinética más lenta en comparación con el control. Esta diferencia es significativa a tiempos cortos (hasta los 10-15 min); mientras que a tiempo final ( $t = 40$  min) en ambas condiciones no se observaron diferencias significativas en los valores de absorbancia alcanzados (Fig 8.4B). El análisis cuantitativo de la extensión de la hidrólisis de SM en ausencia y presencia de HePC a los 10 y 40 minutos se muestra en la Fig 8.4 C. Tanto a tiempos cortos como largos, la presencia de HePC no produjo diferencias significativas sobre la cantidad de CER formada en comparación con el control. Lo que evidencia que la HePC no afectó la actividad enzimática de la SMasa en nuestras condiciones experimentales.



**Figura 8.4:** Acción de SMasa sobre vesículas. La restructuración de vesículas fue evidenciada por método de Turbidimetría obteniéndose curvas de absorbancia vs tiempo. Curvas de agregación de LUVs de 100 nm compuestas por SM16: DOPE relación molar 70:30 expuestas a SMasa (1,4 U/ml) a 37°C en ausencia (línea negra) y presencia de HePC (línea roja) (A). Comparación de los valores de absorbancia obtenidos a los 10 y 40 min en ausencia (barras negras) y presencia de HePC (barras rojas) (B). Cuantificación de la formación de CER medido a los 10 y 40 minutos, mediante TLC en ausencia (barras negras) y presencia de HePC (barras rojas) (C). En todos los casos la concentración total de lípidos fue 0,4 mM. Estos experimentos se realizaron por triplicado, se muestran valores promedio  $\pm$  SEM (n=3) \*P < 0,05.

El análisis de la distribución de tamaño de partículas arrojó que en ausencia de SMasa, los LUVs conteniendo SM<sub>16</sub>: DOPE mostraron una población de vesículas con diámetro ~ 100 nm. Las vesículas conteniendo 20 mol% de HePC también mostraron la presencia de una población de partículas más pequeña con centro en ~50 nm. La hidrólisis enzimática de SM indujo la polidispersión en la distribución de partículas, observándose poblaciones más grandes tanto en ausencia como en presencia de HePC (Fig 8.5). Estos resultados con SMasa

muestran un efecto modesto de la HePC sobre la reestructuración de las vesículas lipídicas a tiempos largos en comparación con el notable efecto observado a tiempos cortos.

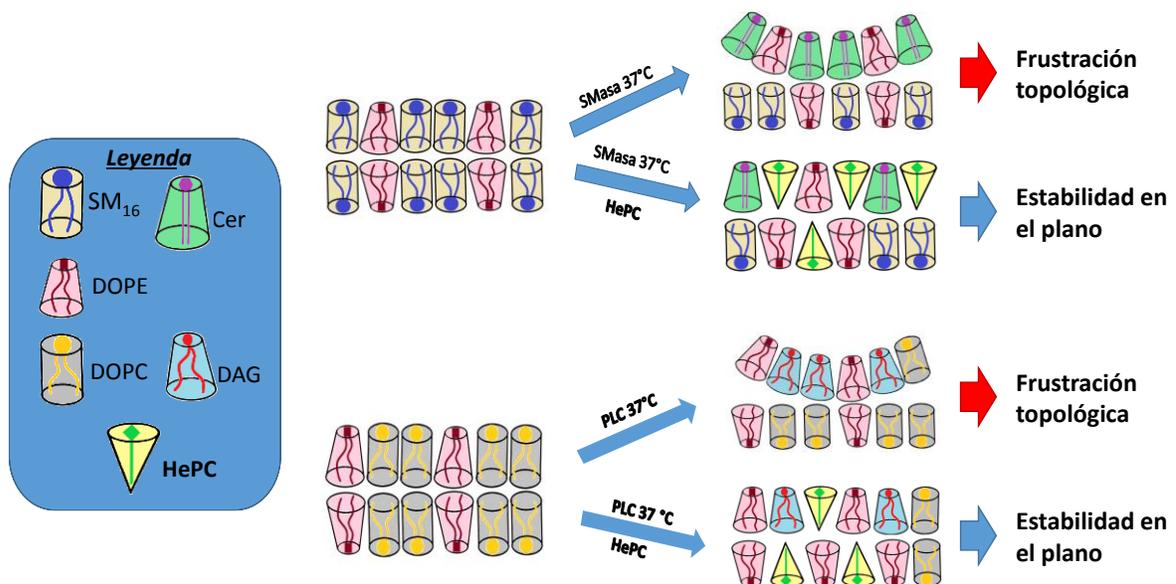


**Figura 8.5:** Gráficas representativas de las diferencias en la distribución de tamaño poblacional de partículas lipídicas que inicialmente contenían SM<sub>16</sub>: DOPE antes (triángulos negros) y después (triángulos rojos) de la acción de la SMasa. Las LUVs de 100 nm de diámetro preparadas con SM<sub>16</sub>: DOPE con una relación molar 70:30, se expusieron a SMasa (1,4 U/ml) a 37 °C y se incubaron durante 40 minutos. Luego, el tamaño de partícula se determinó mediante DLS. Comparación de los perfiles de distribución de tamaño de LUVs en ausencia (estrellas negras) (A) y presencia (estrellas rojas) de HePC 20 mol % (B). El análisis se realizó considerando el volumen de partículas lipídicas, que fueron mayores de 250 nm con respecto al total, calculados como la integral de las curvas de distribución de volumen de partículas vs diámetro (C). Valores promedios ± SEM.

Ruiz Arguello y col, describieron que la SMasa de *B. cereus* es muy poco activa frente a bicapas de SM a 37°C donde el lípido forma una estructura de tipo gel<sup>181</sup>. Al incluir PC o PE en la mezcla de lípidos se consigue disminuir la temperatura de transición de gel a fluido y con

ello aumenta la actividad de la SMasa a 37°C. En forma similar a la producción de DAG por PLC, la acción de SMasa genera CER asimétricamente, en la hemicapa externa de las vesículas. CER, al igual que DAG, contiene una cabeza polar pequeña en comparación con las dos cadenas hidrocarbonadas de su región hidrofóbica, otorgándole una geometría general de cono invertido. Por lo tanto, su acumulación asimétrica en la bicapa lipídica genera estructuras altamente tensionadas topológicamente (Esquema 8.2). En GUVs sometidas a la acción de SMasa, esta frustración induce la gemación de vesículas pequeñas a partir de la vesícula gigante<sup>182</sup>. En sistemas vesiculares pequeños, esta frustración topológica se relaja al producirse los eventos de fusión de membrana, como se describió para el caso de la generación enzimática de DAG.

La presencia de HePC enlentece la agregación de vesículas sometidas a la rápida acción de SMasa a tiempos cortos, probablemente porque relaja la frustración topográfica generada por CER al tener una simetría complementaria. Sin embargo, a tiempos largos la acción de SMasa prevalece y aparecen estructuras agregadas que permiten la evolución de la catálisis hasta valores similares a los obtenidos en ausencia de HePC.



Esquema 8.2: Diagrama esquemático de las formas moleculares ocupados por varios tipos de lípidos de membrana. Complementariedad geométrica de los lípidos empleados (sustratos de las enzimas SMasa y PLC) antes y después de su acción. Efecto causado por la HePC.

#### **8.4 Conclusiones**

Nuestros resultados ponen en evidencia que la HePC tiene la capacidad de modular la acción de fosfolipasas, de forma no clásica, a través de la modulación de la estructura de las membranas ricas en DAG o CER. Este efecto fue probado en la acción de dos enzimas que degradan lípidos estructuralmente diferentes (glicero y esfingofosfolípidos) teniendo en común que los productos contienen grupos polares pequeños y estructuras de cono invertido. Por lo tanto, los resultados expuestos aquí no se relacionarían con una inhibición o interacción específica de HePC con los sustratos o productos de la reacción sino con una compensación geométrica no específica, alterando la curvatura intrínseca de la membrana observada como un continuo.

HePC, si bien no modifica la actividad de PLC o SMasa, si causa alteraciones en los efectos producidos por los productos generados por la acción de estas enzimas evidenciándose un efecto marcado en la inhibición de la agregación causada por la formación de DAG y CER. Estos dos lípidos son conocidos protagonistas de las cascadas de señalización de muchos procesos biológicos. Dichas acciones están íntimamente relacionadas con su capacidad de modificar las propiedades biofísicas de las membranas <sup>183</sup>. Por lo tanto, los resultados reportados en esta tesis cobran relevancia en la comprensión del mecanismo de acción por el cual la HePC regula el metabolismo lipídico y vías de transducción de señales en las que estas enzimas intervienen.

## **Capítulo 9: Conclusiones Generales**

Los anfifilos propuestos en esta tesis (ASCn, HePC o PSY) ejercen su acción farmacológica o función celular debido a su naturaleza anfifílica. Todos estas funciones implican interacción de los mismos con las membranas celulares y / o estrato córneo en piel. A pesar que el estudio de anfifilos de moderada solubilidad en agua con membranas biológicas ha sido extensamente estudiado, las bases fisicoquímicas de su mecanismo de interacción permanecen pobremente entendidas. En la literatura en general habían pocos reportes de estudios sistemáticos de las dependencia de interacciones (anfifilo +membrana) con el estado físico de la membrana y /o la presencia de dominios lipídicos. A partir de esta problemática durante el transcurso de esta tesis surgieron interrogantes relacionadas con: ¿Cuál sería la selectividad de estos anfifilos a su incorporación en distintos tipos de membranas? ¿Si las propiedades reológicas de la membrana huésped modularían la incorporación de los mismos? y a su vez ¿si estos anfifilos tenían la capacidad de alterar las propiedades reológicas de las membranas después de su incorporación? En este sentido el trabajo desarrollando durante esta tesis contribuyó a ampliar las bases fisicoquímicas de interacción de moléculas anfifílicas de moderada solubilidad (como los anfifilos estudiados) con biomembranas con diferentes características de fase.

En una primera etapa nos planteamos la caracterización fisicoquímica de los anfifilos propuestos y de las membranas lipídicas modelos (ver capítulo 3 y 4). Los cuales presentaron una alta actividad de superficie (estudios de monocapas de Gibbs) y a un pH cercano a la neutralidad exhibieron diferentes propiedades electrostáticas. Por otro lado la disponibilidad de una amplia variedad de membranas modelo nos resultó en una herramienta muy beneficiosa en la caracterización de componentes de membrana purificados y en el estudio de sus propiedades fisicoquímicas en las distintas escalas espacio-temporales, empleando de diversas técnicas experimentales (monocapas de Langmuir, BAM y seguimiento de partícula única). Esto constituyó un primer paso para abordar de manera profunda el entendimiento de las propiedades físicas de estas membranas y establecer las diferencias en estos sistemas modelos.

En una segunda etapa nos propusimos abordar la selectividad de los anfifilos hacia diferentes membranas y su acción como agentes perturbadores de las mismas. Asimismo investigamos si la incorporación de estos anfifilos a membranas lipídicas pudiera estar regulada por sus propiedades reológicas. Nuestros resultados permitieron un avance en la comprensión de la relación entre  $\pi_{eq}$  y la capacidad de absorción de anfifilos a membranas con diferentes características de fase. Para fármacos, así como para proteínas anfitrópicas, ha prevalecido durante largo tiempo una correlación entre el aumento de  $\pi$  y la cantidad de proteína en la interfaz. Generalmente empleando experimentos de penetración para estimar afinidad de los anfifilos por membranas<sup>3,110</sup>. Sin embargo nuestros resultados sugiere fuertemente que el aumento en  $\pi$  después de la incorporación de un anfifilo a la membrana lipídica no tiene una relación lineal con la extensión de incorporación de tales anfifilos en la superficie; esta relación está fuertemente influenciada por las propiedades de compresibilidad de la película. El aumento observable resultante de  $\pi$  es una función de la capacidad para incorporar tal anfifilo, así como la respuesta de la película sobre un estrés dilatacional. Encontramos que esta incorporación es mayor en membranas más fluidas en comparación con membranas más compactas, incluidas las que contenían esteroides, cuantificado mediante los experimentos de titulación superficial (ver sección 5.3). De modo que planteamos que esta diferente sensibilidad puede estar relacionada con las diferencias encontradas en las propiedades reológicas de las membranas lipídicas.

Además resaltamos que cuando se integran los anfifilos de estudio a las membranas de fosfolípidos muestran una alta sensibilidad al estado de fase. Los mismos se particionan preferentemente a la fase desordenada ya sea en monocapas (experimentos BAM, ver sección 5.4) o en bicapa lipídicas (experimentos de DSC y Microscopía de fluorescencia confocal empleando GUVs, ver capítulo 7) afectando el equilibrio de fase de manera similar a la descrita para otros anfifilos de moderada solubilidad y péptidos anfipáticos<sup>139</sup>.

En su conjunto el trabajo desarrollado en esta tesis ha destacado la preponderancia de las propiedades estructurales y reológicas de las distintas membranas lipídicas utilizadas (estados de fase, compresibilidad, difusión lateral y presencia de dominios lipídicos) en la interacción

con estas familias de anfifilos. De estos estudios surge la compresibilidad de la membrana como el principal parámetro físico que regula la incorporación de los mismos. Evidenciándose un fuerte patrón, que indica que su inserción en biomembranas resulta en películas más compresibles, con una disminución del  $Cs^{-1}$ . Observándose una correlación inversa entre  $Cs^{-1}$  de las películas lipídicas y su capacidad de incorporación de los anfifilos<sup>29,78</sup>. Este efecto puede entenderse ya que, en películas con alto  $Cs^{-1}$  responde a una pequeña compresión lateral inducida por la molécula de anfifilo entrante con un alto aumento en la presión de la superficie lateral. Esto, a su vez, actúa como una fuerza contraria a la incorporación de las moléculas de anfifilos. Esto no es a priori un hallazgo obvio, aportando estos resultados a extender el conocimiento centrado en el aspecto de interacción de fármacos anfifílico -membrana, tomando este sistema no desde un punto de vista molecular sino como un sistema de materia blanda.

Por otra parte hemos visto que esta capacidad de los anfifilos estudiados de perturbar la membrana adquiere relevancia en el contexto de permeación dérmica mejorada de fármacos a través del SC piel (ver capítulo 6) o en eventos relacionados con el metabolismo lipídico tanto sobre su actividad enzimática como en el efecto estructural que sus productos ejercen sobre la membrana huésped (ver capítulo 8). En este sentido, nuestros resultados evidenciaron por primera vez que HePC es capaz de inhibir la acción enzimática y por ende la agregación inducida por la PLC de una manera notable.

En su conjunto podemos decir que el estudio de las propiedades fisicoquímicas de membranas lipídicas modelos nos permite comprender a nivel molecular los fenómenos que ocurrirían en membranas celulares, así como también predecir el comportamiento de determinados anfifilos (como los de propuestos en esta tesis) en su interacción con las mismas, permitiéndonos comprender mejor el papel de los lípidos en sistemas más complejos como es una membrana biológica. Lo cual es de suma importancia en enfermedades en las cuales estos anfifilos están involucrados como el cáncer, Leishmaniosis o enfermedad de Krabbe.

En esta tesis se demuestra que los anfifilos empleados son fuertes perturbadores de las membranas lipídicas y que tienen la potencialidad de alterar la acción de enzimas que actúan sobre membranas a través de la modificación de sus propiedades físicas. Esto abre nuevas

perspectivas para una exploración más amplia de la familia de los ASCn para la expansión potencial de su uso en tratamientos sistémicos así como en el suministro dérmico y trasndérmico de componentes activos. Además teniendo en cuenta que su acción farmacológica implica actividad citotóxica y de nuestros estudios biofísicos, en los cuales la longitud de la cadena regula sutilmente la efectividad de su acción en membranas lipídica modelos; es interesante estudiar en sistemas más complejos (líneas celulares) si este efecto se relaciona con alteraciones en la homeostasis de los lípidos de manera similar al conocido mecanismo de la HePC. Incluso si la acción de ambos fármacos pudiera tener un mecanismo en común o acción combinada, relacionado con la afectación de la membrana.

## **Capítulo 7**

Serie temporales de imágenes de microscopía confocal de GUVs representativos de vesículas compuestas de DMPC (A) y DMPC en presencia de 25% en moles de PSY .Se pueden encontrar en el siguiente enlace: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.09.015>.

## Referencias Bibliográficas

- (1) Bagatolli, L. A. y M. O. Membranas Biológicas-Modelos y Modas. Vida ¿una cuestión de grasas?; *Springer International Publishing: Quito*, **2014**; 89–96.
- (2) Singer, S.J and Nicolson Garth.L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **1972**,175,720-731.
- (3) Chiranjeevi, P.; Stine, A. and Labhasetwar, V. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Mol Pharm* **2009**, 6 (5), 1264–1276.
- (4) Joglar, C.; Quintanilla, M.; Ravanal, E. and Brunstein, J. El Desarrollo Histórico Del Modelo Científico de Membrana Plasmática: Perspectivas Didácticas. *Comunicación oral I Encuentro Iberoamericano de Investigación en Didáctica de las Ciencias – I IEPEC* **2011**.
- (5) McKinnon, L. and Gilbille, D. Model membranes vs biological membranes. *LibreTexts Physics* **2019**.
- (6) Israelachvili, J. Intermolecular & Surface Forces. *Second edition. Academic Press* **1977**, 469, 221–225.
- (7) Bloom, M and Mouritsen, O.G. The Evolution of Membranes. *Handbook of Biological Physics. Elsevier Science B.V.* **1995**, 1, 65–95.
- (8) Stillwell, W. An Introduction to Biological Membranes: From Bilayers to Rafts. **2013**.
- (9) Carquin, M.; Auria, L. D.; Pollet, H.; Bongarzone, E. R. and Tyteca, D. Recent Progress on Lipid Lateral Heterogeneity in Plasma Membranes: From Rafts to Submicrometric Domains. *Progress in Lipid Research* **2016**, 62, 1–24.
- (10) Herráez, A. and Carrero, I. El Mundo de Los Lípidos. <http://biomodel.uah.es/model2/lip/inicio.htm>.
- (11) Van Meer, G.; Voelker, D. R. and Feigenson, G. W. Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008**, 9, 112–124.
- (12) Henkart, P. Fluidity of Cell Membranes—Current Concepts and Trends. *International Review of Cytology* **1972**, 60, 121–127.
- (13) Catapano, E. R.; Espinosa, G.; Arriaga, L. R.; Langevin, D. and Monroy, F. Shear and Compression Rheology of Langmuir Monolayers of Natural Ceramides: Solid Character and Plasticity. *Langmuir* **2013**, 29(22), 6634–6644.
- (14) Bahri, M. A.; Heyne, B. J.; Hans, P.; Seret, A. E.; Mouithys-Sickel, A. A. and Hoebeker, M. D. Quantification of Lipid Bilayer Effective Microviscosity and Fluidity Effect Induced by Propofol. *Biophysical Chemistry* **2005**, 114, 53–61.
- (15) Harland, C. W.; Bradley, M. J. and Parthasarathy, R. Phospholipid Bilayers Are Viscoelastic. *PNAS* **2010**, 107 (45), 19146–19150.
- (16) Cicuta, P. and Donald, A. M. Microrheology: A Review of the Method and Applications. *Soft Matter* **2007**, 3, 1449–1455.
- (17) Israelachvili, J. . Intermolecular and Surface Forces, Second edition.; *Academic Press: London*, **1991**.
- (18) Lombardo, D.; Kiselev, M. A.; Magazù, S. and Calandra, P. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches. *Advances in Condensed Matter Physics* **2015**.
- (19) Tanford, C. Hydrophobic Free Energy, Micelle Formation and the Association of Proteins with Amphiphiles. *J. Mol. Biol* **1972**, 67, 59–74.
- (20) Marsh, D. Lateral pressure in membranes. Handbook of Lipid Bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* **1996**, 1286, 183–223.
- (21) Seddon, J. M. and Templer, R. H. Polymorphism of Lipid-Water Systems. Handbook of Biological Physics. *Elsevier Science B.V.* **1995**, 1, 97–160.

- (22) Simons, K. and Ikonen, E. Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature* **1997**, 387, 569–572.
- (23) Morigaki, K. and Tanimoto, Y. Evolution and development of model membranes for physicochemical and functional studies of the membrane lateral heterogeneity. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr* **2018**.
- (24) Deleu, M.; Crowet, J.; Nasir, M. N. and Lins, L. Complementary Biophysical Tools to Investigate Lipid Specificity in the Interaction between Bioactive Molecules and the Plasma Membrane: A Review *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr* **2014**, 1838 (12), 3171–3190.
- (25) Capuzzi, G.; Nostro, P. Lo; Kulkarni, K.; Fernandez, J. E. Mixtures of Stearoyl-6- O -Ascorbic Acid and  $\alpha$ -Tocopherol: A Monolayer Study at the Gas / Water Interface. *Langmuir* **1996**, 11 (11), 3957–3963.
- (26) Palma, S.; Manzo, R.; Lo, P. and Allemandi, D. Nanostructures from Alkyl Vitamin C Derivatives (ASC n): Properties and Potential Platform for Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 345, 26–34.
- (27) Mottola, M.; Vico, R. V.; Villanueva, M. E. and Fanani, M. L. Alkyl Esters of L-Ascorbic Acid: Stability, Surface Behaviour and Interaction with Phospholipid Monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, 457, 232–242.
- (28) Giudice, F.; Ambroggio, E.; Mottola, M. and Fanani, M. L. The Amphiphilic Alkyl Ester Derivatives of L-Ascorbic Acid Induce Reorganization of Phospholipid Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2016**, 1858 (9), 2132–2139.
- (29) Zulueta Díaz, Y. D. L. M.; Mottola, M.; Vico, R. V.; Wilke, N. and Fanani, M. L. The Rheological Properties of Lipid Monolayers Modulate the Incorporation of  $\alpha$ -Ascorbic Acid Alkyl Esters. *Langmuir* **2016**, 32 (2), 587–595.
- (30) Palma, S.; Manzo, R. H.; Allemandi, D. and Fratoni, L. and Lo Nostro, P. Coagels from Ascorbic Acid Derivatives. *Langmuir* **2002**, 18, 9219–9224.
- (31) Tártara, L. I.; Quinteros, D. A.; Saino, V.; Allemandi, D. A. and Palma, S. D. Improvement of Acetazolamide Ocular Permeation Using Ascorbyl Laurate Nanostructures as Drug Delivery System. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2012**, 28 (2), 102–109.
- (32) Sánchez Vallecillo, M. F.; Minguito De La Escalera, M. M.; Aguirre, M. V.; Ullio Gamboa, G. V.; Palma, S. D.; González-Cintado, L.; Chiodetti, A. L.; Soldano, G.; Morón, G.; Allemandi, D. A.; Pistoresi-Palencia, M. and Maletto B.A. A Liquid Crystal of Ascorbyl Palmitate, Used as Vaccine Platform, Provides Sustained Release of Antigen and Has Intrinsic pro-Inflammatory and Adjuvant Activities Which Are Dependent on MyD88 Adaptor Protein. *J. Control. Release* **2015**, 214, 12–22.
- (33) Naidu, K. A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition Journal* **2003**, 10, 1–10.
- (34) Pachioni, J. D. A.; Magalhães, J. G.; Juliane, E.; Lima, C.; Bueno, L. D. M.; Barbosa, J.; Malta de Sá, M. and Rangel-Yagui, C. Alkylphospholipids – A Promising Class of Chemotherapeutic Agents with a Broad Pharmacological Spectrum. *J Pharm Pharm Sci* **2013**, 16 (5), 742–759.
- (35) Sundar, S. and Chakravarty, J. Leishmaniasis: An Update of Current Pharmacotherapy. *Expert Opin. Pharmacother* **2013**, 1, 53–63.
- (36) Rakotomanga, M.; Blanc, S.; Gaudin, K.; Chaminade, P. and Loiseau, P. M. Miltefosine Affects Lipid Metabolism in Leishmania Donovanii Promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2007**, 51 (4), 1425–1430.
- (37) Carrasco, M. P.; Jiménez-López, J. M.; Segovia, J. L. and Marco, C. Hexadecylphosphocholine Interferes with the Intracellular Transport of Cholesterol in HepG2 Cells. *FEBS J.* **2008**, 275 (8), 1675–1686.
- (38) Jiménez-López, J. M.; Ríos-Marco, P.; Marco, C.; Segovia, J. L. and Carrasco, M. P. Alterations in

- the Homeostasis of Phospholipids and Cholesterol by Antitumor Alkylphospholipids. *Lipids Health Dis.* **2010**, 9, 1–10.
- (39) Ríos-Marco, P.; Marco, C.; Gálvez, X.; Jiménez-López, J. M. and Carrasco, M. P. Alkylphospholipids: An Update on Molecular Mechanisms and Clinical Relevance. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2017**, 1859 (9), 1657–1667.
- (40) Dorlo, T. P. C.; Balasegaram, M.; Beijnen, J. H. and Vries, P. J. De. Miltefosine: A Review of Its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* **2012**, 67, 2576–2597.
- (41) Auria, L. D.; Reiter, C.; Ward, E.; Moyano, A. L.; Marshall, M. S.; Nguyen, D.; Scesa, G.; Hauck, Z.; Breemen, R. Van; Givogri, M. I. and Bongarzone, E. R. Psychosine Enhances the Shedding of Membrane Microvesicles: Implications in Demyelination in Krabbe's Disease. *PLoS One* **2017**, 1–19.
- (42) Bongarzone ER, Escolar ML, Gray SJ, Kafri Tand Vite, S. M. Insights into the Pathogenesis and Treatment of Krabbe Disease. *Pediatr. Endocrinol Rev* **2016**, 1, 698–96.
- (43) Hawkins-salsbury, J. A.; Parameswar, A. R.; Jiang, X.; Schlesinger, P. H.; Bongarzone, E.; Ory, D. S.; Demchenko, A. V and Sands, M. S. Psychosine, the Cytotoxic Sphingolipid That Accumulates in Globoid Cell Leukodystrophy, Alters Membrane Architecture. *Journal of Lipid Research* **2013**, 54, 3303–3311.
- (44) Hannun, Y. A. and Bell, R. M. Functions of Sphingolipids and Sphingolipid Breakdown Products in Cellular Regulation. *Science* **1987**, 243, 500–507.
- (45) Orfi, L.; Larive, C. K. and Levine, S. M. Physicochemical Characterization of Psychosine by <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance and Electron Microscopy. *Lipids* **1997**, 32 (10), 1035–1036.
- (46) Fanani, M. L.; Hartel, S.; Maggio, B.; De Tullio, L.; Jara, J.; Olmos, F. and Oliveira, G. R. The Action of Sphingomyelinase in Lipid Monolayers as Revealed by Microscopic Image Analysis. *BBA - Biomembr.* **2010**, 1798 (7), 1309–1323.
- (47) Mottola, M.; Wilke, N.; Benedini, L.; Oliveira, G. R. and Fanani, L. M. Ascorbyl Palmitate Interaction with Phospholipid Monolayers: Electrostatic and Rheological Preponderancy *BBA - Biomembr.* **2013**, 1828, 2496–2505.
- (48) Maggio, B. B.; Cumar, F. A. and Caputto, R. Surface Behaviour of Gangliosides and Related Glycosphingolipids. *Biochem J* **1978**, 171, 559–565.
- (49) Oliveira, R. G.; Calderon, R. O. and Maggio, B. Surface Behavior of Myelin Monolayers. *BBA - Biomembr* **1998**, 1370, 127–137.
- (50) Morell, P. and Edin, P. Myelin. Second Edition, *Springer Science+Business Media.* **1984**
- (51) Gaines, G. Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces. *Interscience publishers.* **1966**
- (52) Fischer, T. H. M.; Dhar, P. and Heinig, P. The Viscous Drag of Spheres and Filaments Moving in Membranes or Monolayers. *J. Fluid Mech* **2006**, 558, 451–475.
- (53) Sickert, M.; Rondelez, F.; Stone, H. A.; Sickert, M.; Rondelez, F. and Stone, H. A. Single-Particle Brownian Dynamics for Characterizing the Rheology of Fluid Langmuir Monolayers. *A letters Journal Exploring the Frontiers of Physics* **2007**, 79, 66005–66011.
- (54) Wilke, N.; Mercado, F. V. and Maggio, B. Rheological Properties of a Two Phase Lipid Monolayer at the Air / Water Interface: Effect of the Composition of the Mixture. *Langmuir* **2010**, 113 (8), 11050–11059.
- (55) Wilke, N. and Maggio, B. The Influence of Domain Crowding on the Lateral Diffusion of Ceramide-Enriched Domains in a Sphingomyelin Monolayer. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 12844–12851.
- (56) Ortega, F.; Ritacco, H. and Rubio, R. G. Current Opinion in Colloid & Interface Science Interfacial Microrheology: Particle Tracking and Related Techniques. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2010**,

- 15 (4), 237–245.
- (57) C. Lheveder, J and Meunier, S. H. Brewster Angle Microscopy. *Review of scientific instruments* **1998**,69, 559–575.
- (58) Vollhardt, D. Current Opinion in Colloid & Interface Science Brewster Angle Microscopy : A Preferential Method for Mesoscopic Characterization of Monolayers at the Air / Water Interface. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2014**, 19 (3), 183–197.
- (59) Gaines, G. Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces. Chapter 2. *Interscience publishers.* **1966**
- (60) Lee, C.; Wang, Y.; Huang, L. and Lin, S. Atomic Force Microscopy : Determination of Unbinding Force , off Rate and Energy Barrier for Protein – Ligand Interaction. *Micron* **2007**, 38, 446–461.
- (61) Bining, G ; Quate, C.F and Gerber, C.F. Atomic Force Microscope Physical *Review Letters.* **1986**, 56 (9),930-934.
- (62) Basañez, G; Goñi, F.M and Alonso, A. Effect of single chain lipids on Phospholipase C-Promoted vesicles Fusion. A test for the stack hypothesis of membrane fusion. *Biochemistry.* **1998**,37,3901-3908.
- (63) Angelova, M. I. & Dimitrov, D. S. Liposome Electroformation; *Faraday Discuss. Chem. Soc* **1986**,81,303-312
- (64) Bellon, A.J; Pino M.J.; Wilke, N. Low-Cost Equipment for Electroformation of Giant Unilamellar Vesicles. *HardwareX* **2018**, e00037.
- (65) Zulueta, Y de las M, Caby, S; M.; Bongarzone, E; Fanani, M.L. Psychosine Remodels Model Lipid Membranes at Neutral PH. *BBA - Biomembr* **2018**, 1860, 2515–2526.
- (66) Foord, R., Jakeman, E., Oliver, C. J., Pike, E. R., Blagrove, R. J., Wood, E. and Peacocke, A. R. Determination of Diffusion Coefficients of Haemocyanin at Low Concentration by Intensity Fluctuation Spectroscopy of Scattered Laser Light. *Nature* **1970**, 227, 242–245.
- (67) Kaszuba Road, G.; Park, E. B. High-Concentration Zeta Potential Measurements Using Light-Scattering Techniques. *Phil. Trans. R. Soc* **2010**,368, 4439–4451.
- (68) Bhattacharjee, S. Review Article DLS and Zeta Potential – What They Are and What They Are Not ? *J. Control. Release* **2016**, 235, 337–351.
- (69) Carvalho, P; Felicio M.R; Santos N. C. and Domingues, M. M. Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. *Front Chem* **2018**, 6, 1–17.
- (70) Mcelhaney, R. N. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **1982**, 30, 229–259.
- (71) Beldarraín, A. I. Aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido al estudio de la estabilidad de las proteínas. *Elfos Scientiae* **2001**,18,10-16.
- (72) Ohline S. M ; Campbell M. L.; Turnbull M. T., and Kohler S. J. Differential Scanning Calorimetry of Bilayer Membrane Phase Transitions: A Biophysical Chemistry Experiment. *J. Chem Ed* **2000**, 78,391–395.
- (73) Demetzos, C. Differential Scanning Calorimetry ( DSC ): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability. *Journal of Liposome Research* **2008**, 18,159–173.
- (74) Bartlett, G. Calorimetric Assay Phosphorylated for Free Glyceric Acids. *J. Biol. Chem* **1958**,234,469-471.
- (75) Holmberg, K and Jonsson, B. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution, 2nd ed.; *John Wiley & Sons*, **2002**.
- (76) Rosen, M. J and Wiley & Sons. Surfactants and Interfacial Phenomena, 2nd ed, **1989**.
- (77) Loiseau, P. M. Hexadecylphosphocholine Interaction with Lipid Monolayers. *BBA - Biomembr* **2004**, 1661, 212–218.
- (78) Zulueta Díaz, Y. de las M. and Fanani, M. L. Crossregulation between the Insertion of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) into Lipid Membranes and Their Rheology and Lateral

- Structure. *BBA - Biomembr.* **2017**, 1859 (10), 1891–1899.
- (79) Wnętrzak, A.; Łątka, K. and Dynarowicz-Łątka, P. Interactions of Alkylphosphocholines with Model Membranes - The Langmuir Monolayer Study. *J. Membr. Biol.* **2013**, 246 (6), 453–466.
- (80) Berardi, M.; Paula, A.; Elisabete, M.; Zaniquelli, D.; Ulises, A and Siuiti, A. Biophysical Chemistry Miltefosine and BODIPY-Labeled Alkylphosphocholine with Leishmanicidal Activity: Aggregation Properties and Interaction with Model Membranes. *Biophys. Chem.* **2015**, 196, 92–99.
- (81) Dymond, M.; Attard, G.; Postle, A. D.; Interface, J. R. S.; Dymond, M.; Attard, G.; Postle, A. D. Testing the Hypothesis That Amphiphilic Antineoplastic Lipid Analogues Act through Reduction of Membrane Curvature Elastic Stress Testing the Hypothesis *J. R. Soc. Interface* **2008**, 5, 1371–1386.
- (82) Benedini, L.; Fanani, M. L.; Maggio, B.; Wilke, N.; Messina, P.; Palma, S. and Schulz, P. Surface Phase Behavior and Domain Topography of Ascorbyl Palmitate Monolayers. *Langmuir* **2011**, 27, 10914–10919.
- (83) Gómez-serranillos, I. R.; Miñones Jr; Dynarowicz-Łątka, P., Miñones, J. and Iribarnegaray, E. Study of the Isotherms of Miltefosine Monolayers Spread at the Air/Water Interface. *Langmuir* **2004**, 20, 928–933.
- (84) Fanani, M. L. and Maggio, B. Liquid - Liquid Domain Miscibility Driven by Composition and Domain Thickness Mismatch in Ternary Lipid Monolayers. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 41–49.
- (85) Almeida, R. F. M. De; Fedorov, A.; Prieto, M. Sphingomyelin / Phosphatidylcholine / Cholesterol Phase Diagram: Boundaries and Composition of Lipid Rafts. *Biophys. J.* **2003**, 85 (4), 2406–2416.
- (86) Brown, D. A. and; London, E. Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts Sphingolipid- and Membrane Rafts. *The journal of biological chemistry.* **2000**, 23, 11794–5215.
- (87) Joost C. M. H, Pomorski, T, Raggars, R.J., SPRONG, H, and Van Meer, G The Organizing Potential of Sphingolipids in Intracellular Membrane Transport. *Physiological Reviews* **2001**, 81 (4), 1690–1713
- (88) Skolová B, Janůšová B, Zbytovská J, Gooris G, Bouwstra J, Slepíčka P, Berka P, Roh J, Palát K, Hrabálek A and Vávrová K. Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir* **2013**, 29(50):15624–33.
- (89) Rosetti, C. M.; Maggio, B.; Oliveira, R. G. *Biochimica et Biophysica Acta* The Self-Organization of Lipids and Proteins of Myelin at the Membrane Interface. Molecular Factors Underlying the Microheterogeneity of Domain Segregation. *BBA - Biomembr.* **2008**, 1778, 1665–1675.
- (90) Smaby, J. M.; Momsen, M. M.; Brockman, H. L. and Brown, R. E. Phosphatidylcholine Acyl Unsaturation Modulates the Decrease in Interfacial Elasticity Induced by Cholesterol. *Biophysical Journal* **1997**, 73, 1492–1505.
- (91) Li, X.; Smaby, J. M.; Momsen, M. M.; Brockman, H. L. and Brown, R. E. Sphingomyelin Interfacial Behavior: The Impact of Changing Acyl Chain Composition. *Biophys. J.* **2000**, 78 (4), 1921–1931.
- (92) Davies J. T. *Interfacial phenomena.* 2nd ed. **1963**.
- (93) McConnell, H. M. and Radhakrishnan, A. Condensed Complexes of Cholesterol and Phospholipids. *BBA - Biomembr* **2003**, 1610, 159–173.
- (94) Mattjus, P. and Slotte, J. P. Does Cholesterol Discriminate between Sphingomyelin and Phosphatidylcholine in Mixed Monolayers Containing Both Phospholipids? *BBA - Biomembr* **1996**, 81, 69–80.
- (95) Joos, P. Cholesterol as liquifier in phospholipid membranes studied by surface viscosity measurements of mixed monolayers. *Chem. Phys. Lipids* **1970**, 4, 162–168.
- (96) Espinosa, G.; López-montero, I.; Monroy, F. and Langevin, D. Shear Rheology of Lipid

- Monolayers and Insights on Membrane Fluidity. *PNAS* **2011**,108,1-6.
- (97) McMullen, T. P. W.; Lewis, R. N. A. H. and Mcelhaney, R. N. Cholesterol - Phospholipid Interactions, the Liquid-Ordered Phase and Lipid Rafts in Model and Biological Membranes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **2004**, 8, 459-468.
- (98) Quinn, P. J. and Wolf, C. The Liquid-Ordered Phase in Membranes. *BBA - Biomembr.* **2009**, 1788 (1), 33-46.
- (99) Edidin, M. THE STATE OF LIPID RAFTS: From Model Membranes to Cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct* **2003**,32,257-283.
- (100) Mangiarotti, A., Galassi, V. V., Puentes, E. N., Oliveira, R. G., Del Pópolo, M. G. and Wilke, N. Hopanoids like Sterols Form Compact but Fluid Films. *Langmuir* **2019**, 35(30)9848-9857.
- (101) Busto, J.; Fanani, L.; Tullio, L. De; Sot, J., Maggio, B.; Goñi, F. and Alonso, A. Coexistence of Immiscible Mixtures of Palmitoylsphingomyelin and Palmitoylceramide in Monolayers and Bilayers. *Biophysical Journal* **2009**, 97,2717-2726.
- (102) Kubo, I.; Adachi, S.; Maeda, H. and Seki, A. Phosphatidylcholine Monolayers Observed with Brewster Angle Microscopy and  $\pi$ -A Isotherms. *Thin Solid Films* **2001**, 393,80-85.
- (103) Fanani, M. L. and Maggio, B. Phase State and Surface Topography of Palmitoyl-Ceramide Monolayers. *Chem. Phys. Lipids* **2010**, 163 (6), 594-600.
- (104) Grotenhuis, E.; Demel, R. A.; Ponec, M. and Boer, D. R. Phase Behavior of Stratum Corneum Lipids in Mixed Langmuir-Blodgett Monolayers. *Biophys. J.* **1996**, 71 (3), 1389-1399.
- (105) Eeman, M.; Francius, G.; Dufre, Y. F.; Nott, K.; Paquot, M. and Deleu, M. Effect of Cholesterol and Fatty Acids on the Molecular Interactions of Fengycin with Stratum Corneum Mimicking Lipid Monolayers. *Langmuir* **2009**,11, 3029-3039.
- (106) Mangiarotti, A. and Wilke, N. Energetics of the Phase Transition in Free- Standing versus Supported Lipid Membranes. *J Phys. Chem. B* **2015**.
- (107) Oliveira, R. G. and Maggio, B. Compositional Domain Immiscibility in Whole Myelin Monolayers at the Air- Water Interface and Langmuir- Blodgett films. *BBA - Biomembr* **2002**, 1561, 238-250.
- (108) Gzyl-malcher, B.; Handzlik, J. and Klekowska, E. Temperature Dependence of the Interaction of Prazosin with Lipid Langmuir Monolayers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2013**, 112, 171-176.
- (109) Fadel, O.; El, K. and Morandat, S. The Natural Antioxidant Rosmarinic Acid Spontaneously Penetrates Membranes to Inhibit Lipid Peroxidation in Situ. *BBA - Biomembr.* **2011**, 1808 (12), 2973-2980.
- (110) Maget-Dana, R. The Monolayer Technique: A Potent Tool for Studying the Interfacial Properties of Antimicrobial and Membrane-Lytic Peptides and Their Interactions with Lipid Membranes. *BBA - Biomembr* **1999**; 1462, 109-140.
- (111) Gómez-Serranillos, R.; Miñones, J.; Dynarowicz-Latka, J.; Miñones, J. and Iribarnegaray, E. Miltefosine - Cholesterol Interactions: A Monolayer Study. *Langmuir* **2004**,15, 928-933.
- (112) Miñones, J.; Gómez-serranillos, I. R.; Dynarowicz-Ł, P.; Miñones, T. The Influence of Subphase Temperature on Miltefosine - Cholesterol Mixed Monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, 301, 258-266.
- (113) Busto, J. V.; Canto-jañez, E.; Goñi, F. M.; Mollinedo, F. and Alonso, A. Combination of the Anti-Tumour Cell Ether Lipid Edelfosine with Sterols Abolishes Haemolytic Side Effects of the Drug. *J Chem Biol* **2008**,1, 89-94.
- (114) Marsh, D. Lateral Pressure in Membranes. *BBA - Biomembr* **1996**, 1286,183-223.
- (115) Castro, B. M.; Federov, A.; Delgado, J.; Acuña, A. U.; Mollinedo, F. and Prieto, M. Edelfosine and Miltefosine Effects on Lipid Raft Properties: Membrane Biophysics in Cell Death by Antitumor Lipids. *J Phys. Chem. B* **2013**,26,7929-7940.
- (116) Alonso, L.; Antônio, S.; Alessandra, C.; Berardi, M.; Alonso, A.; Siuiti, A. and Acu, A. U.

- Interaction of Miltefosine with Intercellular Membranes of Stratum Corneum and Biomimetic Lipid Vesicles. *Int J Pharm* **2012**, 434, 391–398.
- (117) Alvares, D. S.; Fanani, L. M.; Ruggiero, J. and Wilke, N. The Interfacial Properties of the Peptide Polybia-MP1 and Its Interaction with DPPC Are Modulated by Lateral Electrostatic Attractions. *BBA - Biomembr.* **2016**, 1858 (2), 393–402.
- (118) Weis, R.M and Mc Connell, M. Two-dimensional chiral crystals of phospholipid. *Nature Publishing Group*. **1984**, 310, 47-49.
- (119) Krüger P and Lösche M.. Molecular Chirality and Domain Shapes in Lipid Monolayers on Aqueous Surfaces. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* **2000**, 62 (5), 7031–7043.
- (120) Rosetti, C. M.; Mangiarotti, A and Wilke, N. Sizes of Lipid Domains : What Do We Know from Artificial Lipid Membranes ? What Are the Possible Shared Features with Membrane Rafts in Cells ? *BBA - Biomembr.* **2017**, 1859 (5), 789–802.
- (121) Blanchette, C. D.; Lin, W.; Orme, C. A.; Ratto, T. V and Longo, M. L. Domain Nucleation Rates and Interfacial Line Tensions in Supported Bilayers of Ternary Mixtures Containing Galactosylceramide. *Biophysical Journal* **2008**, 94, 2691–2697.
- (122) McConnell, H. M. Harmonic Shape Transitions in Lipid Monolayer Domains. *J. Phys.Chem* **1990**, 794, 4728–4731.
- (123) Palma, S. D.; Maletto, B.; Lo Nostro, P.; Manzo, R. H.; Pistoiresi-Palencia, M. C and Allemandi, D. A. Potential Use of Ascorbic Acid-Based Surfactants as Skin Penetration Enhancers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2006**, 32 (7), 821–827.
- (124) Saino, V.; Monti, D.; Burgalassi, S.; Tampucci, S.; Palma, S.; Allemandi, D and Chetoni, P. Optimization of Skin Permeation and Distribution of Ibuprofen by Using Nanostructures (Coagels) Based on Alkyl Vitamin C Derivatives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, 76 (3), 443–449.
- (125) Ochalek, M. Barrier Properties of Stratum Corneum Lipid Model Membranes Based on Ceramide [AP] and [EOS]. *tesis doctoral* **2012**.
- (126) Mao, G.; Vanwyck, D.; Xiao, X.; Correa, M. C. M.; Gunn, E.; Flach, C. R.; Mendelsohn, R. and Walters, R. M. Oleic Acid Disorders Stratum Corneum Lipids in Langmuir Monolayers. *Langmuir* **2013**, 29(15), 4857–4865.
- (127) Catherine, M.; Correa, M.; Mao, G.; Saad, P.; Flach, C. R.; Mendelsohn, R and Walters, R. M. Molecular Interactions of Plant Oil Components with Stratum Corneum Lipids Correlate with Clinical Measures of Skin Barrier Function. *Exp Dermatol* **2014**, 23(1) 39–44.
- (128) Schückler, F and Lee, G. The Influence of Azone on Monomolecular Corneum Lipids Films of Some Stratum. *International Journal of Pharmaceutics* **1991**, 70, 173–186.
- (129) Todosijević, M. N.; Brezesinski, G.; Savić, S.D and Neubert, R.H. Sucrose esters as biocompatible surfactants for penetration enhancement: An insight into the mechanism of penetration enhancement studied using stratum corneum model lipids and Langmuir monolayers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, 16, 928–987.
- (130) López-Castellano; Cortell-Ivars, C L; López-Carballo, M and Herráez-Domínguez. The Influence of Span® 20 on Stratum Corneum Lipids in Langmuir Monolayers : Comparison with Azone®. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, 203, 245–253.
- (131) Oliveira, J. S. L.; Lange, S.; Dobner, B. and Brezesinski, G. The effect of non-deuterated and deuterated isopropyl myristate on the thermodynamical and structural behavior of a 2D Stratum Corneum model with Ceramide [AP] *Chem. Phys. Lipids* **2017**, 16, 30170.
- (132) Garofalakis, G.; Murray, B. S and Sarney, D. B. Surface Activity and Critical Aggregation Concentration of Pure Sugar Esters with Different Sugar Headgroups. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, 398, 391–398.

- (133) Murakami, K.; Chan, S. Y.; Routtenberg, A. Protein Kinase C Activation. *The journal of biological chemistry* **1986**, 261 (33), 15424–15429.
- (134) Pedrera, L.; Fanani.M.L.; Ros. U.; Lanio, M. E.; Maggio, B.and Álvarez, C. Sticholysin I – Membrane Interaction : An Interplay between the Presence of Sphingomyelin and Membrane Fluidity. *BBA - Biomembr.* **2014**, 1838 (7), 1752–1759.
- (135) Maté, S. M.; Vázquez, R. F.; Herlax, V. S.; Daza, M. A.; Fanani, M. L.; Maggio, B.; Vela, M. E. and Bakás, L. S. Boundary Region between Coexisting Lipid Phases as Initial Binding Sites for Escherichia Coli Alpha-Hemolysin : A Real-Time Study. *BBA - Biomembr.* **2014**, 1838 (7), 1832–1841.
- (136) Oliveira, J. S. L.; Lange, S.; Dobner, B and Brezesinski, G. The Effect of Non-Deuterated and Deuterated Isopropyl Myristate on the Thermodynamical and Structural Behavior of a 2D Stratum Corneum Model with Ceramide [AP]. *Chem. Phys. Lipids* **2017**, 204, 1–9.
- (137) Todosijević, M. N.; Brezesinski, G.; Savić, S. D and Neubert, R. H. H. Sucrose Esters as Biocompatible Surfactants for Penetration Enhancement: An Insight into the Mechanism of Penetration Enhancement Studied Using Stratum Corneum Model Lipids and Langmuir Monolayers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, 99, 161–172.
- (138) López-Castellano, A.; Cortell-Ivars, C.; López-Carballo, G.; Herráez-Domínguez, M. The Influence of Span®20 on Stratum Corneum Lipids in Langmuir Monolayers: Comparison with Azone®. *Int. J. Pharm.* **2000**, 203 (1–2), 245–253.
- (139) Fanani, M. L and Wilke, N.Regulation of Phase Boundaries and Phase-Segregated Patterns in Model. *BBA - Biomembr.* **2018**.
- (140) Haque, T. and Talukder, M. U. Chemical Enhancer : A Simplistic Way to Modulate Barrier Function of the Stratum Corneum. *Adv Pharm Bull* **2018**, 8 (2), 169–179.
- (141) Dat, Q.; Björklund, S.; Engblom, J.; Topgaard, D and Sparr, E. Chemical Penetration Enhancers in Stratum Corneum – Relation between Molecular Effects and Barrier Function. *J. Control. Release* **2016**, 232, 175–187.
- (142) Naik, A.; Louk, A.; Pechtold, R. M.; Potts, R. O and Guy, R. H. Mechanism of Oleic Acid-Induced Skin Penetration Enhancement in Vivo in Humans. *Journal of Controlled Release* **1995**, 37, 299–306.
- (143) Bouwstra, J. A.; Honeywell-nguyen, P. L.; Gooris, G. S and Ponec.M.Structure of the Skin Barrier and Its Modulation by Vesicular Formulations. *Progress in Lipid Research* **2003**, 42,1-36.
- (144) Bouwstra J.A;Gooris.G.S;Dubbelaar F.E;Weerhein A.M and Ponec M. PH,ChoS, and Fatty Acids Affect the SC Lipid Organization.*The society for investigate dermatology* **1998**,3,69-74.
- (145) Sparr, E.; Eriksson, L.; Bouwstra, J. A and Ekelund, K. AFM Study of Lipid Monolayers : III . Phase Behavior of Ceramides , Cholesterol and Fatty Acids. *Langmuir* **2001**,6, 164–172.
- (146) Picas, L.; Rico, F and Scheuring, S. Direct Measurement of the Mechanical Properties of Lipid Phases in Supported Bilayers. *BPJ* **2012**, 102 (1), L01–L03.
- (147) Schneider, J.; Dufre, Y. F.; Barger, W. R and Lee, G. U. Atomic Force Microscope Image Contrast Mechanisms on Supported Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* **2000**, 7, 1107–1118.
- (148) Eeman, M.; Deleu, M.; Paquot, M.; Thonart, P and Dufre, Y. F. Nanoscale Properties of Mixed Fengycin / Ceramide Monolayers Explored Using Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **2005**,16, 2505–2511.
- (149) Schmid, F. Physical Mechanisms of Micro- and Nanodomain Formation in Multicomponent Lipid Membranes. *BBA - Biomembr.* **2016**.
- (150) Mcconnell, H. M. Structures and transitions in lipid monolayers at the air-water interface. *Annu. Rev. Phys. Chem* **1991**,42,171-195.
- (151) Härtel,S, Fanani.M.L, and Maggio.B. Shape Transitions and Lattice Structuring of Ceramide-Enriched Domains Generated by Sphingomyelinase in Lipid Monolayers. *Biophysical Journal*

- 2005, 88, 287-304.
- (152) Dupuy, F.; Fanani, M. L and Maggio, B. Ceramide N-Acyl Chain Length : A Determinant of Bidimensional Transitions , Condensed Domain Morphology , and Interfacial Thickness. *Langmuir* **2011**.
- (153) Ali, S.; Minchey, S.; Janoff, A and Mayhew, E. A Differential Scanning Calorimetry Study of Phosphocholines Mixed with Paclitaxel and Its Bromoacylated Taxanes. *Biophys. J.* **2000**, 78 (1), 246–256.
- (154) Carrer, D. C and Maggio, B. Phase Behavior and Molecular Interactions in Mixtures of Ceramide with Dipalmitoylphosphatidylcholine. *Journal of Lipid Research* **1999**, 40, 1978-1989.
- (155) Heimburg, T. Thermal Biophysics of Membranes; *GmbH & Co.KGaA* **2007**.
- (156) Pedersen, T. B.; Frokjaer, S.; Mouritsen, O. G and Jørgensen, K. A Calorimetric Study of Phosphocholine Membranes Mixed with Desmopressin and Its Diacylated Prodrug Derivative ( DPP ). *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, 233, 199–206.
- (157) Sanchez, S. A.; Bagatolli, L. A.; Gratton, E and Hazlett, T. L. A Two-Photon View of an Enzyme at Work : Crotalus Atrox Venom PLA 2 Interaction with Single-Lipid and Mixed-Lipid Giant Unilamellar Vesicles. *Biophysical Journal* **2002**, 82, 2232–2243.
- (158) Veatch, S. L.; Keller, S. L. Seeing Spots : Complex Phase Behavior in Simple Membranes. *BBA - Biomembr* **2005**, 1746, 172–185.
- (159) Alvares, D. S.; Ruggiero, J and Ambroggio, E. E. Phosphatidylserine Lipids and Membrane Order Precisely Regulate the Activity of Polybia-MP1 Peptide. *BBA - Biomembr.* **2017**, 1859 (6), 1067–1074.
- (160) Eisenberg, M.; Gresalfi, T.; Riccio, T and Mclaughlin, S. Adsorption of Monovalent Cations to Bilayer Membranes Containing Negative Phospholipidst. *American Chemical Society* **1979**, 1953, 5213–5223.
- (161) Makino, K.; Yamada, T.; Kimura, M.; Oka, T and Ohshima, H. Temperature- and Ionic Strength-Induced Conformational Changes in the Lipid Head Group Region of Liposomes as Suggested by Zeta Potential Data. *Biophysical Chemistry* **1991**, 41, 175–183.
- (162) Crommelin, A. Influence of Lipid Composition and Ionic Strength. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1984**, 73 (11), 1559-1583.
- (163) Chibowski, E and Szczes, A. Zeta Potential and Surface Charge of DPPC and DOPC Liposomes in the Presence of PLC Enzyme. *Adsorption* **2016**, 755–765.
- (164) Benedini, L.; Antollini, S.; Fanani, M. L.; Palma, S.; Messina, P and Schulz, P. Study of the Influence of Ascorbyl Palmitate and Amiodarone in the Stability of Unilamellar Liposomes. *Molecular Membrane Biology* **2014**, 7688, 1–10.
- (165) Yurlova, L.; Kahya, N.; Aggarwal, S.; Kaiser, H.; Chiantia, S.; Bakhti, M.; Pewzner-jung, Y.; Bendavid, O.; Futerman, A. H and Bru, B. Self-Segregation of Myelin Membrane Lipids in Model Membranes. *Biophysical Journal* **2011**, 101, 2713-2720.
- (166) Oliveira, R. G.; Schneck, E.; Funari, S. S.; Tanaka, M.; Maggio, B. Equivalent Aqueous Phase Modulation of Domain Segregation in Myelin Monolayers and Bilayer Vesicles. *Biophysj* **2010**, 99 (5), 1500–1509.
- (167) Contreras, F.; Sot, J.; Alonso, A and Goñi, F. M. Cholesterol Modulation of Sphingomyelinase Activity at Physiological Temperatures. *Chem Phys Lipids.* **2004**, 130, 127–134.
- (168) Tullio, L. De; Maggio, B and Fanani, M. L. Sphingomyelinase Acts by an Area-Activated Mechanism on the Liquid-Expanded Phase of Sphingomyelin Monolayers. *J Lipid Res* **2008**, 49, 2347-2355.
- (169) Ríos-Marco, P.; Jiménez-López, J. M.; Marco, C.; Segovia, J. L and Carrasco, M. P. Antitumoral Alkylphospholipids Induce Cholesterol Efflux from the Plasma Membrane in HepG2 Cells. *J.*

- Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, 336 (3), 866–873.
- (170) Marco, C.; Jiménez-López, J. M.; Ríos-Marco, P.; Segovia, J. L and Carrasco, M. P. Hexadecylphosphocholine Alters Nonvesicular Cholesterol Traffic from the Plasma Membrane to the Endoplasmic Reticulum and Inhibits the Synthesis of Sphingomyelin in HepG2 Cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, 41 (6), 1296–1303.
- (171) Goñi, F. M.; Montes, L.; Alonso, A. Phospholipases C and Sphingomyelinases : Lipids as Substrates and Modulators of Enzyme Activity. *Progress in Lipid Research* **2012**, 51, 238–266.
- (172) Fanani, L.; Oliveira, Æ. R. G.; Rosetti, Æ. C. M.; Wilke, N. Composition-Driven Surface Domain Structuring Mediated by Sphingolipids and Membrane-Active Proteins. *Cell Biochemistry and Biophysics* **2008**, 50 (2), 79–109.
- (173) Goñi, F.M. Lípidos que regulan su propio metabolismo y el ajeno. Sebbm Divulgación Acércate a Nuestros Científicos. **2012**.
- (174) Basáñez.G.A; Nieva.J.L, Goñi.F.M and Alonso.A. Origin of the Lag Period in the Phospholipase C Cleavage of Phospholipids in Membranes . Concomitant Vesicle Aggregation and Enzyme Activation. *Biochemistry* **1996**, 2960 (96), 15183–15187.
- (175) Berkovic, D.; Berkovic, K.; Binder, C.; Haase, D and Fleer, E. A. M. Hexadecylphosphocholine Does Not Influence Phospholipase D and Sphingomyelinase Activity in Human Leukemia Cells. *Journal of experimental and Therapeutics and oncology* **2002**, 2, 213–218.
- (176) Evans, E. A.; Parsegian, V. A. Energetics of membrane deformation and adhesion in cell and vesicle aggregation ". **1983**.
- (177) Rand, R. P and Parsegian, V. A. Hydration Forces between Phospholipid Bilayers. *BBA - Biomembr* **1989**, 988 (19159).
- (178) Med, D. T. J. E.; Helm, C. A.; Israelachvili, J. N and Mcguiggans, P. M. Role of Hydrophobic Forces in Bilayer Adhesion and Fusion ? *Biochemistry* **1992**, 1987, 1794–1805.
- (179) Nieva JL, Goñi, F.M and Alonso, A. Liposome Fusion Catalytically Induced by Phospholipase C. *Biochemistry* **1989**, 28, 7364–7367.
- (180) Goñi.F.M and Alonso A. Membrane Fusion Induced by Phospholipase C and Sphingomyelinases. *Biosci Rep* **2000**, 20 (6), 443–463.
- (181) Ruiz-Argüello M.B, Veiga M.P, Arrondo J.L, Goñi F.M and Alonso A. Sphingomyelinase Cleavage of Sphingomyelin in Pure and Mixed Lipid Membranes . Influence of the Physical State of the Sphingolipid. *Chem Phys Lipids* **2002**, 114, 11–20.
- (182) Holopainen, J. M.; Angelova, M. I and Kinnunen, P. K. J. Vectorial Budding of Vesicles by Asymmetrical Enzymatic Formation of Ceramide in Giant Liposomes. *Biophysical Journal* **2000**, 78, 830–838.
- (183) Blitterswijk, W. J. V. A. N.; Luit, A. H. V. A. N. D. E. R.; Veldman, R. J.; Verheij, M and Borst, J. Ceramide : Second Messenger or Modulator of Membrane Structure and Dynamics ? *Biochem. J.* **2003**, 211, 199–211.

***Trabajos publicados en revistas con referato internacional derivados de los resultados de esta Tesis.***

- 1) "The Rheological Properties of Lipid Monolayers Modulate the Incorporation of L-Ascorbic Acid Alkyl Esters". **Yenisleidy de las Mercedes Zulueta Díaz**, Milagro Mottola, Raquel V. Vico, Natalia Wilke and María Laura Fanani. *Langmuir*, (2015) 19; 32(2):587-95 29. DOI:10.1021/acs.langmuir.5b04175.
- 2) "Crossregulation between the insertion of Hexadecylphosphocholine (miltefosine) into lipid membranes and their rheology and lateral structure". **Yenisleidy de las Mercedes Zulueta Díaz** and María Laura Fanani. *Biochimica et Biophysica Acta* 1859 (2017) 1891-1899. DOI:10.1016/j.bbamem.2017.06.00.
- 3) "Psychosine remodels model lipid membranes at neutral pH". **Yenisleidy de las Mercedes Zulueta Díaz**, Sofia Caby, Ernesto R. Bongarzone and María Laura Fanani. *Biochimica et biophysica Acta* 1860 (2018) 2515-2526. DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.09.015.
- 4) "L-ascorbic acid alkyl ester action on stratum corneum model membranes: an insight into the mechanism for enhanced skin permeation". **Yenisleidy de las Mercedes Zulueta Díaz**, Karen Menghi, Maria L Guerrero, Natalia Nocelli and Maria Laura Fanani. (bajo revisión en la revista *Colloid and Surface B*).