



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

**INTERACCIÓN DE POLIARGININAS
CON MEMBRANAS LIPÍDICAS**

Tesis presentada para optar por el título de

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

por

Lic. Matías Alejandro Via

bajo la supervisión de

DR. MARIO DEL PÓPOLO Y DRA. NATALIA WILKE

ARGENTINA

2019



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



El presente trabajo de tesis se encuentra realizado bajo la modalidad de Doctorado Cooperativo entre la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad Nacional de Cuyo, bajo la dirección del Dr. Mario Del Pópolo, y el Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección de la Dra. Natalia Wilke. Cabe destacar también al Instituto de Histología y Embriología Dr. Mario Burgos, CCT-Mendoza, Argentina, como lugar de trabajo declarado ante CONICET, y donde trabajara el Co-Director de beca doctoral del tesista, Dr. Luis Mayorga.

La Comisión Evaluadora de Tesis se encuentra integrada por los investigadores:

- Dr. Guillermo Montich
- Dra. María Eugenia Olivera
- Dra. María Laura Pedano
- Dr. Marcelo Martí (evaluador externo)

Abril de 2019, Mendoza, Argentina

Agradecimientos

Índice de abreviaturas

- **AR** : Relación de aspecto
- **BAM** : Microscopía de ángulo de Brewster
- **C** : colapso
- **CF** : Campo de fuerza
- **CG** : grano grueso
- **COM** : Centro de masa
- **CPP** : Péptido de penetración celular
- **CPPap** : Péptido de penetración celular anfipático primario
- **CPPas** : Péptido de penetración celular anfipático secundario
- **CPPna** : Péptido de penetración celular no anfipático
- **CV** : Variable colectiva
- **DLS** : Dispersión dinámica de luz
- **DMPG**: Dimiristoil-fosfatidilglicerol
- **DOPC**: Dioleil-fosfatidilcolina
- **DOPG** : Dioleilfosfatidilglicerol
- **DPPC**: Dipalmitoil-fosfatidilcolina
- **FA** : fase acuosa
- **FO** : fase orgánica
- **G** : estado gaseoso
- **GAG** : glucosaminoglicanos

-
- **GUV** : vesícula unilamelar gigante
 - **LC** : líquido condensado
 - **LE** : líquido expandido
 - **LJ** : Lennard-Jones
 - **LS** : límite superior
 - **LUV** : vesícula unilamelar grande
 - **MA** : ácido mirístico
 - **MD** : Dinámica molecular
 - **ML** : Monocapa de Langmuir
 - **MLV** : vesícula multivesicular
 - **MMA** : área molecular promedio
 - **MTD** : Metadinámica
 - **OA** : ácido oleico
 - **PA** : ácido palmítico
 - **pArg** : Poliarginina
 - **PC** : fosfatidilcolina
 - **PE** : fosfatidiletanolamina
 - **PFTD** : ácido perfluorotetradecanoico
 - **PG** : fosfatidilglicerol
 - **pGly** : Poliglicina
 - **PI** : fosfatidilinositol
 - **POPG** : Palmitoil-oleil-fosfatidilcolina
 - **PS** : fosfatidilserina
 - **PW** : agua polarizable
 - **P95** : percentil 95
 - **S** : estado sólido
 - **SA** : ácido esteárico

- **SUV** : vesícula unilamelar chica
- **TAT** : Proteína transactivadora del virus de la inmunodeficiencia humana
- **US** : Umbrella Sampling

Índice general

Agradecimientos	II
1. Introducción	1
1.1. Breve historia de los Péptidos de Penetración Celular	2
1.2. Clasificación de los Péptidos de Penetración Celular	3
1.3. Poliargininas	4
1.4. Componentes de la membrana celular	8
1.5. Modelos de membrana lipídica	11
1.5.1. Monocapas de Langmuir	12
1.5.2. Bicapas lipídicas	14
1.6. Mecanismos generales de traslocación de las poliargininas	15
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo General	21

2.2. Objetivos Específicos	21
3. Metodología de trabajo	22
3.1. Especificación técnica sobre los reactivos utilizados en experimentos	23
3.1.1. Poliargininas	23
3.1.2. Fosfolípidos	23
3.1.3. Ácidos grasos	23
3.2. Técnicas en simulaciones computacionales	24
3.2.1. Fundamentos teóricos de Dinámica Molecular	24
3.2.2. Parámetros de las simulaciones de Dinámica Molecular	28
3.2.3. Cálculo de perfiles de energía libre	29
3.2.4. Configuración de los sistemas simulados	33
3.3. Técnicas de caracterización de monocapas de Langmuir	36
3.3.1. Medición de la presión superficial	36
3.3.2. Medición del potencial superficial, $\Delta\Phi$, de monocapas	38
3.3.3. Microscopía de ángulo de Brewster (BAM)	39
3.4. Técnicas experimentales usadas en el estudio de bicapas lipídicas	41
3.4.1. Vesículas unilamelares grandes (LUVs)	41
3.4.2. Vesículas unilamelares gigantes (GUVs)	44

4. Efecto del potencial transmembrana en la inserción de las poliargininas	48
4.1. Introducción	49
4.2. Simulaciones computacionales con potencial transmembrana: elección de la configuración del sistema	49
4.3. El potencial transmembrana promueve la inserción de las poliargininas en la bicapa	51
4.4. Correlación entre el potencial transmembrana y la posición del péptido	57
4.5. La anfipaticidad del péptido y el potencial superficial favorecen la incorporación de los CPPs en monocapas de Langmuir	60
4.6. Conclusiones parciales	63
5. Efecto del grupo carboxílico y del potencial superficial sobre la incorporación de KR₉C en monocapas de ácidos grasos	65
5.1. Introducción	66
5.2. Efecto del pH y del potencial superficial sobre la incorporación del péptido en monocapas de ácidos grasos	67
5.3. Importancia del grupo ácido carboxílico en la incorporación del péptido	73
5.4. El papel de las cadenas hidrofóbicas en la interacción del CPP con monocapas de ácidos grasos	77
5.5. Análisis de la inserción de R ₉ en bicapas con ácidos grasos mediante simulaciones de grano grueso	81
5.6. Conclusiones parciales	83

6. Efecto de la electrostática interfacial sobre el transporte de pArg y del complejo pArg-pGly a través de bicapas lipídicas	86
6.1. La densidad de carga aniónica de la bicapa favorece el transporte de R9 a través de bicapas lipídicas	87
6.2. El efecto CPP de R ₉ : ¿cuánto cuesta transportar una molécula hidrofílica a través de la membrana?	91
6.3. Influencia de la carga superficial aniónica de la bicapa sobre el transporte de R ₉ G ₉	95
6.4. Influencia del tamaño del cargo sobre el transporte mediado por R ₉	97
6.5. Conclusiones parciales	101
7. Efecto de las propiedades mecánicas de bicapas lipídicas sobre el proceso de adsorción/inserción de R₉	102
7.1. Adsorción de KR ₉ C sobre LUVs: análisis del potencial zeta, ζ	103
7.2. Interacción de KR ₉ C con monocapas lipídicas	106
7.3. Análisis morfológico de GUVs en presencia de KR ₉ C	109
7.4. Conclusiones parciales	113
8. Conclusiones Generales	114
9. Perspectivas a futuro	118
Referencias	123

Capítulo 1

Introducción

1.1. Breve historia de los Péptidos de Penetración Celular

La célula se encuentra delimitada por una bicapa de fosfolípidos, recubierta por proteoglicanos, denominada membrana plasmática. Debido a su compleja composición, esta membrana actúa como una barrera que modula la interacción entre el espacio intracelular y el medio que lo rodea, es decir, evita un ingreso inespecífico de moléculas pequeñas, material genético, proteínas u otras sustancias. Para lograr un intercambio eficaz de materia con el medio externo, la célula cuenta con canales iónicos y proteínas transportadoras para movilizar azúcares, aminoácidos o iones a través de la bicapa lipídica. Además, la célula realiza procesos de endocitosis y exocitosis para transportar material de mayor tamaño.¹

La característica anfipática de los fosfolípidos que componen la membrana plasmática restringe la difusión pasiva de moléculas hidrofílicas a través de ella. Sin embargo, la naturaleza ha desarrollado diversos mecanismos para que este tipo de moléculas puedan franquear esta barrera e ingresar al interior celular, como es el caso de las toxinas o las proteínas producidas por los virus. El estudio sistemático sobre la primera proteína capaz de atravesar directamente la membrana celular fue realizado independientemente por dos grupos de investigación en 1988.^{2,3} Una de las investigaciones fue llevada a cabo por Frankel y Pabo, los cuales identificaron que la proteína transactivadora (TAT, por sus siglas en inglés) del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) era rápidamente internalizado por las células HL3T1 desde el medio de cultivo. Simultáneamente, y de manera independiente, Green y Loewenstein demostraron que sólo la porción (37-57) del TAT (originalmente de 86 aminoácidos) era necesaria para lograr la absorción celular. Casi 15 años después de su descubrimiento, se identificó que incluso una porción más corta del TAT (49-57) lograba traslocar eficientemente.⁴ En cuanto a su mecanismo de internalización, se observó localización intracelular a una temperatura de 4°C,⁵ así como en presencia de inhibidores de la endocitosis,² lo que implicó la existencia de un proceso alternativo a este último.

A principio de la década de los '90, se reconoció una nueva secuencia peptídica con capacidad de atravesar membranas lipídicas. Este nuevo péptido fue denominado Penetratina y consta de una secuencia de 16 aminoácidos (RQIKIWFQNRRMKWKK), derivado de un homeodominio codificado por *Drosophila melanogaster*. De manera similar al TAT, se halló que la Penetratina también logra atravesar las membranas lipídicas sin utilizar maquinaria endocítica,

llegando incluso a alojarse en el núcleo celular.^{6,7}

Estos primeros péptidos -TAT y Penetratina- marcaron el inicio de todo un género particular de péptidos que guardan esta misma capacidad de franquear el núcleo hidrofóbico de las bicapas lipídicas sin generar una ruptura permanente, por lo que son denominados Péptidos de Penetración Celular, o CPPs por sus siglas en inglés. La característica principal de estos péptidos es que típicamente presentan una secuencia de entre 5 y 30 aminoácidos, de los cuales un alto porcentaje son catiónicos. Actualmente, la base de datos *CPPsite 2.0* registra alrededor de 1700 péptidos validados experimentalmente.⁸

1.2. Clasificación de los Péptidos de Penetración Celular

Existen diversos criterios propuestos para la clasificación de los CPPs, los cuales se basan en su origen, secuencia, función, o mecanismo de internalización. Sin embargo, actualmente no existe una taxonomía unificada al respecto, por lo que aquí se presentan dos de las más utilizadas: (a) en función de su origen; (b) en función de sus propiedades físicoquímicas.

La primera clasificación hace referencia a la procedencia del péptido, y define tres grupos distintos: (a) derivados de proteínas o péptidos, (b) sintéticos, y (c) quiméricos. En el primero de ellos se encuentran secuencias derivadas de proteínas o péptidos que ocurren naturalmente. Dentro de este primer grupo se pueden subclasificar los CPPs en función del tipo de proteína/péptido del cual derivan en: homeoproteínas (ej. Penetratina), proteínas de unión a ADN/ARN (ej. TAT), proteínas de unión a heparina (ej. familia de péptidos Vectocell), proteínas derivadas de péptido señal (como K-FGF) y proteínas virales (como Ribotoxin2).⁹

El segundo grupo representa a aquellos péptidos obtenidos químicamente cuya secuencia guarda semejanza con péptidos naturales. Un ejemplo típico es la familia de las poliargininas (pArg) que son análogos sintéticos del TAT.¹⁰ Por último, el grupo de los CPPs quiméricos hace referencia a los péptidos que resultan de la combinación de secuencias provenientes de proteínas naturales. Transportan es uno de los ejemplares quiméricos, el cual fue producido a partir del neuropéptido Galanina y de Mastoparan (proveniente del veneno de avispa).¹¹

La composición de la secuencia primaria le confiere al péptido propiedades físicoquímicas específicas, cruciales para controlar su interacción con las moléculas de la superficie celular y desencadenar una transferencia efectiva a través de la membrana. Se puede utilizar la similitud en estas propiedades para agrupar los CPPs según sean (a) anfipáticos primarios (CPPap), (b) anfipáticos secundarios (CPPas), o (c) no anfipáticos (CPPna).¹² Los CPPap son secuencias que usualmente contienen más de 20 aminoácidos y cuya estructura primaria se encuentra definida en dos bloques secuenciales: un extremo contiene los aminoácidos básicos y el resto presenta residuos hidrofóbicos. Péptidos como el TP10, Transportan y Pep-1 se clasifican dentro de este grupo. En el caso de los CPPas, la anfipaticidad deriva de la estructura secundaria adquirida al interactuar con la membrana lipídica. Por ejemplo, la Penetratina adopta una estructura al azar en solución, pero se transforma en hélice alfa o lámina beta en función de la relación péptido/lípido.⁷ Ambas transiciones de estructura le confieren al péptido mayor anfipaticidad, al permitir que los residuos hidrofóbicos establezcan una interacción más favorable con el interior hidrocarbonado de la membrana. Otro ejemplares de este grupo son pVEC,¹³ y M918.¹⁴ La tercera clase de CPPs son los no anfipáticos, que resultan ser de menor longitud que los péptidos de los otros dos grupos, y con alto contenido de arginina, tales como R₉ (RRRRRRRRR)¹⁵ y TAT(49-57) (RKKRRGRRR).⁴

En base a esta última clasificación se hipotetizan los diversos mecanismos de traslocación que pueden ser utilizados por un péptido. Así, por ejemplo, a medida que el CPP se hace menos anfipático y más catiónico e hidrofílico, la electrostática adquiere mayor relevancia en el proceso.

1.3. Poliargininas

A partir del descubrimiento del TAT, los investigadores intentaron entender y simplificar su estructura para optimizar sus propiedades de penetración celular. Así, se llegó a la conclusión de que uno de los principales factores detrás del proceso de traslocación era la arginina, que resulta ser uno de los aminoácidos más comunes dentro de la secuencia de los CPPs.⁸ Desde entonces, se han sintetizado varios oligómeros de arginina, cuya longitud de cadena van desde 6 a 15 residuos, siendo la nonaarginina (R₉) el largo óptimo en cuanto a la traslocación de membranas lipídicas.¹⁶ Una prueba contundente a favor de la acción de este aminoácido, fue el hecho de que un homopolímero policationico -la polilisina- con la misma carga neta, no

alcanzaba el rendimiento de internalización de la pArg.¹⁶⁻¹⁹ Esto indicó que existen otras propiedades en la estructura de la arginina que prevalecen por sobre la carga policitónica.

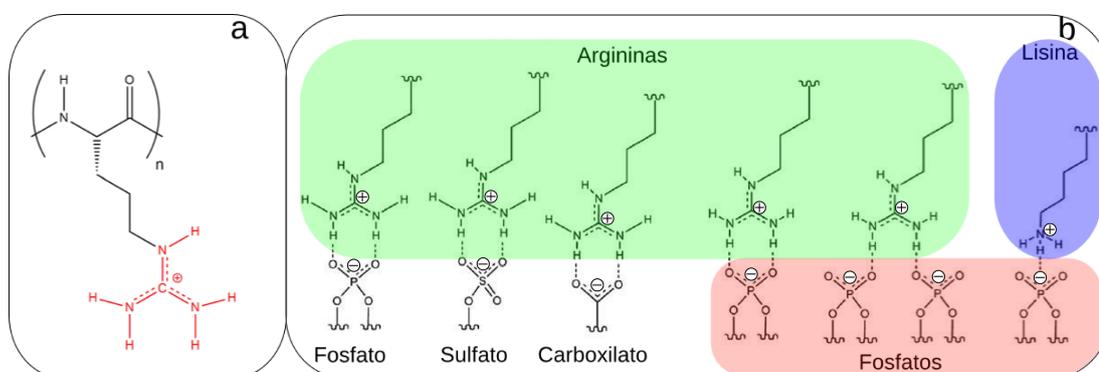


Figura 1.1 (a) Estructura química de una poliarginina: en rojo se muestra el grupo guanidinio presente en la cadena lateral. (b) En verde se resalta la interacción que se establece entre la cadena lateral de la pArg y distintos grupos aniónicos de los lípidos de membrana: fosfato, sulfato y carboxilato. A la derecha se puede observar que mientras la arginina (verde) puede establecer una interacción de puente de hidrógeno mono o bidentada con el grupo fosfato (rojo), la lisina sólo logra establecer una interacción monodentada con un grupo fosfato. De esta manera, la diferencia estructural en la cadena lateral de ambos residuos, es lo que diferencia el tipo de interacción que pueden establecer con los grupos polares de los lípidos de membrana. Adaptado de Refs.^{20,21}

Como se puede observar en la Figura 1.1.a, la estructura de la arginina contiene un grupo guanidinio (en color rojo) en el extremo de su cadena lateral. Este grupo posee dos funciones amino que, en conjunto, le dan el carácter básico a este aminoácido (pKa superior a 12), por lo que la cadena lateral de la arginina se encuentra protonada (catiónica) a pH fisiológico.²⁰⁻²² Esta característica resulta fundamental al momento de interactuar con las especies aniónicas presentes en los lípidos de membrana. En la Figura 1.1.b se muestra una representación esquemática de la interacción puente de hidrógeno que establece el guanidinio de la arginina con algunos grupos aniónicos, específicamente, fosfato, sulfato y carboxilato. En esta misma figura se ilustra una hipótesis sobre el comportamiento diferencial entre arginina y lisina frente a la traslocación: el guanidinio presente en la arginina establece un puente de hidrógeno bidentado con los grupos funcionales de la membrana, mientras que la lisina sólo presenta uno. Esto se traslada a diferentes efectos en la membrana, que serán discutidos en secciones posteriores.

Por último, se ha demostrado que el espaciamiento de las argininas en la secuencia primaria²³⁻²⁵ tiene ingerencia sobre la efectividad de traslocación de las pArg. Se ha encontrado que el triptófano es un buen espaciador, probablemente por la interacción favorable entre su grupo indol apolar y la sección hidrofóbica de la membrana.^{26,27} La síntesis de pArg cíclicas es otra alternativa para generar un espaciamiento efectivo de las especies cargadas.²³

En esta tesis se utilizaron dos Péptidos de Penetración Celular de la familia de las

Poliargininas. Específicamente, se utilizó una nona-arginina (KRRRRRRRRRC, o KR₉C) y una octa-arginina (KRRWRRWRRWRC, o KR₈W₃C), donde la primera resulta una molécula netamente hidrofílica mientras que la segunda exhibe cierto grado de hidrofobicidad. En la Figura 1.2 se muestran las estructuras químicas de cada una de estas pArg, donde en color verde se indica el grupo guanidinio de la arginina y en amarillo el grupo indol del triptófano.

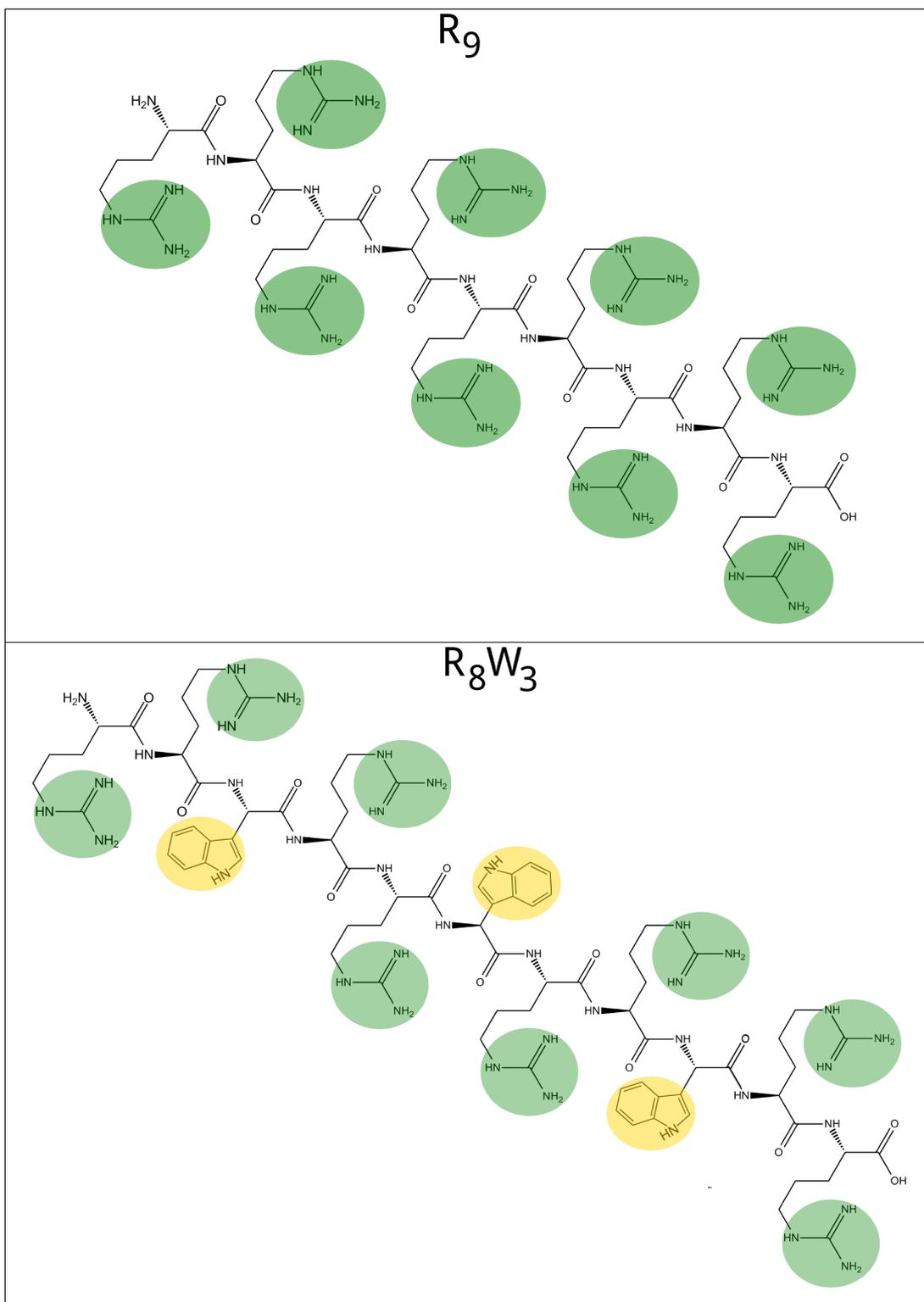


Figura 1.2 Estructura química de R₉ (arriba) y de R₈W₃ (abajo). En color verde se indica el grupo guanidinio en la cadena lateral de las argininas y en color amarillo se indica el grupo indol del triptófano.

1.4. Componentes de la membrana celular

Previamente a la descripción de los mecanismos de traslocación celular, resulta indispensable exponer algunos aspectos fundamentales sobre la primera barrera que encuentran los CPPs: la membrana celular. La composición de la membrana plasmática es mucho más compleja y dinámica que la de una bicapa lipídica pura, ya que contiene una amplia variedad de especies lipídicas distintas y más del 50% en peso de proteínas de membrana. La organización espacial de las membranas plasmáticas presenta tanto heterogeneidad lateral como distribución desigual entre las hemicapas interna y externa (asimetría lipídica).^{28,29} La diversidad de lípidos así como su distribución en cada membrana dentro de la célula se encuentra sumamente regulado. En células eucariotas, existen tres tipos principales de lípidos: glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides. Los primeros representan la mayoría entre los lípidos estructurales de membrana, destacándose la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), y fosfatidilinositol (PI). En la Figura 1.3 se presenta la estructura química general de un glicerofosfolípido, que consta de una molécula de glicerol esterificado con un ácido fosfórico en la posición 3 y con dos grupos acilo en posiciones 1 y 2 (en color verde). El grupo fosfato en posición 3, junto a cualquier otro grupo funcional que se encuentre enlazado al mismo, constituyen la cabeza o grupo polar del fosfolípido (representado en color rojo en la Figura 1.3). Su cola hidrocarbonada está compuesta por un diacilglicerol, que contiene ácidos grasos (acilos) saturados o cis-insaturados de longitud variable.

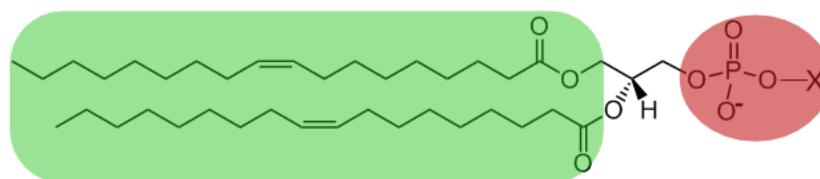


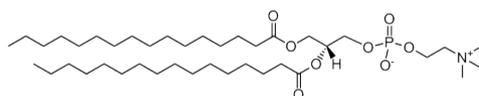
Figura 1.3 Estructura química general de un fosfolípido. En verde se señala la sección hidrofóbica y en rojo la cabeza polar. La letra X en la cabeza polar simboliza genéricamente a cualquiera de los grupos que se encuentran normalmente en los fosfolípidos, esto es, colina, etanolamina, glicerol, serina, entre otros.

La presencia del grupo polar y de los grupos acilo le dan al lípido su carácter anfipático, es decir, son simultáneamente hidrosolubles (sección hidrofílica) y liposolubles (sección hidrofóbica). Esta propiedad característica, junto con una geometría molecular determinada, permiten que un fosfolípido eventualmente se autoensamble formando bicapas, donde los grupos polares quedan dispuestos hacia el medio acuoso, mientras que las colas hidrocarbonadas conforman el núcleo hidrofóbico de la bicapa. Esta última resulta la principal barrera contra la difusión pasiva

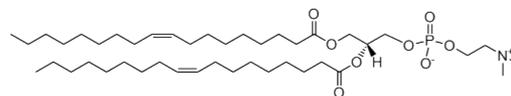
de moléculas y macromoléculas polares. En ese sentido, la permeabilidad de una molécula o de un cargo a través de la membrana depende de las propiedades intrínsecas de la membrana (esto es, composición, heterogeneidad y espesor), de la regulación celular activa de la membrana (interacción con el citoesqueleto y actividad de las proteínas de membrana), de las propiedades intrínsecas de la molécula (su carga, tamaño y estructura), y de los factores ambientales (tales como el pH y la temperatura).^{30,31}

En la Figura 1.4 se presentan las estructuras químicas de los cuatro fosfolípidos estudiados en esta tesis. La primera característica diferencial entre ellos está dada por su cabeza polar constituyente: las dos moléculas superiores son de la familia de las PCs (fosfatidilcolinas) y las dos inferiores son PGs (fosfatidilgliceroles). En segundo lugar, se pueden diferenciar por los grupos acilo que se presentan esterificados en posiciones 1 y 2. En efecto se puede apreciar que la DPPC es un lípido con sus dos grupos acilo totalmente saturados, mientras que la DOPC tiene ambos grupos con una insaturación entre los carbonos 9 y 10. De modo semejante, DMPG presenta dos grupos acilos totalmente saturados en cuanto que la DOPG contiene ambos grupos insaturados.

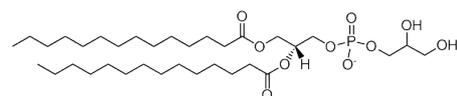
DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina)



DOPC (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfocolina)



DMPG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol)



DOPG (1,2-oleil-sn-glicero-3-fosfoglicerol)

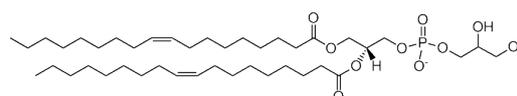


Figura 1.4 Estructura química de los fosfolípidos utilizados en esta tesis. Las dos moléculas superiores son zwitteriónicas (fosfatidilcolinas) mientras que las dos inferiores son aniónicas (fosfatidilgliceroles), en las condiciones de pH bajo las cuales se trabajó en esta tesis. Como se puede apreciar, la DPPC es un lípido con sus dos grupos acilo saturados, mientras que la DOPC tiene sus dos grupos insaturados. De modo semejante, DMPG presenta dos grupos acilos totalmente saturados y la DOPG ambos insaturados.

Al igual que los fosfolípidos, los ácidos grasos son moléculas anfipáticas, de manera tal que las moléculas de ácido carboxílico de cadena larga (más de 12 carbonos), pueden formar monocapas en la interfase agua/aire. En esta tesis se emplearon 5 ácidos grasos distintos: ácido mirístico (MA), ácido palmítico (PA), ácido perfluorotetradecanoico (PFTD), ácido oleico (OA) y ácido esteárico (SA). Las estructuras químicas de dichos ácidos grasos se presentan en la Figura 1.5. La primera distinción que se ha de realizar es entre ácidos grasos hidrogenados (MA,

PA, SA, OA) y el ácido graso perfluorado (PFTD). Esta diferencia se pone de relevancia al momento de dispersarlos en una interfase agua/aire, ya que los potenciales superficiales que presentan son opuestos: en los ácidos hidrogenados el potencial superficial resulta positivo (es decir, con el extremo positivo apuntando hacia el aire), mientras que el de PFTD es negativo y considerablemente mayor en valor absoluto.

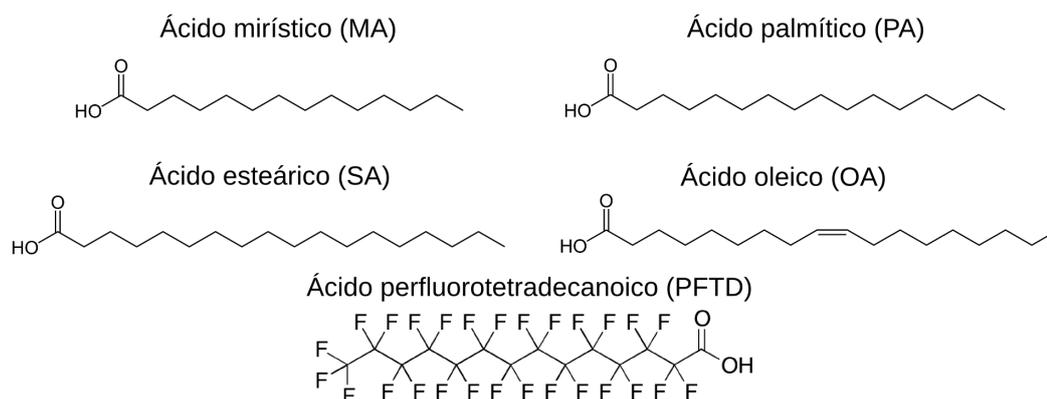


Figura 1.5 Estructura química de los 5 ácidos grasos estudiados en esta tesis. Dentro de los ácidos grasos hidrogenados, MA (14 carbonos), PA (16 carbonos) y SA (18 carbonos) son saturados, mientras que OA (18 carbonos) es insaturado. PFTD es un análogo del MA (14 carbonos), pero fluorado.

Naturalmente, las características fisicoquímicas de los componentes de la membrana modulan sus propiedades. Así, las colas insaturadas de un fosfolípido no se empaquetan estrechamente entre sí por lo que su presencia en la membrana le otorga mayor fluidez. Un efecto opuesto presenta el colesterol, que fortalece la interacción entre las cadenas hidrofóbicas y rellena los defectos de membrana, lo cual rigidiza y engrosa la membrana. Este último es el esteroide más abundante en la célula animal y representa el 40% de los lípidos de la membrana plasmática.²⁹ Por otro lado, las PCs son los fosfolípidos más abundantes, representando el 50% de los lípidos de membrana.²⁸ En cuanto a la cabeza polar, los fosfolípidos PC y PE son neutros (zwitteriónicos), mientras que PI y PS son aniónicos y abundan en la hemicapa interna de la membrana. En la Figura 1.6 se presenta un resumen de los efectos que los fosfolípidos producen sobre las propiedades mecánicas y eléctricas de la membrana.

Con respecto a la superficie celular, sobre la hemicapa plasmática externa se encuentra una gruesa y viscosa capa de proteoglicanos anclados a la membrana plasmática denominada glicocálix. Los glicosaminoglicanos (GAGs) son estructuras lineales aniónicas que conforman la porción glucídica de estos proteoglicanos. Entre los principales GAGs se encuentran la condroitina y el heparán sulfato.

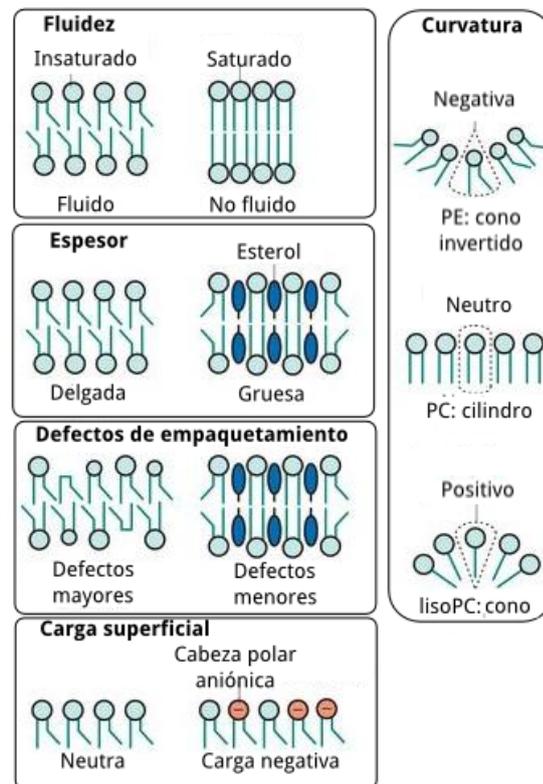


Figura 1.6 Efectos de los lípidos sobre las propiedades de membrana: fluidez, curvatura, carga superficial, empaquetamiento y espesor. A mayor grado de insaturación del grupo acilo, mayor fluidez de la membrana. Por el contrario, la presencia de esteroles aumenta la rigidez y el espesor de la membrana. Por otro lado, la densidad de carga superficial en la membrana se encuentra determinada en parte por los lípidos aniónicos que la componen. Imagen adaptada de Ref.²⁸

1.5. Modelos de membrana lipídica

La complejidad de la membrana plasmática en cuanto a composición y comportamiento, así como la dificultad en reproducir las condiciones ambientales nativas de la célula, hacen de esta última un sistema de estudio desafiante. Los investigadores reducen los grados de libertad del problema al recurrir a membranas artificiales cuyos componentes son acotados. Por consiguiente, se evalúan modelos más simples, a partir de los cuales se pueden extraer datos significativos y con mayor reproducibilidad.³² Los modelos de membrana pueden ser utilizados en múltiples casos tales como la evaluación de la estructura, función y comportamiento de proteínas y lípidos en la membrana, así como el estudio de la interacción de péptidos, drogas o nanopartículas con lípidos.³² Esta última aplicación de los modelos de membrana ha sido ampliamente explotada, como lo evidencian gran número de referencias bibliográficas.^{33–39}

Existen varios enfoques experimentales acorde a los cuestionamientos que se deseen responder, no obstante todos reproducen el ordenamiento lipídico de las membranas celulares

naturales. Así, los sistemas biomiméticos más utilizados son las monocapas lipídicas, las vesículas unilamelares y las bicapas soportadas. A continuación se introducen los dos primeros sistemas mencionados, con las principales características que los definen y sus aplicaciones en estudios biofísicos.

1.5.1. Monocapas de Langmuir

Una monocapa insoluble, o de Langmuir (ML), es una película de espesor molecular que, al dispersarse sobre una fase líquida (llamada subfase), permanece en la interfase líquido-gas aunque en un estado dinámico de intercambio con moléculas de la subfase. Sólo algunas sustancias tienen la capacidad de formar ML, entre las que comúnmente se encuentran los anfifilos. Estas moléculas tienen la particularidad de poseer una sección hidrofóbica y otra hidrofílica (anfipaticidad), y es el balance adecuado entre ellas lo que define si el anfifilo formará monocapas o no. Existen anfifilos naturales, tales como los ácidos grasos y los alcoholes de cadena larga que, como se expuso anteriormente, se componen de una sección hidrofóbica definida por la cadena hidrocarbonada, y de una sección hidrofílica dada por su cabeza o grupo polar, a saber, $-\text{COOH}$ o $-\text{OH}$, para ácidos grasos y alcoholes, respectivamente.⁴⁰

Las ML representan la mitad de una bicapa y usualmente se utilizan como un modelo para estudiar la adsorción e inserción de compuestos (por ejemplo, péptidos o drogas), o bien para evaluar las interacciones laterales lípido-lípido.⁴¹ Entre las principales bondades de este modelo se encuentra la capacidad de controlar la densidad lipídica en la interfase, es decir, el grado de compactación de los lípidos. Más aún, este modelo permite variar fácilmente los parámetros ambientales que intervienen en el proceso: desde el pH y la fuerza iónica de la subfase o su temperatura, hasta variaciones en la velocidad de compresión/descompresión de la ML. De esta manera, se puede explorar un mismo proceso (por ej. la inserción de una molécula) bajo gran cantidad de condiciones. Por último, las ML permiten un registro simultáneo de la presión y del potencial superficial de la monocapa, a la vez que se puede visualizar la interfase mediante técnicas como la microscopía de fluorescencia o de ángulo de Brewster (BAM, por sus siglas en inglés).

Típicamente se utiliza una balanza de Langmuir para obtener información sobre el

modelo de monocapa. Este equipo consta de un recipiente de material hidrofóbico (Teflon), que contendrá la subfase, y a los costados dos barreras hidrofóbicas con las cuales se realizan los procesos de compresión/expansión de la película lipídica. El principal indicador de las propiedades de la ML es el registro de la presión superficial en función del área molecular promedio (MMA, por siglas en inglés), a temperatura constante. Este registro se conoce como isoterma Π -A (presión superficial vs área molecular promedio) y en la Figura 1.7 se muestra un esquema que ilustra los diferentes estados de fase que puede sufrir la ML a medida que es comprimida: a valores elevados de MMA se encuentra en estado gaseoso (G), luego podría pasar sucesivamente de líquido expandido (LE), a líquido condensado (LC), posteriormente a estado sólido (S) y finalmente al colapso (C). Esta última condición representa la aparición de estructuras tridimensionales en la interfase, es decir que deja de ser una película monomolecular.

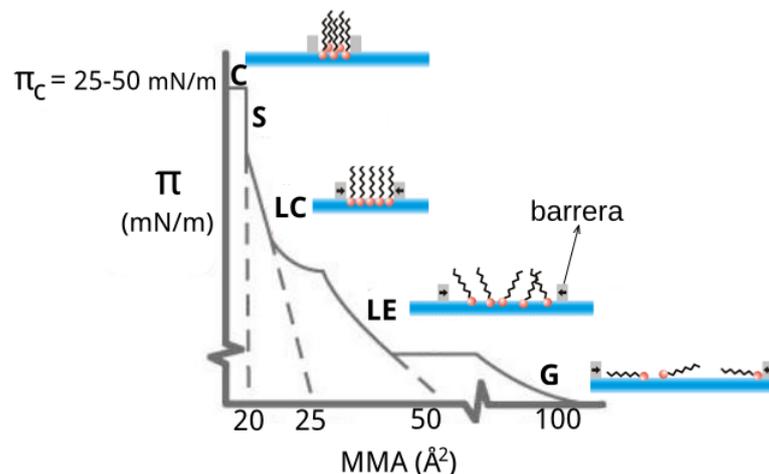


Figura 1.7 Isoterma Π -A (presión superficial vs área molecular promedio) donde se indican los posibles estados en una monocapa de Langmuir. Desde áreas moleculares mayores a menores se presentan los estados gaseoso (G), líquido expandido (LE), líquido condensado (LC) y sólido (S). La presión de colapso representa el fin de la estructura 2D de la monocapa. Imagen adaptada de Ref.⁴²

Para estudiar la inserción de moléculas en la estructura lipídica bidimensional se utiliza un enfoque distinto: se genera la monocapa a una presión superficial inicial y se toman registros de la variación de este parámetro luego de agregar en la subfase la molécula cuya inserción se quiere estudiar dejando el área fija. De esta manera, un aumento de Π se relaciona con la incorporación de la molécula (soluble en la subfase) en la ML.⁴³

1.5.2. Bicapas lipídicas

Las vesículas multilamelares (MLVs) son estructuras esféricas constituídas por más de una lamela o bicapa, generadas espontáneamente luego de aplicar agitación mecánica a un film de fosfolípidos previamente hidratados.⁴⁴ A partir de las MLVs, mediante diversos métodos tales como sonicación o extrusión, se obtienen las vesículas unilamelares que contienen una única bicapa que encierra un compartimento acuoso en su interior.⁴⁵ Las vesículas unilamelares se clasifican según su diámetro en: pequeñas (10-50 nm), grandes (100-500nm) o gigantes (1-100 μm), denominadas SUVs, LUVs y GUVs, respectivamente, por sus siglas en inglés. Cabe aclarar que sólo las SUVs y LUVs se logran obtener a partir de las MLVs. Estas vesículas son consideradas los modelos más simples de membrana cerrada.

El modelo de vesícula se selecciona en base al tipo de pregunta a responder: mientras que las vesículas más pequeñas (SUVs y LUVs) son utilizadas en evaluación de parámetros de población, las GUVs son usadas para realizar análisis individuales sobre cada vesícula. De esta forma los resultados obtenidos a partir de distintos modelos pueden complementarse entre sí.⁴⁶

Dado su tamaño, tanto las SUVs como las LUVs son estudiadas mediante métodos espectroscópicos. En este sentido, la principal diferencia entre ambos tipos de vesículas reside en el pequeño diámetro de las primeras, lo cual deriva en una eficiencia diferente para dispersar la luz.⁴⁷ Por otro lado, las GUVs son modelos ampliamente utilizados por la similitud de su tamaño al de la célula. Entre las principales aplicaciones de las GUVs se encuentra el estudio de la permeabilidad de membrana y el comportamiento de fases.⁴⁸ De igual manera, se han estudiado procesos de fusión de membrana, adhesión celular, tráfico de membrana y reconocimiento molecular.⁴⁹ El tamaño micrométrico de estas vesículas es su característica fundamental ya que permite la observación individual de las vesículas mediante microscopía de contraste de fases, de fluorescencia o confocal. Cabe destacar que en estos dos últimos casos se debe adicionar una molécula fluorescente a la mezcla de fosfolípidos, previamente a la síntesis de las GUVs, para poder visualizarlas.⁵⁰ Este modelo además permite estudiar las propiedades mecánicas de las membranas lipídicas, dado que estas vesículas pueden ser manipuladas (deformadas) mediante dispositivos tales como pinzas ópticas⁴⁹ o micropipetas.⁵¹ Asimismo, se pueden evaluar las deformaciones fuera del plano de la membrana e inferir parámetros mecánicos tales como el módulo de *bending*.⁵²

Las primeras síntesis de GUVs fueron realizadas mediante el método de *swelling*, que empieza por disolver los lípidos en un solvente orgánico, para luego dispersar un volumen de esta mezcla sobre un soporte (vidrio por ejemplo). El solvente orgánico se evapora y los lípidos luego son hidratados en medio acuoso a una temperatura tal que los lípidos se encuentren en fase fluida.^{53,54} Las principales desventajas de este método son la duración del proceso de síntesis, así como la limitación en la composición lipídica que forma GUVs por este método. Además, se producen GUVs de tamaños muy variados y con multilamelas. Estas dificultades fueron luego superadas mediante el método de electroformación que permitió la obtención rápida de GUVs. El método, inicialmente propuesto en 1986⁵⁵ y modificado en 1992⁵⁶, se basa en la aplicación de un campo eléctrico variable durante 1-3 hs para producir la hidratación de forma más rápida. Este protocolo ha sido modificado múltiples veces para extender la frontera respecto a las condiciones de síntesis.⁵⁷

1.6. Mecanismos generales de traslocación de las poliargininas

Los detalles moleculares sobre el pasaje de las pArg a través de las membranas lipídicas, así como la forma en que su internalización se ve afectada por ciertos parámetros tales como la composición de membrana, la carga superficial y la electrostática interfacial, son aún cuestión de debate. No obstante, en general, se proponen dos mecanismos mediante los cuales estos CPPs son incorporados en células vivas: (1) endocitosis, mecanismo activo que involucra una serie compleja de eventos bioquímicos; y (2) la difusión a través de la bicapa lipídica, proceso denominado permeación pasiva o traslocación directa.⁵⁸⁻⁶¹ Más aún, varios experimentos han demostrado que las pArg atraviesan membranas artificiales mediante un mecanismo cuya base molecular y costos energéticos merecen una inspección cuidadosa. Respecto al mecanismo de traslocación directa, se han propuesto varios modelos que podrían competir entre sí, entre los que se encuentran la traslocación adaptativa,⁶²⁻⁶⁴ la formación de micelas,⁶⁵ la formación de un poro toroidal hidrofílico, el modelo del barril, o bien el modelo de alfombra.^{7,66-70} En la Figura 1.8 se presenta un esquema de los posibles mecanismos de traslocación directa.

Dada la aplicación de las pArg como transportadores de drogas, resultó de suma relevancia el estudio de mecanismos de traslocación alternativos a la endocitosis, que no representarían un riesgo de degradación proteolítica. Incluso las pArg que son endocitados luego deben llevar

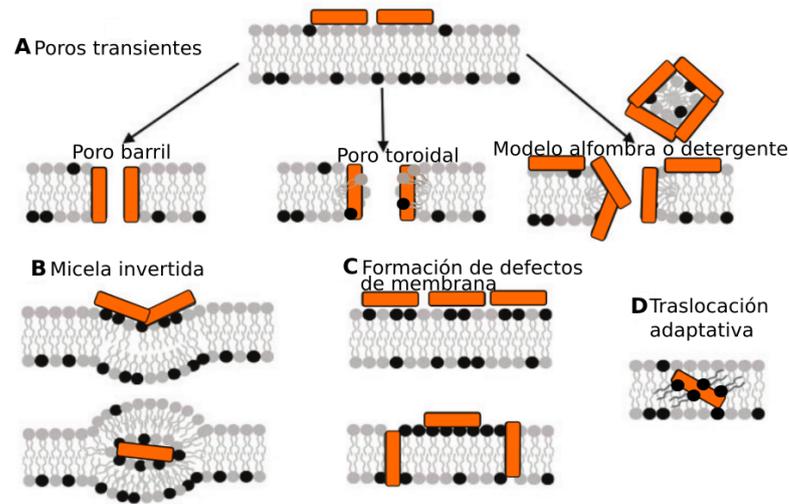


Figura 1.8 Modelos de traslocación directa de CPPs a través de membranas lipídicas. Los péptidos se representan en color naranja y los lípidos en gris (zwitteriónicos) y negro (aniónicos). A) Poros transientes: poro barril, poro toroidal y modelo de alfombra o detergente. En los dos primeros, el péptido se encuentra perpendicular a la membrana, y el poro se compone solamente de péptido (barril) o mezcla de péptido y lípido (toroidal). En el modelo de alfombra o detergente el péptido forma pequeñas vesículas, a la vez que tapiza la superficie del poro. B) Micela invertida: la asociación del péptido con la membrana promueve curvatura negativa que culmina con la formación de una micela invertida. C) Formación de defectos de membrana: los péptidos producen segregación de fases y traslocan a través de los defectos producidos en los bordes de dominio. D) Traslocación adaptativa: el péptido se asocia a cierto número de lípidos que enmascaran su carga catiónica y lo transportan a través de la membrana. Adaptado de Ref.⁶³.

a cabo una liberación endosomal, es decir, una traslocación de la membrana del endosoma, para evitar la degradación proteolítica en lisosomas. De aquí la importancia del estudio de la traslocación directa de las pArg, así como de los factores que la modulan.

En general, la traslocación directa puede ser conceptualmente dividida en tres etapas, cada una afectada por varios parámetros que atañen a la membrana: 1) difusión del péptido hacia la hemicapa externa de la membrana, seguido por su adsorción a la misma; 2) inserción y pasaje del péptido a través del núcleo hidrofóbico de la membrana; y 3) liberación del péptido en el interior celular tras desorberse de la hemicapa interna.⁷¹⁻⁷⁴ La adsorción/desorción se encuentran en gran medida regidas por las fuerzas electrostáticas entre las cargas catiónicas del CPP y los varios grupos funcionales aniónicos de la membrana (esto es, GAGs, sulfatos, fosfatos y carboxilatos),^{12,17,75-79} aunque las fuerzas de hidratación y otras interacciones específicas también afectan la fuerza de unión del péptido.

La segunda etapa del proceso de traslocación es la que conlleva mayor incertidumbre. Parece haber cierto consenso con respecto a que los CPP altamente cargados tienden a nuclear poros transmembrana cuya naturaleza estaría determinada, al menos en parte, por la secuencia

peptídica y la rigidez de la membrana.⁸⁰⁻⁸² Se han propuesto tres mecanismos que suponen la poración de membrana: (a) el modelo de alfombra, (b) el modelo de barril, y (c) el modelo de poro toroidal hidrofílico. En el primer caso, se propone que la membrana se desestabiliza tras haber alcanzado un umbral de CPP adsorbido sobre la misma. Es decir, la concentración superficial de péptido generaría una disrupción transiente de la membrana, guardando semejanza con el modo de acción de un detergente.^{65,83-85} Los modelos (b) y (c) guardan la semejanza de que los péptidos se insertan perpendicularmente a la membrana. Sin embargo en (b) los péptidos adoptan estructura hélice alfa al insertarse dentro del poro, y forman un anillo sobre la superficie del mismo. De esta forma, la cara hidrofóbica de la hélice interactúa directamente con las colas alifáticas de los lípidos, y la cara hidrofílica forma el interior del poro.^{65,83-85} En resumen, mientras que los mecanismos de alfombra, de micela invertida y de poro toroidal implican una reorganización significativa de los lípidos de membrana, el mecanismo de barril requiere una perturbación menor. Esto se relaciona directamente con el hecho de que en los tres primeros, los péptidos se unen a las cabezas polares y se mantienen en contacto durante todo el proceso de traslocación; en el modelo de barril, los péptidos interactúan directamente con las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos.

En una membrana lipídica, un poro hidrofílico es aquel en el cual las cabezas polares de los fosfolípidos tapizan la superficie del mismo, favoreciendo la presencia de especies hidrofílicas en su interior. Por el contrario, un poro hidrofóbico es aquel en el que las colas hidrofóbicas quedan expuestas a la luz del poro.⁸⁶ De esta manera, la nucleación de un poro toroidal transitorio e hidrofílico sugiere que el CPP inserto en el centro de la membrana se encuentra rodeado, y en contacto directo, con las cabezas polares de los fosfolípidos. Esto implica que los lípidos debieron rotar desde su posición de equilibrio sobre la superficie de la membrana hacia el centro de la misma.^{84,87} A medida que el poro se abre, los péptidos difunden hacia su interior desplazándose sobre la superficie de la membrana, asociados a algunos lípidos. En términos energéticos, esto implicaría que el costo de traer los aminoácidos cargados hacia el núcleo hidrofóbico de la membrana surge de la apertura del poro y es compensado, al menos en parte, por las interacciones favorables péptido-lípido.⁸⁶

El mecanismo de traslocación adaptativa de las pArg se basa en la capacidad que presenta el grupo guanidinio para establecer puentes de hidrógeno con los grupos aniónicos de los lípidos de membrana,⁶² en especial con los grupos carboxílicos de los ácidos grasos.⁶⁴

En el caso de este último grupo polar, un factor importante será la diferencia de pH entre el interior y el exterior celular. Se propone que el péptido formaría un complejo con los grupos carboxílicos ionizados (carboxilatos) que se encuentran expuestos hacia el medio extracelular. Este complejo resultaría neutro debido al apantallamiento de las cargas catiónicas de la pArg por parte de los carboxilatos aniónicos. Una vez formado el complejo pArg-ácidos grasos, y dada la mayor flexibilidad de éstos frente a los fosfolípidos, el complejo neutro es solubilizado en la membrana y transportado a través de ella. Habiendo alcanzado el medio intracelular, el pH más ácido produce la protonación de los carboxilatos, lo cual induce la liberación de la pArg en el citoplasma. De esta forma, el ácido graso protonado vuelve a la hemicapa externa y se completa el ciclo de traslocación de la pArg.⁶⁴

Este último mecanismo no excluye la participación de otros factores que podrían estar involucrados en el proceso de traslocación directa; esto es, el potencial transmembrana, la densidad de carga aniónica y las propiedades mecánicas de la membrana. Estos factores fácilmente podrían acoplarse al modelo para explicar la alta tasa de internalización de las pArg ya que, por ejemplo, se sabe que la aplicación de un potencial eléctrico externo disminuye la rigidez de la membrana,^{88,89} lo que facilitaría el movimiento *flip-flop* del complejo pArg-ácidos grasos. Además existen diversos estudios que demuestran que el potencial transmembrana favorece la internalización directa de las pArg, independientemente del modelo que se use para explicarlo.^{37,37,61,71,90,91} Asimismo, ha sido probado que la presencia de lípidos aniónicos también favorece la adsorción/inserción de las pArg;^{82,92} por lo cual se podría asociar esa densidad aniónica superficial a la presencia de ácidos grasos ionizados. Por último, este modelo sería compatible con el de formación de un poro hidrofílico. Específicamente, Herce *et. al* realizaron estudios computacionales del complejo pArg-ácidos grasos, encontrando que el sistema evolucionó espontáneamente hacia la nucleación de un poro hidrofílico en tres simulaciones independientes. Esto apoya el hecho de que la inserción de las pArg en bicapas lipídicas se produce mediante la formación de canales acuosos.^{80-82,93,94}

Con respecto a la tercera etapa, esto es, la liberación del CPP dentro de la célula (o la vesícula), su eficiencia estaría directamente determinada por la fuerza de unión del péptido a la hemicapa interna: mientras más fuerte sea la unión, más lento el proceso de desorción y mayor probabilidad de que el péptido sea devuelto al medio extracelular. Además, el pH podría ser otro parámetro relevante que afecta la internalización celular de los CPPs, como se comentó

anteriormente.

En base a la descripción general del mecanismo de internalización pasiva, e independientemente del modelo que se ajuste a dicha traslocación, esta tesis se enfocó en la evaluación y determinación de factores implicados en la incorporación de las pArg a las membranas lipídicas. Concretamente, se propuso realizar un abordaje experimental y computacional del efecto de las características fisicoquímicas de las pArg (hidrofilicidad) y de las membranas lipídicas (composición, carga superficial, rigidez) sobre el proceso de adsorción/inserción de las pArg. Asimismo se propuso estudiar el efecto del potencial transmembrana y superficial sobre dicho proceso. Finalmente, se abordó el problema del transporte de cargos hidrofílicos facilitado por las pArg a través de membranas lipídicas, es decir, el efecto CPP de las pArg.

Para el abordaje experimental se utilizaron diversos modelos de membrana lipídica, en particular, monocapas, LUVs y GUVs. Cada uno de estos modelos provee información específica que luego podría complementarse con la obtenida de los otros modelos, según las condiciones en las que el experimento fue realizado. Así, las condiciones controladas de densidad lipídica en el modelo de monocapa permiten una cuantificación adecuada de la afinidad de las pArg por los lípidos (curvas de penetración/incorporación). Las respuestas obtenidas en este modelo a una presión superficial de ~ 30 mN/m, encuentran una correlación con el modelo de bicapa (vesículas), ya que representa condiciones de densidad lipídica comparables a las de bicapa. Sin embargo, en esta tesis, los resultados obtenidos mediante cada modelo de membrana fueron interpretados independientemente, salvo una comparación explícita como la presentada en el Capítulo 7.

Por otro lado, las simulaciones computacionales fueron realizadas para calcular los perfiles de energía libre para el proceso de inserción de las pArg en bicapas lipídicas. Se analizaron situaciones donde la bicapa lipídica presentó diversas condiciones de carga superficial y composición, así como también se estudió el efecto de un potencial electrostático aplicado a través de la membrana sobre el proceso de adsorción/inserción de las pArg.

Capítulo 2

Objetivos

2.1. Objetivo General

Estudiar los factores que modulan el proceso de traslocación directa de poliargininas a través de membranas lipídicas, combinando simulaciones computacionales y experimentos.

2.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar la influencia del potencial transmembrana sobre el costo energético de inserción ($\Delta G_{\text{inserción}}$) de dos pArg (R_9 y R_8W_3) en una bicapa lipídica (DOPC).
- Evaluar cómo contribuye la anfipaticidad de las pArg a la energía libre de inserción en membranas lipídicas.
- Investigar la acción de los ácidos grasos como potenciales catalizadores del proceso de traslocación de R_9 . Evaluar la influencia del grupo carboxílico y el largo y grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada, sobre la incorporación de R_9 en monocapas y bicapas lipídicas, utilizadas como membranas modelo.
- Determinar el efecto de la carga superficial σ^- de la bicapa en la incorporación de R_9 y de R_9 con un cargo hidrofílico (poliglicina) a la misma. Específicamente, cuantificar la variación del costo energético de adsorción/inserción de R_9 y R_9G_9 (RRRRRRRRRRGGGGGGGGG) en bicapas mixtas de DOPC-DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol, respectivamente), con concentraciones variables de fosfatidilglicerol (PG).
- Estudiar el efecto CPP de R_9 sobre un cargo hidrofílico (poliglicinas). Evaluar el efecto del tamaño del cargo (G_9 y G_{31}) sobre la energía necesaria para insertar la pArg con su cargo en la membrana.
- Analizar el efecto de las propiedades mecánicas de bicapas parcialmente cargadas sobre el proceso de adsorción/inserción de R_9 .

Capítulo 3

Metodología de trabajo

3.1. Especificación técnica sobre los reactivos utilizados en experimentos

3.1.1. Poliargininas

Para estudiar experimentalmente la interacción de KR₉C y KR₈W₃C con membranas lipídicas, se prepararon soluciones acuosas concentradas de cada péptido en NaCl 150 mM. Las mismas fueron alicuotadas y conservadas en un freezer a -20 ° C hasta su uso. Ambos péptidos fueron comprados en Innovagen (Suecia), con una pureza de 95 %.

3.1.2. Fosfolípidos

Los fosfolípidos utilizados fueron comprados en Avanti Polar Lipids, Inc (Alabama, USA), y preparados en solución cloroformo/metanol 2:1 (Merck, Bruker). Esta mezcla de solventes orgánicos permitió solubilizar estas moléculas anfífilas, a la vez que por su alta volatilidad, evitan alteraciones indeseadas en técnicas sensibles tales como las practicadas en monocapas. Respecto a las mezclas de lípidos utilizadas para producir las vesículas, en todos los casos fueron obtenidas a partir de la solución madre de cada lípido constituyente.

3.1.3. Ácidos grasos

En esta tesis se emplearon 5 ácidos grasos distintos, todos comprados en Sigma (USA): ácido mirístico (MA), ácido palmítico (PA), ácido perfluorotetradecanoico (PFTD), ácido oleico (OA) y ácido esteárico (SA). Las soluciones de ácidos grasos también fueron preparadas con una mezcla de cloroformo/metanol 2:1 y se almacenaron en tubos de vidrio cónicos, en un freezer a -20 ° C.

3.2. Técnicas en simulaciones computacionales

3.2.1. Fundamentos teóricos de Dinámica Molecular

Las simulaciones de Dinámica Molecular (MD, por sus siglas en inglés) son una herramienta computacional que permite predecir estadísticamente cómo es el comportamiento promedio de un sistema, dadas ciertas condiciones iniciales.⁹⁵ Son concebidas como experimentos computacionales dado que actúan como un nexo entre la escala microscópica espacio-temporal y el mundo macroscópico del laboratorio. Es decir, permiten comprender las propiedades de un conjunto de moléculas en términos de su estructura y las interacciones microscópicas entre ellas, a la vez que se logran predecir ciertas propiedades macroscópicas del sistema. Cabe destacar que la exactitud de dichas predicciones dependerá en gran medida de la disponibilidad de recursos computacionales, ya que tanto el tamaño del sistema como su nivel de detalle, correlacionan positivamente con el costo computacional.

Esta técnica de simulación se basa en la mecánica newtoniana clásica para obtener la trayectoria de un sistema de partículas, esto es, la evolución temporal de las posiciones, velocidades y orientaciones de las moléculas. Para ello se deben resolver numéricamente las siguientes ecuaciones de movimiento:^{96,97}

$$m_i \ddot{r}_i = f_i \quad f_i = -\frac{\partial}{\partial r_i} \mathcal{E} \quad (3.1)$$

donde m_i es la masa de la partícula, r_i es la posición de la partícula, f_i es la fuerza que actúa sobre la partícula y \mathcal{E} es la energía potencial de la partícula. En primer lugar se debe definir un campo de fuerzas, es decir, una función de energía potencial a partir de la cual se podrán calcular las fuerzas f_i que actúan sobre los distintos átomos. Dicha función de energía potencial se describe como $\mathcal{E}(r^N)$, donde $r^N = (r_1, r_2, \dots, r_N)$ representa el conjunto completo de $3N$ coordenadas atómicas. En general, se puede expresar como la suma de dos términos: las energías enlazantes y no enlazantes (Ecuación 3.2). El primero de estos términos incluye las interacciones intramoleculares, es decir, lo referido a los enlaces covalentes (distancias y ángulos interatómicos); mientras que el segundo de ellos incluye las interacciones intermoleculares: electrostáticas (o Coulómbicas), y de atracción-repulsión (o de Lennard-Jones).

$$\mathcal{E}_{total} = \underbrace{\mathcal{E}_{enlace} + \mathcal{E}_{ángulo} + \mathcal{E}_{torsional}}_{\text{energía enlazante}} + \underbrace{\mathcal{E}_{LJ} + \mathcal{E}_{Coul}}_{\text{energía no enlazante}} \quad (3.2)$$

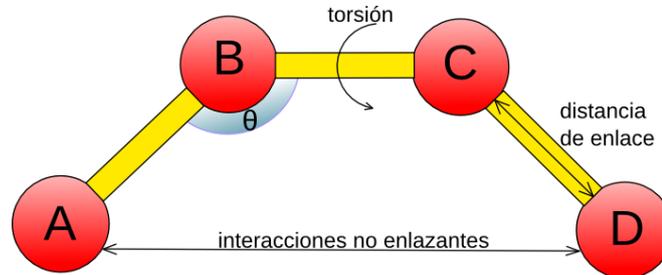


Figura 3.1 Esquema de las energías enlazantes (enlaces covalentes, distancias y ángulos) y no enlazantes (interacciones electrostáticas y de atracción-repulsión).

En cuanto a las energías enlazantes, tanto la energía de enlace (*bonding stretching*), como la energía angular (*angle bending*) se definen en función de un potencial armónico ya que ambas magnitudes constantemente oscilan alrededor de una posición de equilibrio (ecuación 3.3).

$$\mathcal{E}_{enlace} = \frac{K_r}{2}(r - r_{eq})^2 \quad \mathcal{E}_{ángulo} = \frac{K_\theta}{2}(\theta - \theta_{eq})^2 \quad (3.3)$$

La energía torsional se define respecto a los diedros, es decir, al ángulo que forman dos planos entre sí. En la Figura 3.1 sería el ángulo formado por el plano que contiene al enlace A-B y el que contiene al enlace C-D, si se produjera la rotación respecto al enlace B-C. Este término se describe como una expansión de cosenos adecuada (serie de Fourier).

Respecto a la energía no enlazante, se define un potencial coulombico para las especies cargadas (Ecuación 3.4) y otro de Lennard-Jones para las interacciones de Van der Waals (Ecuación 3.5), acorde a las siguientes expresiones:

$$\mathcal{E}_{Coul}(r_{ij}) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (3.4)$$

donde q_i y q_j son las cargas parciales de los átomos i y j , ϵ_0 es la constante dieléctrica del medio

y r_{ij} es la distancia interatómica.⁹⁸

$$\mathcal{E}_{LJ}(r_{ij}) = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (3.5)$$

donde r_{ij} es la distancia interatómica, ε_{ij} es la profundidad del pozo de potencial de mínima energía y σ_{ij} es la distancia interatómica a energía cero.⁹⁸ Cada par de átomos tiene un valor unívoco de σ y ε .

Campo de fuerza de grano grueso Martini

Para definir las f_i que actúan sobre las distintas partículas del sistema se empleó el campo de fuerza (CF) de Martini. Éste es un modelo de grano grueso (CG, por sus siglas en inglés) ampliamente utilizado en simulaciones MD de sistemas biomoleculares.⁹⁹ El hecho de ser un modelo CG implica una reducción en los grados de libertad del sistema: se representan 4 partículas en 1, a la cual se le asignan parámetros que aproximen su comportamiento a los datos obtenidos experimentalmente.¹⁰⁰ Respecto a esto último, Martini fue parametrizado en función de los coeficientes de partición entre una fase orgánica (FO) y una fase acuosa (FA), es decir, se trata de reproducir las energías libres de partición ($\Delta G_{FO/FA}$) entre fases apolares y polares de un gran número de componentes químicos.

$$\Delta G_{FO/FA} = kT \ln \left(\frac{\rho_{FO}}{\rho_{FA}} \right) \quad (3.6)$$

donde ρ representa la densidad de equilibrio de las partículas CG en cada fase. Procesos como el autoensamblaje lipídico, la interacción péptido-membrana o proteína-proteína dependen fundamentalmente del grado de partición de los constituyentes entre un ambiente polar y uno no polar.

Este CF tiene aplicación directa en estudios biofísicos en los que es relevante el tamaño del sistema, o bien, cuando el objetivo es analizar la evolución del sistema en un período de tiempo prolongado. En este sentido, la reducción de grados de libertad asociada a la transformación de cuatro átomos en una partícula de grano grueso, posiciona a este modelo como una

alternativa a los modelos atómicos, en términos de costo computacional. Actualmente, el CF de Martini proporciona parámetros para una variedad de biomoléculas, que incluyen diferentes lípidos,¹⁰¹ proteínas,^{102,103} azúcares,¹⁰⁴ glicolípidos,^{105,106} y ADN,¹⁰⁷ entre otros.

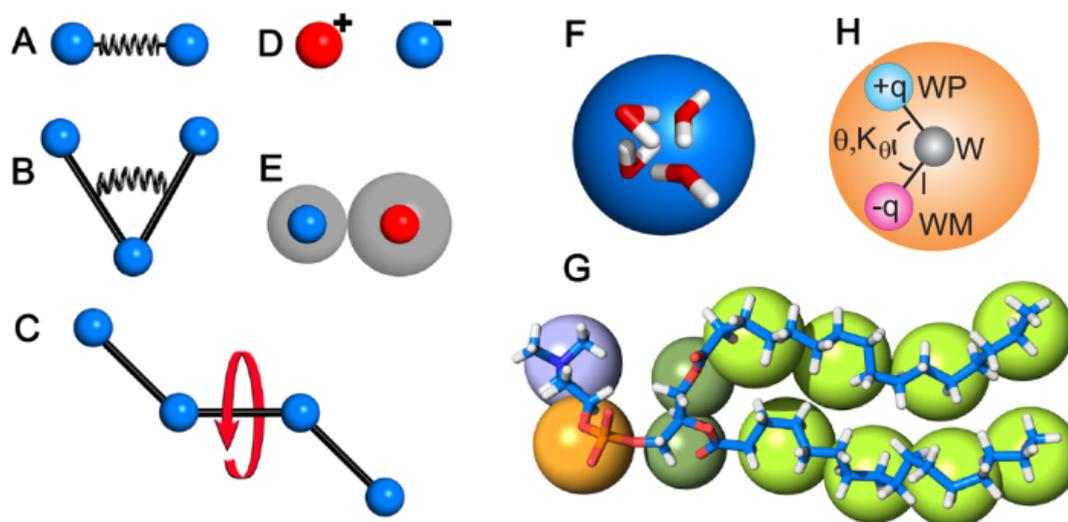


Figura 3.2 Un campo de fuerza consiste en la contribución de potenciales por parte de (A) enlaces covalentes (descritos por un potencial armónico), (B) contribuciones angulares (potencial armónico), (C) potencial diedro (función coseno), (D) contribuciones electrostáticas (Ley de Coulomb) y (E) fuerzas de van der Waals (potencial 6–12 de Lennard-Jones). El mapeo de 4:1 utilizado en el CF de Martini se muestra para (F) el conjunto de 4 moléculas de agua y (G) un lípido de DPPC. En (H) se muestra el modelo de agua polarizable de Martini: una partícula central W y dos partículas con carga opuesta (WP y WM) que rotan alrededor de W; cada partícula posee una masa de 24 uma. Imagen adaptada de Refs.^{108,109}

Además de la reducción en grados de libertad, la otra característica fundamental en un modelo CG es el conjunto de potenciales que describen la interacción entre las partículas. Como se aprecia en la Figura 3.2, este modelo también se encuentra configurado en función de energías enlazantes y no enlazantes: por un lado, se definen potenciales armónicos para fijar la distancia de enlace (A) y el ángulo (B) entre partículas, y un potencial diedro (C) para la torsión; por otro lado, también se define un potencial coulombico para las contribuciones electrostáticas (D) y un potencial de Lennard-Jones para las fuerzas de Van der Waals (E).¹⁰⁰ Las interacciones enlazantes de Martini poseen una base empírica pero aún así han sido ajustadas mediante modelos atómicos. Es decir, tanto las longitudes y ángulos de enlace, como la libertad torsional del modelo CG, han sido comparados con los parámetros obtenidos por simulaciones atómicas y se ha realizado un ajuste para obtener un valor general razonable. No obstante, las interacciones no enlazantes en este modelo son genéricas y netamente parametrizadas acorde a datos experimentales. En la Figura 3.2(G) se puede observar el mapeo entre los átomos del

fosfolípido DPPC y las partículas CG. Básicamente, el modelo considera cuatro tipos principales de interacciones: polar (P), no polar (N), apolar (C) y cargado (Q), clasificados acorde a su polaridad creciente desde 1 a 5, o de acuerdo a su capacidad de formar puente de hidrógeno ($d =$ donante, $a =$ aceptor, $da =$ ambos, $0 =$ ninguno).¹⁰⁰

En cuanto al solvente, el modelo estándar de agua de Martini sufrió modificaciones en 2010 en pos de simular con mayor fidelidad la interacción del agua con las partículas cargadas. Este nuevo modelo de agua polarizable (PW, por sus siglas en inglés) puso en consideración la polarizabilidad orientacional del agua. La parametrización se materializó a través del uso de 3 esferas: una central neutra (W) a la cual están ancladas partículas WM (con carga negativa, q^-) y WP (con carga positiva, q^+). En conjunto, estas 3 partículas representan 4 moléculas de agua ($24 \text{ uma/esfera} = 72 \text{ u.m.a.}$).¹⁰⁹ Cabe destacar que la densidad del agua *bulk* y el coeficiente de partición FO/FA reprodujeron un nivel de precisión similar al obtenido en el CF estándar de Martini. La principal ventaja de Martini PW estriba en la reproducibilidad de procesos dominados por la electrostática, tales como la electroporación de membranas,^{109,110} o la asociación proteína-proteína para moléculas cargadas.¹¹¹ Por el contrario, la desventaja respecto al modelo estándar es un mayor costo en eficiencia computacional.¹⁰⁹

3.2.2. Parámetros de las simulaciones de Dinámica Molecular

El código de libre distribución GROMACS (GRONingen MACHine for Chemical Simulations),¹¹² es un motor de MD desarrollado en la Universidad de Groningen, que permite resolver eficientemente las ecuaciones de Newton (sobre todo en lo referido a interacciones no enlazantes) y que inicialmente fue diseñado para simular biomoléculas.

El esquema general de trabajo para utilizar este código comienza con la elección de los parámetros con los cuales se integrarán las ecuaciones de movimiento. Es importante tener en cuenta que estos parámetros de simulación dependen estrictamente del CF seleccionado y no se pueden cambiar sin afectar a otras propiedades. En esta tesis se utilizó el CF de Martini con un modelo de agua polarizable. Por este motivo se utilizó un paso de tiempo (dt) de 20 fs. Además, las interacciones no enlazantes LJ fueron cortadas a una distancia $r_{cut-off}$ de 1,2 nm y suavemente reducidas a cero a partir de 0,9 nm. Las fuerzas electrostáticas fueron computadas

usando el método *Particle Mesh Ewald* (PME)¹¹³ con dipolo corregido (geometría 3dc)¹¹⁴, con un *cut-off* en el espacio real de 1,2 nm y de 0,2 nm⁻¹ en el espacio de Fourier. La lista de vecinos fue actualizada cada 10 fs usando un *cut-off* igual a $r_{cut-off}$.

El procedimiento general de simulación MD con GROMACS constó de una fase de relajación (método *steepest descent*) luego de configurar cada sistema, seguido de una fase de equilibración de 50 ns en un ensamble *NVT*: número de partículas (N), volumen (V) y temperatura (T) constantes. Posteriormente, y a fin de mantener las membranas lipídicas relajadas (sin tensión superficial inicial), las simulaciones fueron realizadas mediante un ensamble *NPT*: número de partículas (N), presión (P) y temperatura (T) constantes. Se utilizó un barostato Berendsen semi-isotrópico a 1 bar ($\tau_p = 3$ ps), con compresibilidad de 3×10^{-5} a lo largo de las direcciones x , y , z . Se eligió un termostato Berendsen a 310 K ($\tau_T = 0,3$ ps) para retener la fase líquida de la membrana.

3.2.3. Cálculo de perfiles de energía libre

El propósito de cualquier simulación de MD es muestrear todos los estados posibles en los que puede existir cierta molécula de interés. Sin embargo, una característica recurrente en los problemas abordados desde las simulaciones moleculares es que la energía térmica característica del sistema no es suficiente para permitirle realizar un muestreo de las regiones del perfil energético que se encuentran separadas por grandes barreras energéticas (es decir, barreras mucho mayores a $k_B T$). En consecuencia, el muestreo en general se torna un proceso lento. Una manera simple de sortear esta situación es sesgar el sistema, esto es, adicionar al sistema con cierta energía potencial externa, $V(s)$, para lograr muestrear el perfil de energía libre de reacciones lentas, o de eventos raros. De esta manera, al sistema se le permite evolucionar más allá de un mínimo local y muestrear el espacio de fases definido por la coordenada de reacción evaluada. En ese sentido, existen múltiples técnicas de muestreo sesgado entre los cuales se destacan el *Umbrella Sampling* (US) y la Metadinámica (MTD).

Cálculos de energía libre por Umbrella Sampling

La técnica de US surge como un método eficiente de muestreo sesgado del paisaje energético, mediante el cual se fuerza al sistema a explorar las regiones del espacio de fase que de otra forma no tendrían el muestreo suficiente.¹¹⁵ En primera instancia se define una coordenada de reacción, s , o variable colectiva (CV, por sus siglas en inglés), que permite describir la ubicación en el espacio de fase entre dos estados. Durante el proceso de US se agregan potenciales de sesgo $V(s)$ a lo largo de la CV para conducir al sistema de un estado termodinámico a otro. Dicho potencial de sesgo sirve para confinar las variaciones en la CV alrededor de algún valor fijo s_i , y por lo tanto permite un muestreo más eficiente en la región alrededor de s_i .^{116,117}

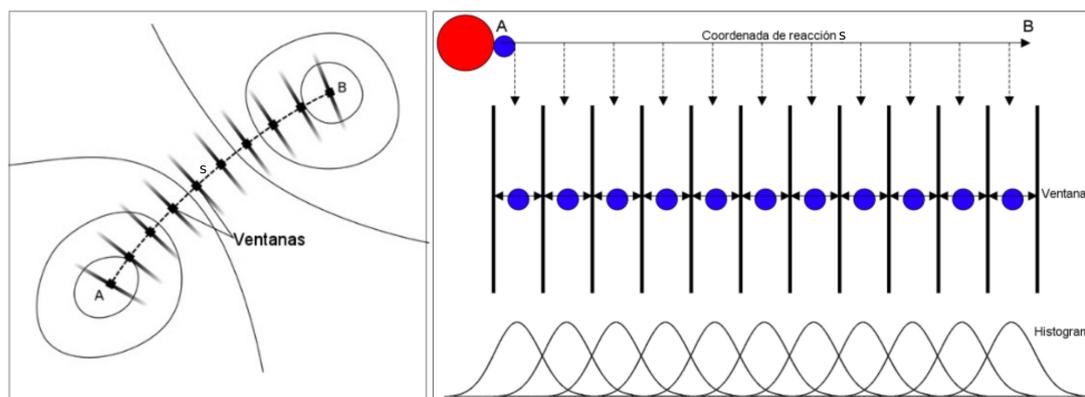


Figura 3.3 (izquierda) Representación del proceso de US sobre una superficie de energía libre. En línea de trazos se muestra el camino entre dos estados de mínima energía libre, A y B. En forma perpendicular, se indica el muestreo de las distintas ventanas apostadas a lo largo de la trayectoria A-B. Imagen adaptada de Ref.¹¹⁵ (derecha) Ilustración del proceso general de US. La imagen superior representa el pulling o tracción de la molécula de interés en la dirección de la coordenada de reacción elegida, para generar una configuración inicial para cada ventana. La imagen del medio corresponde a las simulaciones MD independientes realizadas dentro de cada ventana, donde CV es restringida en una posición específica por un potencial armónico. Finalmente, en la imagen inferior se muestra el histograma de configuraciones, con ventanas adyacentes que se superponen de tal manera que una función de energía continua puede derivarse a partir de estas simulaciones. Imagen adaptada de Ref.¹¹⁸

Los pasos intermedios entre estos dos estados se cubren mediante una serie de ventanas en cada una de las cuales se realiza una simulación de MD con el potencial de sesgo aplicado. Frecuentemente, $V(s)$ tiene la forma de potenciales armónicos por su simplicidad, aunque puede tener cualquier forma funcional. Finalmente, a partir de este muestreo, se puede calcular el cambio en la energía libre en cada ventana al combinarlas mediante algún método tal como el análisis de histogramas múltiples ponderados (*WHAM*, por sus siglas en inglés).¹¹⁶ El método *WHAM* es un esquema que une la distribución de probabilidad sesgada del muestreo US para producir una única distribución de probabilidad sin sesgo. Es fundamental para realizar dicha

combinación que los histogramas correspondientes a ventanas adyacentes se superpongan en cierta medida (ver Figura 3.3(derecha)).

El cálculo de la energía libre a partir de los potenciales de sesgo se obtiene acorde a la siguiente expresión:

$$F(s) = -k_B T \log P(s) \quad (3.7)$$

donde $P(s)$ es la distribución de probabilidad de la variable colectiva s , calculada por WHAM, k_B es la constante de Boltzmann y $F(s)$ es la energía libre.

Cálculos de energía libre por Metadinámica

Metadinámica (MTD) es un método de simulación que fue introducido por Parrinello y Laio¹¹⁹, y mejorado por Barducci et al.¹²⁰ El algoritmo supone que el sistema puede describirse mediante algunas CVs. Durante la simulación, se calculan las propiedades del sistema, en este caso la energía libre, en el espacio determinado por las CVs y se agrega un potencial gaussiano positivo. De esta forma, y durante el transcurso de una simulación larga, el sistema es empujado sistemáticamente fuera del mínimo de energía libre lo que permite explorar regiones del espacio de fases que no son muestreadas durante una simulación estándar.¹²¹ A tiempos largos, el sistema recorre uniformemente la región de CVs que se desea muestrear, como se representa en la Figura 3.4. Es por este motivo que informalmente la MTD se entiende como el llenado de los pozos de energía libre con arena computacional.¹²² En este punto, el espacio energético puede recuperarse como el opuesto de la suma de todas las gaussianas.

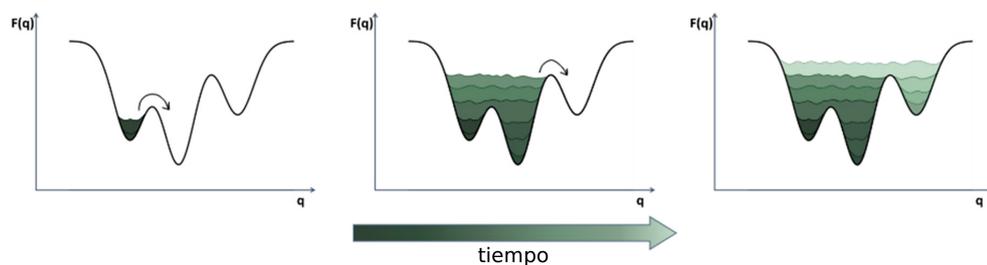


Figura 3.4 Representación de la exploración del espacio de fase de CV a través de la sumatoria de potenciales gaussianos. El sistema fue preparado en un mínimo local y con la deposición sucesiva de potenciales comienza a explorar otros mínimos locales con el paso del tiempo. Adaptada de Ref.¹²³

El intervalo de tiempo entre la suma de dos funciones gaussianas, así como la altura y el ancho, se ajustan para optimizar la relación entre precisión y costo computacional. La metadinámica tiene la ventaja de no requerir una estimación inicial del espacio energético para explorar, sin embargo requiere encontrar un buen conjunto de variables colectivas.¹²⁴

Un código abierto para cálculo de MTD disponible es PLUMED,¹²⁵ el cual funciona asociado al código de Dinámica Molecular, GROMACS en este caso. En ese sentido, el código de MD suministra las coordenadas del sistema al código de MTD a intervalos determinados, para que luego este último pueda calcular el valor de la CV seleccionada y así determinar la posición del sistema en el espacio de energía libre. Una vez que esto sucede, se determina el potencial de sesgo. Al inicio de la simulación metadinámica, el potencial de bias aplicado al sistema es cero. El mismo se construye progresivamente como una sumatoria de gaussianas agregadas al espacio de fase de la CV a lo largo de la trayectoria.¹¹⁹

$$V(\vec{s}, t) = \sum_{k\tau < t} W(k\tau) e^{\left(-\sum_{i=1}^d \frac{(s_i - s_i^{(0)}(k\tau))^2}{2\sigma_i^2}\right)} \quad (3.8)$$

donde s es el valor de la CV, t es el tiempo, τ es el paso de tiempo al cual se colocan las gaussianas, σ_i es el ancho de la gaussiana y W es la altura de la gaussiana.¹²⁶

La energía libre calculada no converge a un valor exacto, sino más bien oscila alrededor del mismo. Este problema fue solucionado al agregar un factor de atenuación a las gaussianas agregadas durante el proceso de MTD. En la práctica, la modificación afecta a la altura W de las gaussianas depositadas acorde a la siguiente expresión:

$$W = \omega \tau e^{\left(-\frac{V(\vec{s}, t)}{k_B \Delta T}\right)} \quad (3.9)$$

donde ω es la velocidad a la cual se colocan las gaussianas, y ΔT es un factor de entrada con unidades de temperatura. Respecto a la MTD estándar, se debe resaltar que la velocidad de deposición de las gaussianas decae con $1/t$. Por otro lado, cabe destacar que a pesar de que el potencial de sesgo no completa totalmente la superficie de energía libre (FES, por sus siglas en inglés), tiende a su valor límite en una sola corrida:

$$V(\vec{s}, t \rightarrow \infty) = -\left(\frac{\Delta T}{T + \Delta T}\right)F(s) + C \quad (3.10)$$

donde C es una constante. La distribución de probabilidad adquiere la siguiente expresión:

$$P(s) \propto e^{-\frac{F(s)}{k_B(T+\Delta T)}} \quad (3.11)$$

Por lo tanto, para $\Delta T \rightarrow 0$ se recupera la MD ordinaria, mientras que el límite $\Delta T \rightarrow \infty$ corresponde a la MTD estándar. Entre estos dos extremos, se puede regular el grado de exploración de FES al ajustar ΔT . Esto evita el sobrellenado y podría ahorrar tiempo computacional.¹²³

3.2.4. Configuración de los sistemas simulados

La interacción de las pArg (R₉ y R₈W₃) con las bicapas lipídicas se simuló mediante un CF de grano grueso (Martini). Acorde a este modelo, cada residuo de arginina fue representado por 4 esferas de Martini, el triptófano por 5 esferas y cada fosfolípido mediante 12 esferas. En este último caso, la principal diferencia entre los distintos fosfolípidos simulados estribó en la esfera que representaba a la cabeza polar. En el caso del ácido palmítico, su estructura estuvo representada por 5 esferas de Martini y la diferencia entre el estado neutro y ionizado estuvo dado por la presencia de una carga negativa en la esfera que representaba la cabeza polar en el segundo caso. A continuación se describen los detalles específicos respecto a cada sistema simulado.

Cálculo de energía libre bajo diferentes potenciales electrostáticos por Metadinámica

Se prepararon sistemas con una bicapa lipídica de 10×10 nm, centrada en la caja de simulación ($z = 35$ nm). La bicapa estuvo compuesta por 286 moléculas de 1,2-dioleil-3-glicerofosocolina (DOPC) y fue solvatada con 25000 moléculas de agua polarizable de Martini (PW). Se colocaron dos potenciales repulsivos de corto alcance en $z = 0$ nm y $z = L_z$, a modo

de paredes blandas que restringieron el movimiento de las partículas en las direcciones X e Y. De esta manera quedaron configurados dos compartimientos, uno superior y otro inferior: en el primero se colocó el péptido (R₉ o R₈W₃) con sus respectivos contraiones, mientras que el segundo contenía una concentración de NaCl ~180 mM.

A continuación, para simular las distintas condiciones de potencial electrostático ($\Delta\Phi$) se generó un desbalance iónico a través de la bicapa mediante el pasaje de iones Na⁺ del compartimiento inferior al superior, dejando los contraiones (Cl⁻) en el inferior. Cabe resaltar que el máximo utilizado no provocó electroporación en la bicapa lipídica. En estas condiciones, cada sistema fue equilibrado y se realizaron simulaciones MD en un ensamble *NPT* por 250 ns. A partir de estas simulaciones MD se calcularon los perfiles de $\Delta\Phi$ en cada sistema, mediante la integración de la ecuación de Poisson:¹²⁷

$$\phi(z) = -\frac{1}{\epsilon_0} \int_0^z dz' \int_0^{z'} q(z'') dz'' \quad (3.12)$$

donde ϵ_0 es la permitividad del vacío, $q(z)$ es la densidad de carga a lo largo del eje z , y las integrales son realizadas desde $z = 0$ nm, donde el potencial es referenciado a cero.

Para los cálculos de energía libre mediante MTD, se definió la CV como la distancia en el eje z entre el centro de masa (COM, por sus siglas en inglés) de R₉ -COM_{R₉}- y el COM de la bicapa -COM_{bicapa}-. Primero, se realizaron simulaciones MD para equilibrar los sistemas por 100 ns y a continuación se realizaron las simulaciones de MTD. En estas últimas se agregaron gaussianas con una altura de 1,3 kJ/mol, con un factor de sesgo de 1500 kJ/mol, cada 100 pasos de MD. Las simulaciones de MTD se llevaron a cabo por 6 a 8 μ s antes de extraer los perfiles de energía libre.

Cálculo de energía libre para distintas condiciones de carga superficial en la bicapa por Umbrella Sampling

Todos los sistemas consistieron en una bicapa de 336 lípidos, donde se ajustó la proporción de cada lípido para lograr los porcentajes de DOPG de interés, a saber, 0, 10, 30, 50%.

La bicapa se centró en el eje z de una caja de simulación rectangular (10.9 x 10.9 x 22.5 nm), solvatada con ~ 20000 moléculas de agua. Se colocó el péptido (R_9 , G_9 , G_{31} , R_9G_9 , R_9G_{31}) en solución, con sus respectivos contraiones para mantener la electroneutralidad del sistema. Estas simulaciones se realizaron con condiciones periódicas de contorno en x , y , z .

Para el estudio del efecto del grupo carboxílico en la adsorción/inserción de R_9 en bicapas, se ensambló una bicapa de DOPC y ácido palmítico (PA, por sus siglas en inglés) que reprodujera la misma densidad de carga que el sistema que contenía la bicapa de DOPC-DOPG 70:30. De esta manera, la bicapa DOPC-PA quedó compuesta por 252 moléculas de DOPC y 84 de ácido palmítico. El tamaño de la caja de simulación se mantuvo constante. Finalmente se adicionaron los contraiones correspondientes para lograr las condiciones de electroneutralidad del sistema.

En general, se definió la CV como la distancia en el eje z entre el centro de masa (COM, por sus siglas en inglés) del péptido y el COM de la bicapa lipídica (COM_{bic}). En el caso del péptido R_9G_{31} se definió la CV como la distancia $COM_{bic}-COM_{R_9}$, mientras que para G_{31} , la CV fue la distancia COM_{bic} -extremo de G_{31} (posición del primer aminoácido). Esta modificación permitió comparar procesos de traslocación equivalentes entre los diversos péptidos. Con el objetivo de generar las configuraciones iniciales para cada ventana, se realizó un *pulling* del péptido a baja velocidad, en función de la CV definida. A continuación, para lograr un muestreo adecuado de la CV, en el *bulk* se colocaron potenciales armónicos (ventanas) distanciadas 0,4 nm con una constante de 300 kJ/mol, mientras que desde la interfase solución/bicapa y hacia el interior de la bicapa, se colocaron ventanas cada 0,1 nm con una constante de 5000 kJ/mol. Cada ventana US fue equilibrada por 100 ns y la corrida de producción duró otros 300 ns. El pos-procesamiento fue realizado utilizando el método de análisis de histogramas múltiples ponderados (*WHAM*).¹¹⁶

3.3. Técnicas de caracterización de monocapas de Langmuir

3.3.1. Medición de la presión superficial

Los experimentos en MLs se realizaron en una balanza de Langmuir, dispositivo que cuenta con un recipiente con superficie hidrofóbica (generalmente de Teflon), donde se coloca la subfase acuosa, así como con dos barreras móviles (también hidrofóbicas), que luego son utilizadas para comprimir la monocapa de anfifilos. Típicamente, la solución de moléculas anfipáticas se prepara con solventes orgánicos, volátiles e inmiscibles en agua, de forma tal que, luego de sembrar un determinado volumen de solución en la interfase, el solvente se evapora dejando la capa monomolecular de anfifilos. Respecto a esta última, se pueden obtener parámetros tales como la tensión superficial, el potencial superficial, la compresibilidad, entre otros. Para medir la presión superficial se recurrió a una placa de platino acoplada a la balanza de Langmuir, acorde al método de Wilhelmy. Se determinó el valor de presión superficial Π , según la siguiente ecuación:

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (3.13)$$

donde γ_0 es la tensión superficial del agua, y γ es la tensión superficial resultante de la presencia de un surfactante que se adsorbe en la interfase. Este último fenómeno de adsorción genera una disminución en la tensión superficial, por lo que Π resulta un valor positivo que aumenta paulatinamente a medida que se adsorbe más material en la interfase.

Isotermas Π -A de lípidos puros

El procedimiento estándar utilizado para medir la presión superficial comenzó con una limpieza cuidadosa de la cuba hidrofóbica de la balanza de Langmuir (equipo KSV, Finlandia) con alcohol etílico, con el fin de quitar cualquier impureza que hubiera en la misma. Posteriormente, se realizaron sucesivos lavados con agua deionizada filtrada mediante sistema Osmoion (Apema, BA, Argentina), cuya resistividad final fue de $\sim 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$. Luego, se vertió la subfase

salina de NaCl 150mM, a la cual previamente se le había ajustado el pH mediante la adición de NaOH o HCl. Para la subfase a pH 8, se utilizó además un buffer Tris 10mM para evitar la acidificación causada por la disolución de CO₂ del aire. Antes de sembrar la monocapa lipídica sobre la subfase, se controló que la interfase no contuviera impurezas, para lo cual se midió la tensión superficial de la subfase pura, que debía aproximarse a la del agua, esto es, $\gamma = 72$ mN/m (a 25°C). A continuación, se procedió a sembrar la solución clorofórmica de lípido en la interfase, gota a gota, mediante el uso de una microjeringa Hamilton (Reno, NV, USA). Luego de cada agregado de solución lipídica, se permitió que el solvente orgánico se evaporara. Transcurrido este período, se comenzó a comprimir la monocapa mediante el movimiento de las barreras hidrofóbicas. De esta manera, se obtuvieron registros de presión superficial Π (mN/m) en función del área molecular promedio (Å^2), habitualmente denominados isothermas Π -A. Estos registros medidos a temperatura constante (25°C) fueron adquiridos para cada lípido puro, así como para cada condición de pH de la subfase (pH 3, 5 y 8). Se seleccionaron estos tres valores de pH para poder evaluar la interacción péptido-lípido en monocapas lipídicas con distintos grados de ionización.

Curvas de penetración de pArg en monocapas lipídicas

La monocapa, siendo la mitad de una membrana, es un sistema bidimensional muy bien definido que permite estudiar interacciones intermoleculares entre lípidos, así como también entre lípidos y péptidos. Por consiguiente, se utilizaron monocapas lipídicas para obtener información sobre la interacción de lípidos con poliargininas (pArg), más precisamente, sobre la capacidad de éstas para insertarse en membranas lipídicas. Para ello, se realizaron curvas de penetración, las cuales implican un procedimiento similar al descrito en la sección anterior para las isothermas Π -A, con algunas diferencias que se detallan a continuación. En primer lugar, se utilizó una cuba cuyo volumen total fue mucho menor (700 μL). En segundo lugar, a diferencia de las isothermas, la presión superficial se logró por sembrado y no por compresión. Una vez conformada la monocapa lipídica, a una dada presión superficial, se inyectó una alícuota de la solución peptídica en la subfase a través de un orificio en la pared de la cuba. En tercer lugar, el área de la cuba permaneció constante en todo momento (no hay barreras móviles), por lo que la variable en este experimento fue la tensión superficial tras la inyección del péptido en la subfase. Eventualmente, lo que se registró fue la variación temporal de la presión superficial, $\Pi = f(t)$.

De esta función, se evaluaron los valores de presión superficial al inicio del experimento ($\Pi = f(t_0) = \Pi_0$) y al final ($\Pi = f(t_f) = \Pi_f$). Se consideró $t = t_f$ cuando la variable Π hubo alcanzado una asíntota horizontal, es decir, se mantuvo constante en un valor. Finalmente, se calculó el valor $\Delta\Pi = \Pi_f - \Pi_0$, que se interpreta como el aumento producido en la presión superficial debido a la incorporación de las moléculas de péptido. En la Figura 3.5 se muestra una curva de penetración representativa. Todos los experimentos se realizaron a 25°C.

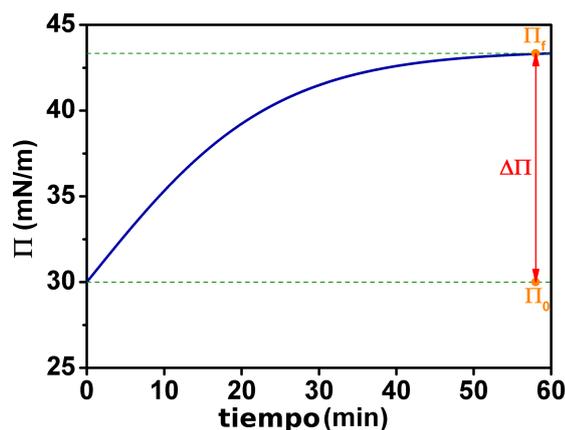


Figura 3.5 Curva de penetración de KR_8W_3C en una monocapa de ácido perfluorotetradecanoico (PFTD) sobre una subfase acuosa de $NaCl$ 150 mM a pH5, con $\Pi_0 = 30$ mN/m. Las líneas punteadas de color verde delimitan los valores de presión superficial inicial y final (puntos color naranja), y la flecha roja marca la diferencia entre estos valores, es decir, $\Delta\Pi$.

3.3.2. Medición del potencial superficial, $\Delta\Phi$, de monocapas

En una subfase acuosa, las moléculas de agua tienden a orientar sus dipolos en una dirección preferencial, lo cual produce un campo eléctrico neto con componente perpendicular a la interfase. Si luego se dispersan moléculas de surfactante en esa misma interfase, la orientación espacial de esos dipolos, sumado al momento dipolar de los anfífilos, generan alteraciones en el campo eléctrico resultante. De esta manera, la diferencia entre los potenciales en ausencia y presencia de la monocapa de anfífilos, $\Delta\Phi$, se define como potencial superficial o potencial de Volta.

La medición del potencial se realizó mediante dos métodos distintos, según lo requiriese el experimento realizado. El primero de ellos se conoce como método de la placa vibrante,¹²⁸ que consiste en un electrodo metálico en forma de placa (análogo a la placa de un condensador), que es sumergido en la subfase acuosa. El segundo electrodo se mantiene en el aire, muy próximo a la superficie de la subfase acuosa (~ 5 mm) que, de esta manera, constituye la otra

placa de un condensador. A continuación, el electrodo que está en el aire comienza a vibrar rápidamente y se detecta la señal alternante a través de la subfase acuosa (resistencia), mediante un amplificador de alta ganancia. Este método se utilizó para medir el potencial superficial en los experimentos de compresión de monocapas. Típicamente, en primer lugar se midió el potencial superficial de una interfase limpia (asumido como potencial de referencia); luego se sembró la monocapa lipídica en estado gaseoso (es decir, a valores altos de área molecular promedio, con interacciones intermoleculares prácticamente nulas), y finalmente se procedió a comprimir la monocapa mediante las barreras hidrofóbicas de la balanza, a una velocidad de 5 mm/min. Por consiguiente, a mayor compresión de la interfase lipídica, mayor orientación de los momentos dipolares de sus moléculas y contribuciones más significativas al campo eléctrico de la interfase. De esta manera se obtuvo la variación temporal del potencial superficial, en función del área molecular ocupada por los lípidos en la interfase. Todos los experimentos fueron realizados en una cuba cuyo volumen fue 200 mL y a una temperatura de 25 ° C.

En el caso de los experimentos de penetración de péptidos en monocapas lipídicas se utilizó el método del electrodo ionizante. El mismo consiste en colocar un electrodo de referencia Ag/AgCl/Cl⁻ sumergido en la subfase, mientras que el electrodo ionizante de ²⁴¹Am (Americio) se colocó muy próximo a la interfase (~5 mm). Este último produjo la ionización del aire próximo a la interfase, resultando en un medio lo suficientemente conductor para lograr medir $\Delta\Phi$ mediante un voltímetro de alta impedancia. El volumen de la cuba en estos experimentos fue de 700 μ L, y la temperatura de trabajo de 25°C.

3.3.3. Microscopía de ángulo de Brewster (BAM)

La técnica BAM permite obtener información en tiempo real sobre la organización de las moléculas que forman una capa monomolecular en una interfase fluida. Entre algunas de sus aplicaciones se encuentran el estudio de transiciones de fase, la caracterización de la microestructura de un dominio, el estudio de la separación de fases en monocapas mixtas, el seguimiento de cambios debidos a la formación de un complejo y la observación del colapso o la formación de múltiples capas. La técnica también es sensible a la presencia de anisotropía óptica en monocapas debido a variaciones en la orientación molecular. Para lograr la visualización de la interfase, se hace incidir un haz de luz polarizada en el plano paralelo sobre la interfase agua/aire.

Es fundamental que el ángulo de incidencia (respecto a la normal a la interfase), sea el llamado ángulo de Brewster, que para la interfase agua/aire es de $\sim 53^\circ$. La particularidad del ángulo de Brewster es que al incidir sobre la interfase, la reflexión es mínima (Figura 3.6.a). Luego, si se dispersa un monocapa de anfifilos en la interfase, cambia el índice de refracción así como el espesor de la misma, por lo que parte del haz incidente se reflejará hacia una cámara apostada en forma opuesta al polarizador, pasando a través de un lente objetivo. La intensidad en cada punto de la imagen depende del espesor local de la monocapa y de sus propiedades ópticas. En general, las zonas de la interfase con mayor ordenamiento molecular y mayor espesor resultan más brillantes.

Los experimentos de microscopía de ángulo de Brewster se llevaron adelante utilizando un Elipsómetro EP3 (Accurion) con un objetivo 20X (Nikon, NA 0.35). Este equipo forma parte del Centro de micro y nanoscopía de Córdoba (CEMINCO), el cual está adherido al Sistema Nacional de Microscopía (SNM). En los experimentos de adsorción, se hizo incidir el haz de luz polarizada sobre una monocapa lipídica a una presión inicial, tras lo cual se procedió a inyectar el péptido en la subfase. De esta manera, se registraron los cambios morfológicos producidos por la interacción del péptido con la interfase lipídica, en función de la variación temporal del nivel de gris respecto al inicial (es decir, a Π_0). Para las isotermas de compresión, el elipsómetro se utilizó acoplado a una balanza de Langmuir, de forma tal que se pudieran monitorear los cambios morfológicos de la interfase asociados a los distintos grados de compactación de la monocapa (Figura 3.6.b). Nuevamente, se registró el cambio temporal en el nivel de gris, así como la presión superficial y el área molecular promedio.

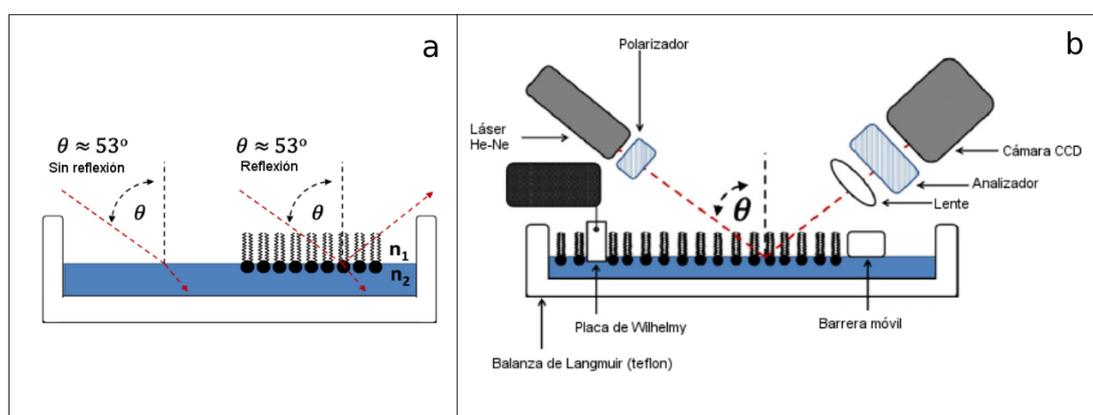


Figura 3.6 (a) Esquema de la configuración experimental del microscopio de ángulo de Brewster. (b) Esquema del principio de la microscopía de ángulo de Brewster. Adaptado de ¹²⁹.

Para obtener la reflectividad relativa de las interfases, se tomaron imágenes durante todo el proceso de compresión de la monocapa. Posteriormente, éstas fueron procesadas mediante el software de libre distribución Image J, para obtener el nivel de gris de cada imagen durante los distintos estados de compactación. En cada experimento se tomó el nivel de gris inicial (a Π_0 , o antes de inyectar el péptido) como el valor de referencia; de esta manera la reflectividad relativa se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$reflectividad\ relativa = \frac{NG_{t_1} - NG_{t_0}}{NG_{t_0}}$$

donde NG_{t_0} es el nivel de gris al inicio del experimento y NG_{t_1} es el nivel de gris en un instante posterior.

3.4. Técnicas experimentales usadas en el estudio de bicapas lipídicas

3.4.1. Vesículas unilamelares grandes (LUVs)

Protocolo de formación de LUVs

El protocolo general se basa en la síntesis de vesículas multilamelares (MLVs) que luego son sometidas a ciclos repetitivos de extrusión a través de un filtro con tamaño de poro acorde al tamaño final deseado en la LUV. En primer lugar se realizó la mezcla de cada lípido en la proporción adecuada en un vial y a continuación se evaporó cuidadosamente el solvente utilizando una corriente de nitrógeno. Luego se colocó el vial en una cámara de vacío durante 2 h para extraer cualquier traza de solvente. Posteriormente se hidrató la película lipídica con una solución de NaCl 150 mM y la suspensión fue sometida a 5 ciclos de calor/frío: 1 minuto en un baño a 60°C, 1 minuto de mezclado con vortex, y 1 minuto en un baño con hielo. De esta manera se formaron las vesículas multilamelares (MLVs), tras lo cual se procedió a realizar ciclos de extrusión: la suspensión de MLVs se recogió en una jeringa y se extruyó lentamente a través de un filtro con tamaño de poro de 100 nm. Una segunda jeringa comunicada con la

primera recibe la muestra extruída, completando un ciclo de extrusión. En total se realizaron 20 ciclos de extrusión. Todos los ciclos se realizaron a 60°C.

Para determinar el tamaño de las LUVs así obtenidas se utilizó la técnica de dispersión dinámica de la luz.

Dispersión dinámica de luz: análisis del tamaño promedio de la población de LUVs

Se sabe que las partículas suspendidas en un medio líquido nunca están en estado estacionario, sino que se encuentran en constante movimiento Browniano producido por el choque aleatorio de las partículas con moléculas de líquido. Al ser iluminadas con un láser, las partículas de tamaño nanométrico dispersan la luz incidente en forma proporcional a la sexta potencia de sus radios,¹³⁰ y esa dispersión puede ser isotrópica (de Rayleigh) o anisotrópica (de Mie), acorde a la relación que guarden el radio de la partícula y la longitud de onda de la luz incidente. Luego, el método de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) mide la intensidad de luz dispersada por las partículas móviles que, por lo demás, generarán interferencias constructivas y destructivas que producen variaciones temporales en la señal obtenida.

A partir de una función de autocorrelación obtenida por ajuste de los datos obtenidos por DLS, se puede obtener el radio hidrodinámico de la partícula dado por la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (3.14)$$

donde D es la constante de difusión, η es la viscosidad absoluta del solvente, y R_H es el radio hidrodinámico de la partícula. Como se puede observar en la ecuación, los resultados del DLS dependen de ciertas variables que incluyen a la viscosidad del solvente,¹³¹ la temperatura,¹³² entre otros. Dicha ecuación además demuestra la relación inversa establecida entre la velocidad de traslación de una partícula y su tamaño. Así, partículas más grandes se mueven más lentamente que aquellas más pequeñas. Luego si durante un corto período de tiempo se mide la intensidad de luz dispersada, se podría inferir su tamaño según el grado de semejanza de las señales obtenidas

al principio y al final de dicho período: la variación en la señal debería ser muy baja para el caso de partículas más grandes y por ende más lentas. Se cumple lo opuesto para partículas más pequeñas.

Un equipo DLS contiene un correlador digital cuyo fin es inferir el coeficiente de difusión traslacional (como medida de la velocidad del movimiento browniano), a partir del grado de semejanza entre dos señales de intensidad de luz, en un breve período de tiempo. Es decir, el equipo mide las fluctuaciones temporales de la luz dispersada, a partir de lo cual se determina el coeficiente de difusión traslacional (D) y éste se relaciona con el tamaño de la partícula por la ecuación de Stokes-Einstein. A menos que la muestra sea monodispersa (población de partículas con tamaños similares) la caracterización por DLS consistirá en una distribución estadística de partículas de diferentes tamaños.

El análisis de las LUVs mediante DLS se realizó netamente para corroborar la existencia de las vesículas sintetizadas en cada caso.

Movilidad electroforética: análisis del potencial ζ

Una partícula cargada en suspensión posee una primera capa de contraiones (capa de Stern), y contigua a ésta una segunda capa difusa de contraiones que son atraídos electrostáticamente a la primera. Si sobre la partícula cargada actúa un campo eléctrico, la misma se desplazará acompañada de los iones que se encuentran dentro de su radio hidrodinámico, definido por el plano de deslizamiento. Este radio incluye los iones de la primera capa de iones y parte de los de la capa difusa. De esta manera, se define el potencial zeta como el potencial existente en el plano de deslizamiento.

Para la determinación del potencial zeta, el equipo que se utiliza mide la movilidad electroforética y luego se aplica la ecuación de Henry para calcular el potencial zeta a partir de dicha medida:

$$\mathcal{U}_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(Ka)}{3\eta} \quad (3.15)$$

donde \mathcal{U}_E es la movilidad electroforética, ϵ es la constante dieléctrica, η es la viscosidad del solvente, ζ es el potencial zeta, y $f(Ka)$ es la función de Henry; Ka mide la relación del radio de la partícula y el grosor de la doble capa eléctrica. Para las condiciones experimentales utilizadas en esta tesis, $f(Ka)$ es 1 (aproximación de Hückel).

Dado que tanto la pArg como las vesículas utilizadas presentaban carga formal, el análisis del potencial ζ es una forma de caracterizar la afinidad de la pArg por las bicapas lipídicas. El potencial ζ de las vesículas estudiadas en esta tesis fue determinado en un equipo ZetaSizer Malvern Ltd, en el cual se inyectaron 100 μL de solución de LUVs en contacto con KR₉C en concentraciones finales de 1; 2,5; 5 y 7,5 μM . Cabe destacar que en este caso las LUVs fueron sintetizadas en una solución de NaCl 1 mM.

Para definir la relación péptido/lípido (P/L), es necesario conocer la cantidad de lípido que finalmente se encuentra en la solución de LUVs, el cual suele ser menor al que se secó y rehidrató inicialmente para formar las MLVs. Para ello, se realizó una determinación colorimétrica de Bartlett, que implicó la mineralización del fósforo contenido en los fosfolípidos de las vesículas y la posterior formación de un complejo coloreado. Para ello cada muestra obtenida de las medidas de potencial ζ (vesículas más péptidos) fue sometida a hidrólisis con ácido perclórico al 70% (Sigma), por 1h, a 180°C. Luego se agregó molibdato de amonio (Sigma), el cual en presencia de fosfato formó el complejo fosfomolibdico de color azul.

Paralelamente, se procesó una muestra blanco y 5 muestras con concentraciones crecientes del estándar de fosfato, con el fin de obtener la curva de calibración y, a partir de ésta, calcular la concentración de fosfato en las muestras de LUVs mediante espectrofotometría UV-Visible.

3.4.2. Vesículas unilamelares gigantes (GUVs)

Protocolo de electroformación de GUVs

Este método se basa en el uso de un par de vidrios conductores (ver Figura 3.7), comúnmente llamados ITOs (*indium tin oxide*), que ofrecen una superficie hidrofílica sobre la cual

se formarán bicapas lipídicas que, luego de hidratarse y en presencia de un campo eléctrico, se irán plegando para formar las vesículas unilamelares gigantes.^{133,134} En primer lugar, se realizó la mezcla de cada lípido en la proporción adecuada en un vial, adicionando un 1 mol% de sonda fluorescente (L-alfa-fosfatidiletanolamina-N-(lisamina rodamina B sulfonil) (Sal de amonio) (Transfosforilada de huevo de gallina); PE-Rho). Luego se procedió a termostatar ambos vidrios a 40°C sobre una plancha y se esparcieron 10 μ L de la mezcla de lípidos (0,5 mg/mL) desde el centro y en forma circular hasta cubrir un área cuyo diámetro se aproximó a 2 cm. A continuación los ITOs fueron sometidos a vacío por 2 h para extraer cualquier resto de solvente. Posteriormente se sellan ambos vidrios de manera tal que las superficies con las películas lipídicas quedaran hacia el interior. Se procedió a hidratar estas películas mediante el agregado de solución de sacarosa 300 mM, NaCl 150 mM (previamente calentada a 60°C y filtrada). Inmediatamente después del agregado de la solución de sacarosa, se conectó el par de ITOs a un generador de ondas (onda sinusoidal, 10 Hz, 2,6 V) y se llevó a una estufa a 37°C, por una hora. Transcurrido este lapso, se obtuvo una dispersión de GUVs que, acorde a estudios preliminares, son estables por un período de 48 h guardadas a 4°C.

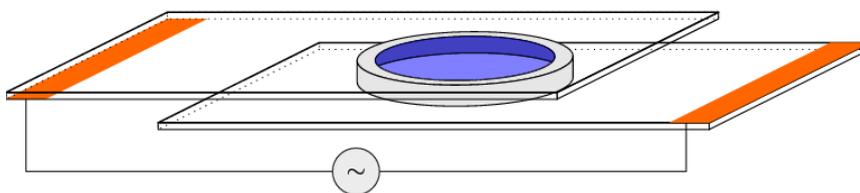


Figura 3.7 Ilustración del dispositivo utilizado para generar las GUVs mediante electroformación. El mismo consta de dos vidrios conductores entre los cuales se coloca un anillo separador, que define un volumen que contendrá la suspensión de GUVs. Las franjas de color naranja son cintas de cobre a través de las cuales se conecta el generador de ondas.

Protocolo de observación de GUVs

Se utilizó una cámara de medios de poliestireno extraíble unida a un portaobjetos de microscopio de vidrio (LabTek). En primer lugar, se cubrió la base de vidrio de cada cámara con β -caseína 10% p/v, para evitar que las vesículas entraran en contacto con la superficie hidrofílica del vidrio y se rompieran. Tras haber dejado reposar la caseína a 4°C, por 30 min, se extrajo cualquier exceso de dicha proteína, y se depositaron 200 μ L de glucosa 300 mM (NaCl 150 mM). Esta última solución fue preparada para que resultara isotónica respecto a la suspensión de GUVs. Previo a su observación en un microscopio confocal de fluorescencia (Confocal Olympus

FV1000, con objetivo 60X de inmersión en aceite, perteneciente al CEMINCO (SNM)), se inyectaron 20 μL de la suspensión de GUVs en la cámara. El hecho de utilizar glucosa en el medio externo y sacarosa en el medio interno de las vesículas permitió, por un lado, que las mismas pudieran ser observadas por contraste de fase, ya que cada solución tiene índices de refracción distintos; por otro lado, que las vesículas decanten al fondo de la cámara dada la diferencia de densidades entre dichas soluciones. En promedio, se registraron imágenes de 15 vesículas por cada condición de concentración de KR_9C (0; 1; 2,5; 5 y 10 μM), a razón de 100 capturas en 2 minutos.

Protocolo de análisis de forma de GUVs

Con el objetivo de estudiar la influencia de KR_9C sobre las propiedades mecánicas de las vesículas, se realizó el análisis de la fluctuación de forma de GUVs de distinta composición. El parámetro seleccionado para definir la forma de las vesículas fue la relación de aspecto (AR): un valor de $\text{AR} = 1$ indica un círculo perfecto, mientras que $\text{AR} > 1$ representa elipsoides elongados preferencialmente en uno de los ejes (ver Figura 3.8 y Ecuación 3.16).

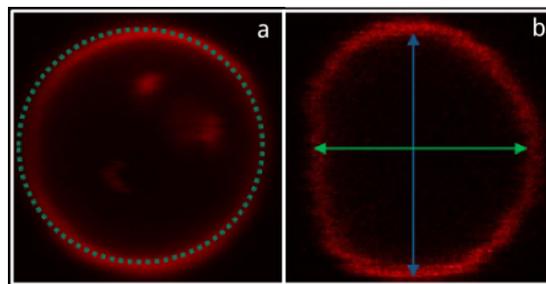


Figura 3.8 Micrografía de fluorescencia de una GUV con (a) AR cercana a 1, mientras que en (b) se observa que la vesícula se encuentra perturbada dando como resultado un eje mayor y otro menor.

En la Figura 3.8 se ilustra gráficamente el significado de la relación de aspecto y cómo la perturbación de la GUVs se puede registrar mediante este parámetro. A continuación, se describe la relación matemática que define AR:

$$\text{AR} = \frac{L_{\text{eje mayor}}}{L_{\text{eje menor}}} \quad (3.16)$$

donde L es la longitud del eje correspondiente.

Por cada condición evaluada de concentración de péptido, se observaron 15 vesículas a partir de las cuales se obtuvieron 100 imágenes secuenciales mediante microscopía confocal de fluorescencia. De esta manera, se realizó un monitoreo de las fluctuaciones térmicas de la membrana alrededor de su posición de equilibrio para cada vesícula. Mediante el software de libre distribución *Image J*, se determinaron los valores de AR para cada micrografía de fluorescencia y, tras promediar los 100 valores de AR por vesícula, se obtuvieron 15 valores promedio de AR con su respectiva desviación estándar (SD_{AR}), por condición.

El análisis de fluctuaciones se realizó teniendo en cuenta el valor SD_{AR} de cada vesícula, el cual denota cómo fluctuó la forma (AR) de la vesícula alrededor de su valor promedio. Se seleccionó el valor del percentil 95 (valor por debajo del cual se encuentran el 95 % de los datos)¹³⁵ de la condición control como el límite superior (LS), respecto del cual la población de GUVs quedó separada en dos subgrupos: vesículas "fluctuantes" y "no fluctuantes". Las GUVs con SD_{AR} superiores al LS fueron consideradas "GUVs fluctuantes", y el resto como "GUVs no fluctuantes". De esta manera, se realizó un análisis comparativo del efecto de la concentración de KR₉C sobre las propiedades mecánicas de las GUVs en función del porcentaje de GUVs fluctuantes para cada composición estudiada. Por último cabe destacar que los valores P95 fueron determinados mediante el software de libre distribución *Infostat*.

Capítulo 4

Efecto del potencial transmembrana en la inserción de las poliargininas

Resumen

En este capítulo se analizan las variaciones en la energía libre del proceso de inserción de las poliargininas, asociadas a dos factores. Uno inherente a la naturaleza del péptido, esto es, la anfipaticidad de la molécula de poliarginina. El otro factor es externo, resultado de someter el sistema a un potencial electrostático a través de una bicapa lipídica neutra. Para este estudio se realizaron simulaciones computacionales de Dinámica Molecular con un campo de fuerzas de grano grueso (Martini).

En primer lugar, se presentan los resultados obtenidos para cada sistema compuesto por una poliarginina (R_9 ó R_8W_3), sus contraiones y la bicapa lipídica neutra, sometidos a valores de potencial electrostático crecientes, sin llegar a la electroporación de la membrana. Este primer análisis se refiere netamente al efecto del potencial electrostático sobre la energética de inserción de las poliargininas. En segundo lugar se comparan los valores de energía libre para cada potencial electrostático aplicado en función de la anfipaticidad de la molécula de péptido: R_9 que es hidrofílico versus R_8W_3 que es anfipático.

4.1. Introducción

Todas las células eucariotas mantienen un potencial transmembrana distinto de cero a través de sus membranas plasmáticas. La diferencia de potencial en estado de reposo, desde el exterior hacia el interior de la célula suele encontrarse en el rango de -10 a -100 mV.^{1,136} Su magnitud está determinada por la permeabilidad de la membrana a especies iónicas específicas a través de canales iónicos, por las distribuciones iónicas intra y extracelulares, así como por el transporte iónico activo a través de la membrana.¹³⁶

Experimentos realizados *in vitro* han demostrado que la pérdida de este potencial propio de las células reduce hasta en un 90% el ingreso de las pArg al interior celular.⁶² Este resultado pudo ser luego revertido al hiperpolarizar las células mediante el uso de valinomicina, un antibiótico que selectivamente permite el ingreso de iones potasio hacia el medio intracelular. Así, tanto estos experimentos realizados en células como aquellos hechos con vesículas artificiales,³⁷ apoyan la idea de que el potencial transmembrana favorece la internalización de las pArg. Dicha propuesta se basa en argumentos sólidos pero de naturaleza cualitativa, ya que hasta el momento no hay registros en literatura en los que se cuantifique el efecto de la diferencia de potencial electrostático a través de la membrana en la energética del proceso de traslocación de los CPPs. En este sentido, las simulaciones moleculares constituyen una herramienta ideal para abordar tales problemas, dado que proporcionan acceso directo a las propiedades termodinámicas y a la distribución promedio de carga y campo eléctrico a través del sistema.

4.2. Simulaciones computacionales con potencial transmembrana: elección de la configuración del sistema

El potencial a través de una membrana lipídica (potencial de Volta) puede ser monitoreado experimentalmente usando microelectrodos^{137,138}, o sondas fluorescentes sensibles al voltaje.¹³⁹⁻¹⁴⁴ La información sobre el potencial transmembrana obtenido del experimento tiene una resolución microscópica limitada. Por el contrario, las simulaciones computacionales como la dinámica molecular, proporcionan una imagen atomística del sistema. Hasta la fecha, existen dos métodos para modelar el potencial transmembrana en simulaciones moleculares:

el método del campo eléctrico constante^{117,145-148} y el método del desbalance iónico^{149,150}. Ambos métodos han sido utilizados con éxito para inducir un voltaje transmembrana o para estudiar el fenómeno de la electroporación.^{147,151-154}

En el método del campo eléctrico el potencial de transmembrana está representado por un campo eléctrico externo aplicado en la dirección normal a la membrana. De esta manera, tal campo actúa en cada átomo del sistema en forma proporcional a su carga parcial y a la intensidad de campo. Esta fuente de voltaje externa representa un modelo simplificado del mecanismo biológico responsable de la existencia de la potencial transmembrana en membranas celulares, esto es, bombas y canales de iones. En sistemas periódicos, comúnmente utilizados en las simulaciones moleculares, el campo eléctrico es homogéneo a lo largo de la caja de simulación.¹⁴⁵ La contribución del campo externo a la diferencia de potencial $\Delta\Phi$ a través de la membrana es entonces la intensidad de campo E_z multiplicada por el largo de la caja de simulación L_z paralela a la normal a la membrana, $\Delta\Phi = E_z \cdot L$.

En el método del desbalance iónico, utilizado en esta tesis, se introduce la caída de potencial mediante una diferencia de carga neta entre dos reservorios separados entre sí.^{149,150} La caída de potencial a través de la membrana luego depende, por un lado, de la cantidad de carga en exceso (en este caso, contraiones de las especies cargadas: pArg y lípidos aniónicos) formando el desequilibrio y, por otro lado, de la capacitancia de la membrana. Esta configuración pretende imitar la condición de estado estacionario en membranas biológicas con una distribución iónica metaestable, sin representar explícitamente la maquinaria biológica que mantiene la diferencia de potencial.

En los sistemas simulados en esta tesis el sistema quedó definido por una única bicapa en contacto con dos reservorios de solución electrolítica aislados, tal como se muestra en la Figura 4.1. Esto fue posible debido a la presencia de dos paredes blandas dispuestas en los extremos $z = 0$ y $z = L_z$. Estas paredes no son más que potenciales de repulsión de corto alcance ubicados en cada extremo z de la caja, lo cual restringió el movimiento periódico de las moléculas a las direcciones x e y . A continuación, se generaron diferentes potenciales transmembrana mediante un gradiente electroquímico a través de la bicapa, como producto del traslado de 0, 2, 4 y 8 cationes sodio del compartimento inferior al superior.

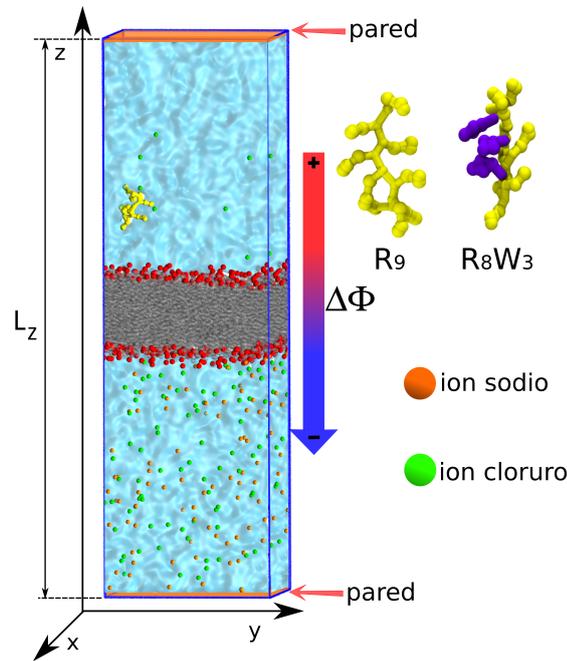


Figura 4.1 (izquierda) Esquema del sistema simulado con el campo de fuerzas de grano grueso Martini. La bicapa de DOPC (cabezas polares en rosado, colas lipídicas en verde), se localiza en el centro de la caja de simulación, dividiendo el sistema en dos compartimentos. El superior contiene agua, una única molécula de CPP y sus contraiones. El compartimento inferior contiene una solución de NaCl $\sim 180\text{mM}$. Los potenciales electrostáticos transmembrana, $\Delta\Phi$, se generaron mediante la imposición de un desbalance iónico entre los dos compartimentos (flecha vertical). Todo el sistema se encuentra confinado entre dos paredes impenetrables perpendiculares al eje z . (derecha) Representación según Martini de las especies iónicas usadas en las simulaciones: R_9 en amarillo, R_8W_3 en amarillo y violeta, cloruro en verde y sodio en naranja.

4.3. El potencial transmembrana promueve la inserción de las poliargininas en la bicapa

Los perfiles de potencial electrostático, $\Phi(z)$, se obtuvieron a partir de la densidad de carga perpendicular al plano de la bicapa $q(z)$, integrando la ecuación de Poisson:¹²⁷

$$\phi(z) = -\frac{1}{\epsilon_0} \int_0^z dz' \int_0^{z'} q(z'') dz'', \quad (4.1)$$

donde ϵ_0 es la permitividad del vacío, y las integrales se realizan desde la pared inferior (0), donde el potencial está referenciado a cero. La Figura 4.2.a muestra el resultado $\Phi(z)$ para los sistemas R_9 y R_8W_3 , calculados a partir de trayectorias de MD de 250 ns. $\Delta\Phi$ se calculó a partir de las asíntotas como se indica en dicha figura. Se estudiaron desbalances de 2 a 8 iones sodio y,

tal como se esperaba, cuanto mayor es el desbalance iónico a través de la membrana, mayor $\Delta\Phi$ (ver Figura 4.2.b). Cabe destacar que en ninguno de estos casos, el potencial electrostático resultante fue lo suficientemente grande como para electroporar espontáneamente la bicapa. Tal comportamiento es consistente con un estudio reciente¹¹⁰ que muestra que los potenciales electrostáticos como los que se muestran en la Figura 4.2, se encuentran dentro del régimen lineal, por debajo del umbral de electroporación de las membranas de PC.

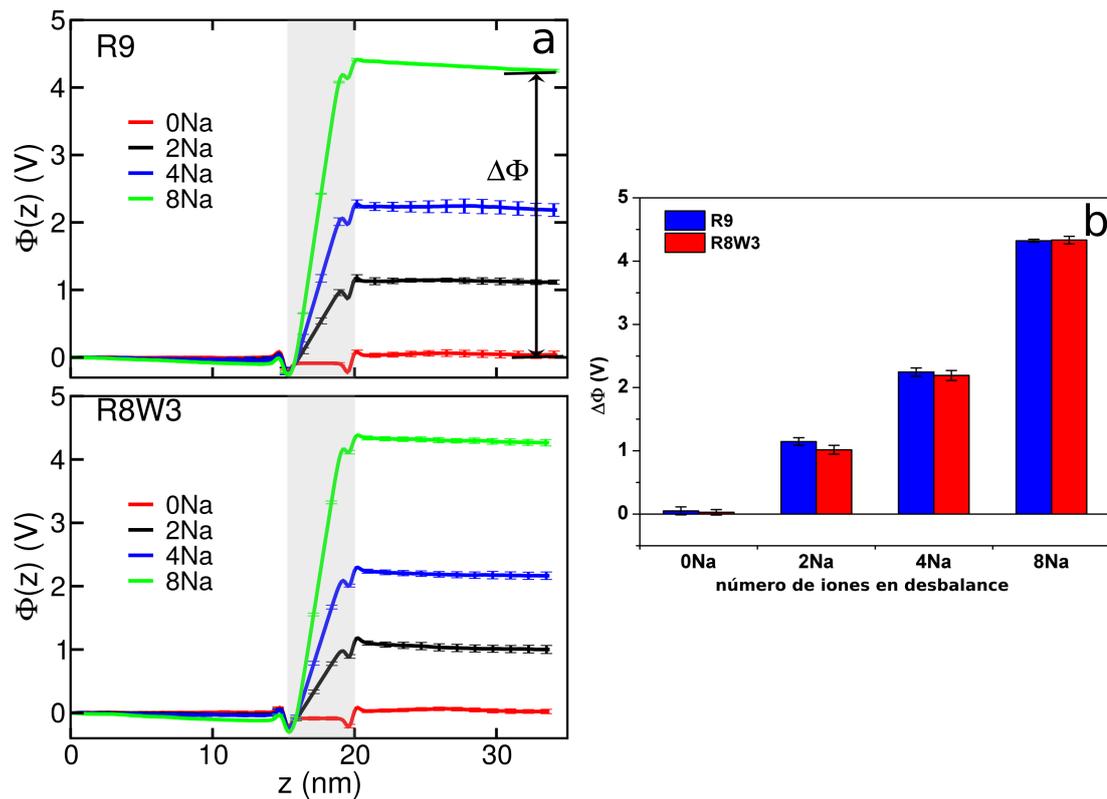


Figura 4.2 (a) Perfiles de potencial electrostático a través de la caja de simulación, $\Phi(z)$, para desbalances de 0, 2, 4 y 8 iones de sodio impuestos entre el compartimiento inferior y el superior de la Figura 4.1. El panel superior muestra $\Phi(z)$ para el sistema R9, y el inferior para R8W3. Las zonas grises resaltan la ubicación de la bicapa de DOPC. El potencial transmembrana, $\Delta\Phi$, se define como la diferencia entre el valor plateau a ambos lados de la bicapa, tal como se indica mediante la flecha vertical. (b) Diferencia de potencial electrostático ($\Delta\Phi$) para 0, 2, 4 u 8 iones sodio trasladados entre soluciones electrolíticas en contacto con la bicapa de DOPC. Las columnas azules y rojas representan los sistemas con R9 y R8W3, respectivamente. Estos valores $\Delta\Phi$ fueron obtenidos al realizar la integral doble de la ecuación de Poisson para la densidad de carga en el sistema.

Experimentalmente, la electroporación de células en suspensión se observa al aplicar potenciales transmembrana en el rango de 0,2-1,5 V, con pulsos en el orden de los microsegundos a casi un segundo.⁸⁶ Sin embargo, se sabe que el umbral de poración depende fuertemente de la composición de la bicapa, tamaño de la célula (área de la membrana), así como del método aplicado para generar el potencial transmembrana. Asimismo, en simulaciones moleculares se ha comprobado que este umbral se encuentra estrechamente relacionado al campo de fuerzas

utilizado.¹⁵⁵ Por ello, tanto los parámetros fijados por el campo de fuerzas, como la fluidez de membrana y la difusión de los lípidos que la componen, determinan el comportamiento que tendrá la bicapa ante la electroporación.

Habiendo definido las condiciones de $\Delta\Phi$ para cada uno de los dos sistemas (R_9 y R_8W_3), se procedió a analizar cuál es el efecto de esta variable sobre los costos energéticos de adsorción/inserción de cada pArg en la membrana de DOPC. Con este objetivo, se calcularon los perfiles de energía libre mediante Metadinámica (ver descripción del método en Capítulo 3, sección 2), y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.3.

En primer lugar, se puede observar que en ausencia de desbalance iónico y por tanto de diferencia de potencial de transmembrana (curvas negras), el perfil de energía libre muestra que tanto R_9 como R_8W_3 deben superar una gran barrera de energía para llegar al centro de la membrana, penalización que surge de una combinación de procesos termodinámicamente desfavorables: i) la formación de un defecto de membrana,⁸⁰ ii) la deshidratación del péptido,^{80,81} y iii) la pérdida de la atmósfera iónica del péptido con la redistribución concomitante de la carga eléctrica.

Para la bicapa considerada (DOPC), el costo de energía libre de inserción (es decir, ΔG ($z = 0$)) es significativamente mayor para R_9 ($\Delta G_{ins} \sim 350$ kJ/mol) que para R_8W_3 ($\Delta G_{ins} \sim 230$ kJ/mol). Como se discutirá más adelante, esto se puede atribuir al carácter anfipático de R_8W_3 , que también es responsable de la aparición de un pequeño mínimo en su perfil cuando $z \sim 2,5$ nm ($\Delta G_{ads} \sim -20$ kJ / mol). Por el contrario, R_9 no muestra tendencia espontánea a adsorberse a la interfase lípido/agua, lo cual es consistente con la observación experimental de que los CPP ricos en arginina se unen débilmente a membranas neutras.^{59,156}

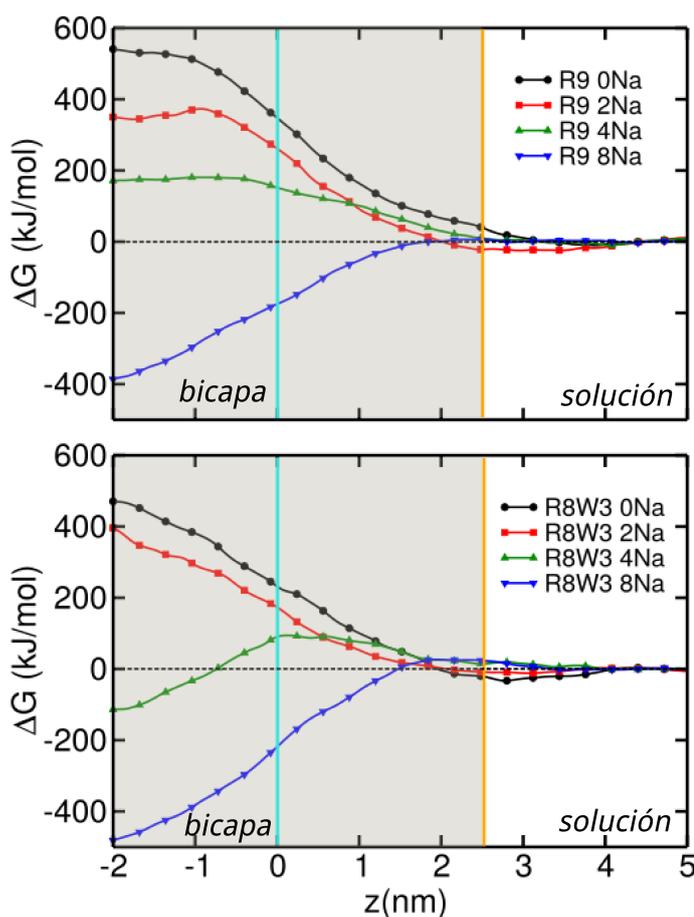


Figura 4.3 Perfiles de energía, $\Delta G(z)$, para la inserción de una molécula de R_9 (arriba) o de R_8W_3 (abajo), en una bicapa de DOPC. Cada curva se corresponde con un desbalance iónico de 0, 2, 4 y 8 iones de sodio entre las soluciones que rodean a la membrana. Las líneas verticales color cian y naranja muestran la ubicación del centro y de la superficie de la bicapa, respectivamente. En color gris, se demarca la zona de los perfiles que corresponden al interior de la bicapa. Los perfiles se refieren a cero en el centro de la solución que inicialmente contiene al CPP.

Se puede afirmar que el aumento del potencial transmembrana tiene un efecto dramático en los perfiles de energía libre de inserción de ambos péptidos. Mayores $\Delta\Phi$ facilitan la penetración de la bicapa e incluso llegan a producir un proceso sin barrera tras superar un umbral de voltaje. Los valores específicos de ΔG_{ins} para cada péptido bajo su respectiva condición de desbalance iónico se recopilan en la Tabla 4.1. Las tendencias en ΔG_{ins} son cualitativamente similares para R_9 y R_8W_3 , con la salvedad de que el último muestra energías de inserción sistemáticamente menores. La relevancia de estos resultados yace en que, hasta donde sabemos, no hay cálculos publicados de perfiles de inserción en presencia de potencial transmembrana.

<i>Desbalance iónico</i> (iones Na^+ / $[Na^+]$)	ΔG_{ins} (kJ/mol)		ΔG_{ads} (kJ/mol)	
	R ₉	R ₈ W ₃	R ₉	R ₈ W ₃
0 (0 mM)	348	232	39	-21
2 (2,1 mM)	261	174	-22	-9
4 (4,3 mM)	152	90	9	14
8 (8,7 mM)	-175	-219	6	23

Tabla 4.1 Energías de adsorción e inserción (kJ/mol) calculadas para R₉ (columnas grises) y R₈W₃ (columnas blancas).

Otro aspecto importante del proceso de traslocación del CPP es el mecanismo por el cual estas moléculas atraviesan el núcleo hidrofóbico de la membrana. Como ya se mencionó anteriormente, se proponen cuatro modelos principales para el pasaje de estos péptidos: poro hidrofílico, poro hidrofóbico (modelo de barril), modelo de alfombra, y la formación de un complejo péptido-lípido en el modelo de traslocación adaptativa⁶⁸ (ver Figura 1.8). Al respecto, en las simulaciones realizadas, ambos péptidos forman poros hidrofílicos de geometría toroidal al llegar al centro de la bicapa, como se ilustra en la Figura 4.4, y también ha sido informado en la literatura para transporte de CPPs en ausencia de potencial transmembrana.^{94,157} Cabe destacar que, debido al campo de fuerzas de grano grueso, no pueden descartarse otros mecanismos de traslocación tales como la traslocación adaptativa (no se podría evidenciar la formación de complejos).

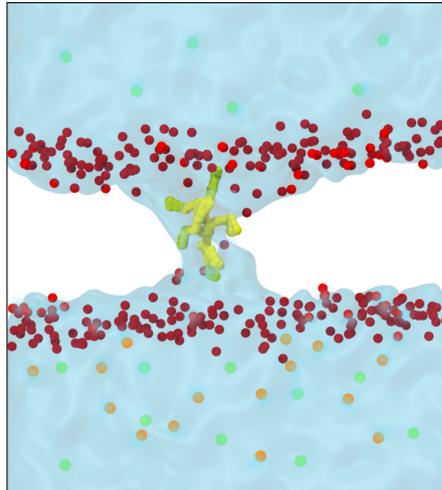


Figura 4.4 Configuración instantánea que muestra R_9 en el centro de la bicapa. Nótese que el CPP induce la formación de un poro hidrofílico con geometría toroidal. El borde del poro, definido por las cabezas polares de DOPC (esferas rojas), se une firmemente al péptido dejando sus contraiones afuera del poro. Las esferas en verde y naranja representan a los iones Cl^- y Na^+ , respectivamente. Para mayor claridad, las colas hidrocarbonadas de los lípidos no fueron incluidas en la figura.

Es preciso señalar que si bien la geometría del defecto de membrana generado por estos péptidos es bastante similar, la configuración adoptada por R_8W_3 dentro del poro favorece la inserción de la porción hidrofóbica de los triptófanos en el núcleo de la bicapa (ver Figura 4.5.b). Tal efecto estabiliza el poro y disminuye la energía de inserción. También se adopta una disposición similar cuando el péptido yace paralelo a la superficie de la membrana, y es responsable de la energía de adsorción ligeramente negativa de R_8W_3 frente a DOPC (ver Figura 4.5.a). Estas observaciones están en línea con varios estudios experimentales que demuestran que la presencia de residuos de triptófano en CPPs mejora su eficiencia de penetración en membranas.^{33,158–160}

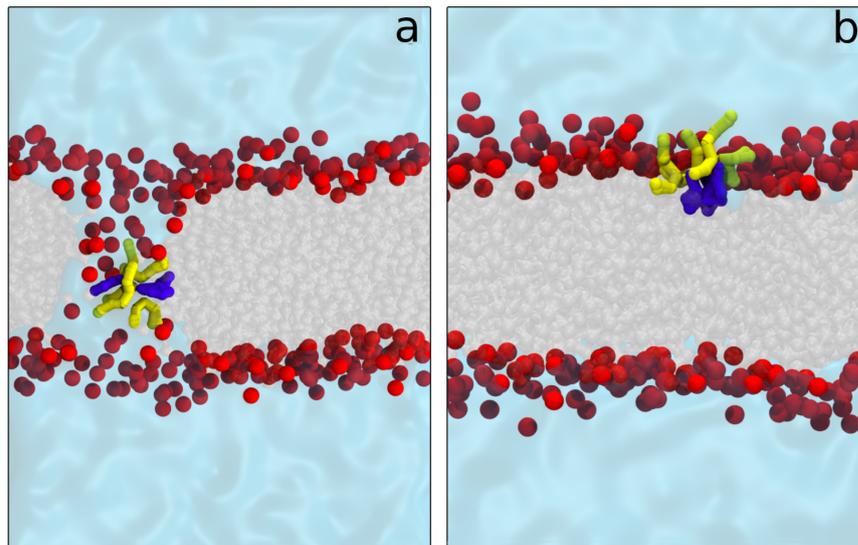


Figura 4.5 Configuración instantánea mostrando a R_8W_3 (a) dentro del poro hidrofílico, y (b) en la interfase. Nótese que en (b) cuando el péptido entra en contacto con la membrana, inserta sus residuos de triptófano (violeta) en el núcleo hidrofóbico de la membrana.

Por último, es importante resaltar que el péptido se mantiene unido al borde del poro, formado por las cabezas hidrofílicas de DOPC, dejando la mayor parte de sus contraiones en solución. En otras palabras, los poros no son eléctricamente neutros incluso con el mayor desbalance iónico aplicado.

4.4. Correlación entre el potencial transmembrana y la posición del péptido

En paralelo con el cálculo de curvas de energía libre, se evaluó cómo la posición del CPP a lo largo de la coordenada de reacción afectó a $\Delta\Phi$. Esto se logró seleccionando dos muestras de configuraciones de las simulaciones metadinámicas, cada una de varios μs . En la primera muestra, el péptido siempre se mantuvo lejos de la superficie de la membrana, por lo que la posición z de su centro de masa satisface la condición $z_{cm} > 2,5$ nm, sin poro en la bicapa. En la segunda muestra, el péptido estaba siempre cerca del centro de la bicapa ($|z_{cm}| < 2$ nm), habiendo nucleado y ocupado un poro hidrofílico. La ecuación 4.1 se usó para calcular $\Phi(z)$ de cada muestra, y el correspondiente $\Delta\Phi$ se obtuvo a partir de la diferencia entre los valores asintóticos de $\Phi(z)$ cerca las paredes (Figura 4.2).

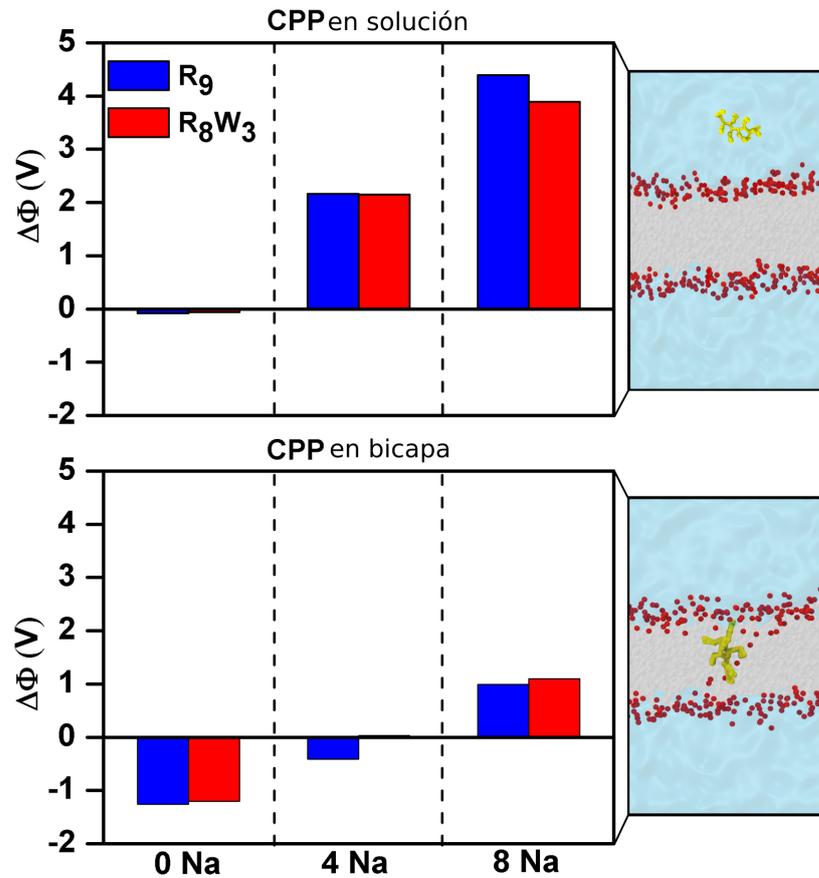


Figura 4.6 Diferencia de potencial electrostático a través de la membrana $\Delta\Phi$, cuando el CPP se encuentra en la solución (panel superior), o dentro de la bicapa (panel inferior). Las barras azules corresponden a R₉, las barras rojas a R₈W₃. Las etiquetas en las columnas indican el número de iones Na⁺ que generan el desbalance iónico a través de la membrana.

Como se puede ver en la figura 4.6, $\Delta\Phi$ (potencial transmembrana) cambia a medida que el péptido se mueve hacia el centro de la membrana, de una manera fuertemente dependiente del desbalance iónico. Como se declaró en la sección anterior, el CPP pierde la mayor parte de su atmósfera iónica al viajar a través de la membrana, lo que genera un campo interno que tiende a restaurar la electroneutralidad del compartimiento superior. Si se toma en consideración el caso de R₉ sin desbalance iónico inicial, se puede observar en la primera columna de la Figura 4.6 que $\Delta\Phi \sim 0$ V cuando el péptido está en solución y que cambia a -1,2 V cuando el péptido alcanza el centro de la bicapa. En este caso, nueve cargas positivas han sido segregadas físicamente de sus contraiones, que prefieren permanecer en solución. Algo similar sucede con R₈W₃, pero aquí el cambio en $\Delta\Phi$ es algo menor dado que la carga formal del péptido es +8 en lugar de +9.

Si se considera nuevamente el caso de R₉, pero ahora cuando el desbalance de carga

impuesto entre los compartimentos es de 4 Na^+ . $\Delta\Phi \sim 2\text{V}$ cuando el péptido está en solución, pero $\sim -0,5 \text{ V}$ al llegar al centro de la membrana. Como en el ejemplo anterior, el $\Delta\Phi$ resultante produce una fuerza restauradora que se opone a la translocación del péptido, efecto que contribuye a la pendiente positiva del perfil de energía libre correspondiente en la Figura 4.3. Para un desbalance de carga de 8 Na^+ , la disminución en $\Delta\Phi$ es de alrededor de $\sim 3,5 \text{ V}$, lo cual no es suficientemente grande como para compensar el potencial electrostático originalmente establecido ($\sim 4 \text{ V}$). Esto es denotado por la pendiente negativa del perfil de energía, que empuja al CPP a través de la bicapa. Se debe tener en cuenta que en este caso extremo, el proceso de translocación deja de tener barrera de activación.

En general, el potencial transmembrana cambia continuamente ya que el péptido se mueve a lo largo de la coordenada de reacción, y esto se encuentra contemplado en el perfil de energía resultante. La influencia de una distribución asimétrica de campos internos sobre la traslocación de un CPP dependerá de una serie de factores, tales como: la asimetría en la composición de las hemicapas de la membrana, la presencia de dispositivos capaces de mantener un potencial transmembrana constante (bombas transportadoras de iones o electrodos externos), y el flujo iónico a través de la membrana en relación con la eficiencia de restauración de tales dispositivos. En este sentido, por ejemplo, la energética de translocación de un CPP a través de la membrana de células vivas, puede no ser exactamente comparable a la de las vesículas artificiales neutras.

Se finaliza esta sección recordando la importancia tanto del protocolo de simulación, como de la necesidad de una consideración cuidadosa de las condiciones de contorno. En ausencia de paredes que restrinjan el sistema, tales como las representadas en la Figura 4.1, o si las condiciones periódicas de contorno se aplican también en dirección perpendicular a la membrana, no sería factible mantener un desbalance de carga a través de la bicapa. En tal caso, el campo eléctrico compensador derivado de la exclusión de los contraiones también se vería afectado por las condiciones periódicas de contorno y el perfil de energía libre resultante sería simétrico con respecto al centro de una bicapa químicamente simétrica. Por el contrario, el estudio reportado en la referencia¹⁶¹ es un buen ejemplo de cómo una asimetría química en la bicapa facilita la traslocación de una pArg. Li et al. realizaron simulaciones DM de grano grueso para sistemas que contienen entre una y seis moléculas de R_9 en contacto con una bicapa compuesta por DOPC y DOPS. Los autores observaron que al superar cierto umbral

de concentración de péptido, los mismos atravesaron espontáneamente la membrana. Esto fue interpretado como un efecto CPP, pero el presente trabajo de tesis arroja otra explicación sobre dichos resultados. Para mantener el sistema electroneutral, la carga catiónica de los péptidos fue compensada con moléculas de DOPS cargadas negativamente, en lugar de utilizar contraiones hidrosolubles. De este modo, la concentración creciente de CPP fue acompañada por una concentración creciente de lípidos aniónicos, los que además fueron sistemáticamente colocados en la hemicapa distal de la membrana, generando un gran potencial transmembrana. En otras palabras, al aumentar el número de moléculas de R₉ agregadas al sistema, aumentó el desbalance de cargas a través de la membrana así como el $\Delta\Phi$ nominal, y en base a los resultados presentados en este capítulo esto explica, en contraposición a lo propuesto por Li *et al.*, la supuesta dependencia en la concentración de la velocidad de translocación de las pArg.

4.5. La anfipaticidad del péptido y el potencial superficial favorecen la incorporación de los CPPs en monocapas de Langmuir

En las secciones previas, se evaluó el efecto del potencial transmembrana entre las dos soluciones electrolíticas, generado por diferencia iónica. Experimentalmente, en monocapas, se mide el potencial superficial mediante el uso de electrodos y equivale a la diferencia de potencial que existe entre la solución y la sección hidrofóbica de la membrana. En bicapas, el potencial superficial puede ser medido mediante el uso de fluoróforos, pero de una manera más indirecta.¹³⁹

Para probar por medios experimentales si la electrostática interfacial modula la inserción de pArg en la estructura lipídica, se examinó la interacción de un CPP hidrofílico y otro anfipático con diferentes monocapas de Langmuir (LMs). Este modelo representa una de las hemicapas de la membrana, permitiendo investigar la primera etapa en la interacción péptido-membrana y la incorporación del CPP en la hemicapa externa de la membrana.^{128,162–164} Asimismo, el potencial superficial de la monocapa se puede ajustar mediante el uso de anfifilos con diferentes valores de momento dipolar molecular, lo que permite detectar efectos electrostáticos en el proceso de inserción de péptidos mientras se monitorea la presión lateral de la monocapa, o el grado de compactación de los lípidos.

En particular, se estudió la interacción de KR₉C (péptido hidrofílico con diez cargas positivas al pH utilizado), y KR₈W₃C (péptido anfipático con 9 cargas positivas) con monocapas de DOPC (lípidos zwitteriónicos), DMPG (lípidos aniónicos), ácido mirístico (MA), o ácido mirístico perfluorado (PFTD). DOPC fue seleccionado con el objetivo de procurar una comparación más directa con las tendencias observadas en las simulaciones presentadas en las secciones previas. El compuesto perfluorado permite invertir el potencial superficial con respecto a los otros lípidos: en subfase acuosa, las monocapas de DOPC, MA o DMPG, muestran potenciales dipolares positivos,¹⁶⁵ mientras que el potencial superficial de PFTD es negativo (-1V).¹⁶⁶ Finalmente, DMPG fue considerado con el objetivo de incluir un lípido cargado negativamente (tal como PFTD), mientras que MA representa un lípido con el mismo grupo polar que PFTD (ácido carboxílico), pero con potencial superficial opuesto (ver Figura 1.4).

La interacción péptido-lípido se investigó mediante estudios de penetración a monocapas.^{163,164} En estos experimentos, las monocapas son preparadas y estabilizadas a una presión superficial determinada, Π_0 , el péptido se agrega luego a la subfase, determinándose el cambio en presión debido al agregado de péptido, $\Delta\Pi = \Pi_f - \Pi_0$. En general, se observó un aumento gradual de la presión superficial hasta que se llegó a una meseta o *plateau*, que fue tomada como la presión superficial final Π_f . Tal aumento en la presión superficial refleja el grado de penetración del CPP en la monocapa de surfactante. En la sección 3, Figura 3.5, se muestra una curva de penetración representativa para el sistema KR₈W₃C en PFTD.

En primer lugar se realizó un análisis de la respuesta concentración-dependiente en una monocapa de PFTD, inicialmente estabilizada a 30 mN/m. La Figura 4.7 muestra la presión superficial final alcanzada tras agregar cantidades crecientes del CPP bajo dicha monocapa. Esta figura indica que la incorporación del CPP satura a concentraciones que dependen de las características del péptido: el *plateau* en el gráfico concentración-respuesta se produce a 5 μM para KR₈W₃C, y al doble de esta concentración para KR₉C. Este resultado apoya la afirmación de que los residuos de triptófano fomentan la interacción de pArg con agregados lipídicos 2D, como se observa en nuestras simulaciones y en publicaciones previas.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

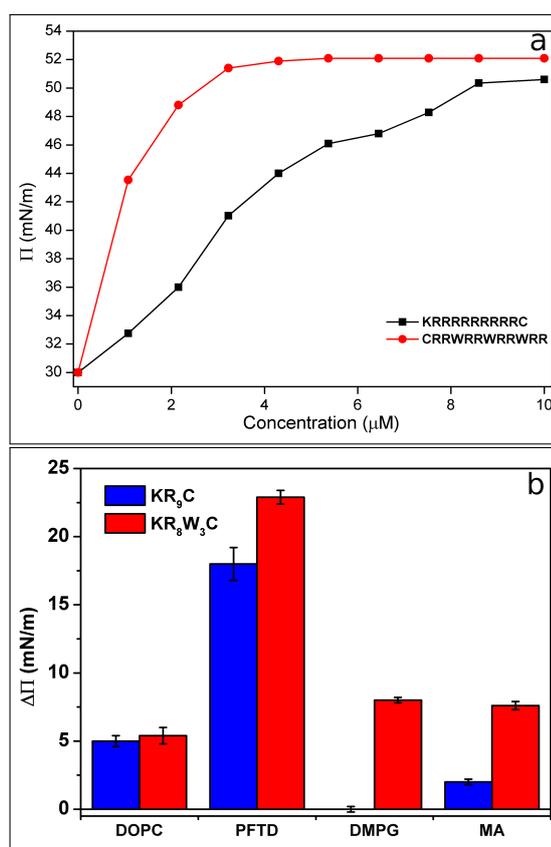


Figura 4.7 (a) Curva concentración-respuesta para KR_9C (curva negra) y KR_8W_3C (curva roja) interactuando con una monocapa de PFTD, a $\Pi_0 = 10$ mN/m. (b) Cambios en la presión superficial, $\Delta\Pi$, en monocapas de Langmuir compuestas por DOPC, PFTD, DMPG y MA ($\Pi_0 = 10$ mN/m), luego de agregar KR_9C (columnas azules) y KR_8W_3C (columnas rojas) a la subfase acuosa cuya concentración es de 150 mM NaCl (pH=5).

Todos los experimentos posteriores se realizaron utilizando concentraciones finales de saturación de 5 μM para KR_8W_3C y 10 μM para KR_9C , y una presión superficial inicial de 10 mN/m. Se eligió este valor bajo de presión superficial para lograr comparar el comportamiento de todas las monocapas en condiciones similares, visto que MA no formó monocapas estables a 30 mN/m (ver isothermas en Figura 5.1 en Capítulo 5). La Figura 4.7.b muestra el $\Delta\Pi$ resultante para cada monocapa después de la inyección del CPP respectivo. Claramente, KR_8W_3C condujo a un cambio mayor en la presión superficial de todas las monocapas, a pesar de la mayor concentración de KR_9C en la fase acuosa. Por otra parte, ambas pArg produjeron un $\Delta\Pi$ de aproximadamente 4 veces más grande para PFTD (potencial dipolar negativo) que para DOPC (potencial dipolar positivo), lo cual sugiere que el potencial dipolar de los lípidos tiene un efecto notable sobre la incorporación de los péptidos en la estructura lipídica. Sin embargo, PFTD es una anfifilo aniónico mientras que DOPC es neutro, lo cual señala a la carga superficial como un parámetro a ser considerado en el presente análisis. La comparación entre DOPC y DMPG

(un lípido aniónico) sería una buena ilustración en ese sentido: la presencia del grupo aniónico produjo un ligero aumento en la incorporación de KR_8W_3C , mientras que para KR_9C se detectó una disminución sustancial, indicio de que la carga superficial no es el principal ni el único factor para determinar la cantidad de péptido incorporado en PFTD en comparación con DOPC. También se debe tener en cuenta que el $\Delta\Pi$ insignificante observado en el sistema DMPG- KR_9C no implicó una falta de adsorción de CPP, sino únicamente un bajo nivel de péptido incorporado en la monocapa. Al respecto, se discuten más detalles en el próximo capítulo.

Como se indicó anteriormente, se ha propuesto a los ácidos carboxílicos como moduladores de la inserción de CPPs en biomembranas.⁶⁴ El grupo carboxilato es la cabeza polar de PFTD pero está ausente en DOPC, por lo que este grupo podría ser responsable de las diferencias en la afinidad de inserción del CPP medida para estos dos lípidos. Tal posibilidad se puede probar comparando el $\Delta\Pi$ medido para DOPC y MA. Nuevamente, se observó un ligero aumento para la incorporación de KR_8W_3C en la monocapa MA y una disminución en la incorporación de KR_9C . Por lo tanto, concluimos que el potencial dipolar negativo, considerable en magnitud, de PFTD promueve la inserción del CPP en estas monocapas de una forma mucho más notable que en el resto de las monocapas. Este efecto se estudió en mayor profundidad para KR_9C a diferentes presiones iniciales y condiciones de pH, así como con otros ácidos grasos. Los resultados se discuten en el capítulo posterior.

4.6. Conclusiones parciales

A la luz de la discusión anterior, se puede recapitular el efecto de $\Delta\Phi$ de la siguiente manera. El desequilibrio de carga a través de la membrana genera un campo eléctrico que empuja el CPP hacia la bicapa, a la vez que reduce la barrera de activación para la formación de un poro transmembrana. Los dos efectos están entrelazados, y cuanto mayor es la diferencia de potencial, menor es la barrera de activación, para ambas pArg. Sin embargo, se observó que el péptido anfipático R_8W_3 presentó menor costo energético de inserción que el péptido hidrofílico R_9 , para todos los potenciales transmembrana evaluados.

Por otro lado, los poros que se generaron son hidrofílicos, para ambas pArg, y las mismas permanecieron sólo parcialmente hidratadas al llegar al centro de la membrana. La

deshidratación del CPP es energéticamente desfavorable y no parece verse afectado por $\Delta\Phi$. A medida que las pArg se movieron a través de la membrana, sus contraiones permanecieron en solución y la redistribución concomitante de la carga produjo un campo interno que contrarrestó la diferencia de potencial inicial, es decir, aquel que se estableció cuando el CPP se encontraba en solución. La aparición de este campo compensador explica la asimetría del perfil con respecto al centro de la membrana ($z = 0$, ver Figura 4.3).

En cuanto a los experimentos en monocapa, se demostró que el péptido anfipático ($\text{KR}_8\text{W}_3\text{C}$) satura a concentraciones más bajas, generando un mayor cambio en presión que el péptido hidrofílico, en todas las monocapas lipídicas estudiadas. Al mismo tiempo, el potencial dipolar negativo de la monocapa de PFTD pareció favorecer la incorporación de ambas pArg en las monocapas de Langmuir, confirmando que la electrostática interfacial modula la penetración de CPPs en estructuras lipídicas.

Capítulo 5

Efecto del grupo carboxílico y del potencial superficial sobre la incorporación de KR₉C en monocapas de ácidos grasos

Resumen

En este capítulo se profundizó sobre el efecto de la electrostática interfacial en la incorporación de la pArg KR₉C a monocapas de ácidos grasos. De esta manera, se puso a prueba la hipótesis respecto a la relevancia del grupo carboxílico y su grado de ionización, sobre la adsorción/inserción de la pArg en la monocapa lipídica. Asimismo se evaluó cuál es el efecto del potencial superficial de estas monocapas sobre la incorporación de KR₉C.

Se analizó la cinética de incorporación del péptido a la monocapa, poniendo de relieve la influencia del largo de cadena hidrocarbonada de los distintos ácidos grasos, sobre el proceso de inserción de la pArg. Más aún, se investigó la relación entre las propiedades elásticas de cada monocapa y su respuesta ante la inserción del péptido.

5.1. Introducción

En un estudio reciente, se reportó la formación de un complejo pH-dependiente entre una pArg (TAT) y ácidos grasos (ácido oleico), en un sistema bifásico octanol/agua. Estos resultados respaldaron la hipótesis de que los ácidos grasos podrían jugar un rol clave en el mecanismo de translocación directa de los CPPs.¹⁶⁷ Además, Herce *et al.* demostraron que las diferentes condiciones de pH existentes en ambos lados de membranas celulares enriquecidas en ácidos grasos, regulan la unión e internalización de pArg, lo que sugiere que también se puede formar una estructura ácido graso-péptido cuando el ácido graso se encuentra estructurado en bicapas lipídicas.

Teniendo en cuenta esta hipótesis y retomando el efecto del potencial transmembrana estudiado en el Capítulo anterior, el objetivo de este capítulo fue analizar el posible papel regulador de los ácidos grasos, específicamente, de su grupo carboxílico y del potencial superficial al conformar monocapas, sobre el proceso de adsorción/inserción de las pArg en las membranas. Con este propósito, se estudió la capacidad de penetración del péptido hidrofílico KR₉C en monocapas de Langmuir (ML) compuestas por lípidos que presentaban diferentes grupos polares y valores de potencial superficial. Respecto a este último, se sabe que depende directamente de la composición de la cadena acilo, así como del grupo polar y de su grado de ionización.^{128,168}

En particular, se utilizaron ácidos grasos hidrogenados y fluorados para evaluar la influencia de dos valores opuestos de potencial superficial en la incorporación de la pArg a ML y la cinética asociada a este proceso. Además, para adquirir una visión más profunda del efecto del grupo polar aniónico sobre la unión e incorporación de pArg, se varió el pH de la subfase y se comparó la incorporación de los péptidos a ML de ácidos grasos neutros o ionizados con respecto a monocapas aniónicas de fosfatidilglicerol.

5.2. Efecto del pH y del potencial superficial sobre la incorporación del péptido en monocapas de ácidos grasos

Se utilizaron dos ácidos grasos cuya cadena acilo fue de 14 carbonos de largo: el ácido mirístico (MA) y el ácido perfluorotetradecanoico (PFTD). La diferencia estructural entre estas moléculas está dada por la sustitución de los átomos de hidrógeno por átomos de flúor en la molécula de PFTD. Así, la fórmula condensada para MA es $\text{H}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$, mientras que para PFTD es $\text{F}(\text{CF}_2)_{13}\text{COOH}$. Esta característica de la estructura molecular del PFTD determina la presencia de potenciales superficiales negativos al formar monocapas, así como un pK_a de ~ 2 .¹⁶⁹ Comparativamente, el pK_a de un ácido carboxílico soluble se encuentra en el rango de 4 a 5, dependiendo de la longitud de la cadena hidrocarbonada. Para los ácidos grasos, se ha informado un valor cercano a 4,8⁴⁰. Sin embargo, cuando las moléculas forman arreglos supramoleculares, el pK_a se desplaza hacia la neutralidad debido a las interacciones intermoleculares; por ejemplo, se ha informado un cambio a 5,6 en el caso del ácido esteárico¹⁷⁰. Además, el pH cerca de una superficie cargada negativamente es usualmente más bajo que en solución⁴⁰, especialmente a baja fuerza iónica¹⁷¹, cambiando aún más el valor de pK_a aparente. En este sentido, se ha informado un valor de pK_a aparente de 7,6 para las monocapas de ácido esteárico a baja fuerza iónica (~ 10 mM),¹⁷² siendo este efecto menos marcado a medida que aumenta la fuerza iónica así como el área molecular promedio.¹⁷³

Teniendo en cuenta los pK_a de los ácidos grasos, se decidió estudiar las monocapas bajo tres condiciones de pH: 3, 5 y 8. De esta manera, se obtuvieron monocapas de ácidos grasos con distintos grados de ionización. En primer lugar, se caracterizaron las monocapas de lípido puro mediante isotermas de compresión (presión superficial y potencial superficial respecto al área molecular promedio), las cuales se presentan en la Figura 5.1 para cada condición de pH. Como fue descrito en el Capítulo 3, la medición del potencial superficial para las isotermas de compresión fue realizada mediante el método de la placa vibrante. Dado que MA no formó monocapas estables a pH 8, se utilizó un ácido graso de 16 carbonos (ácido palmítico, PA) que sí se mantuvo en la interfase agua/aire. Tal como se explica más adelante, en el caso de MA y PA los resultados no parecen depender del largo de la cadena.

En la Figura 5.1.a se puede observar que a medida que el área molecular promedio

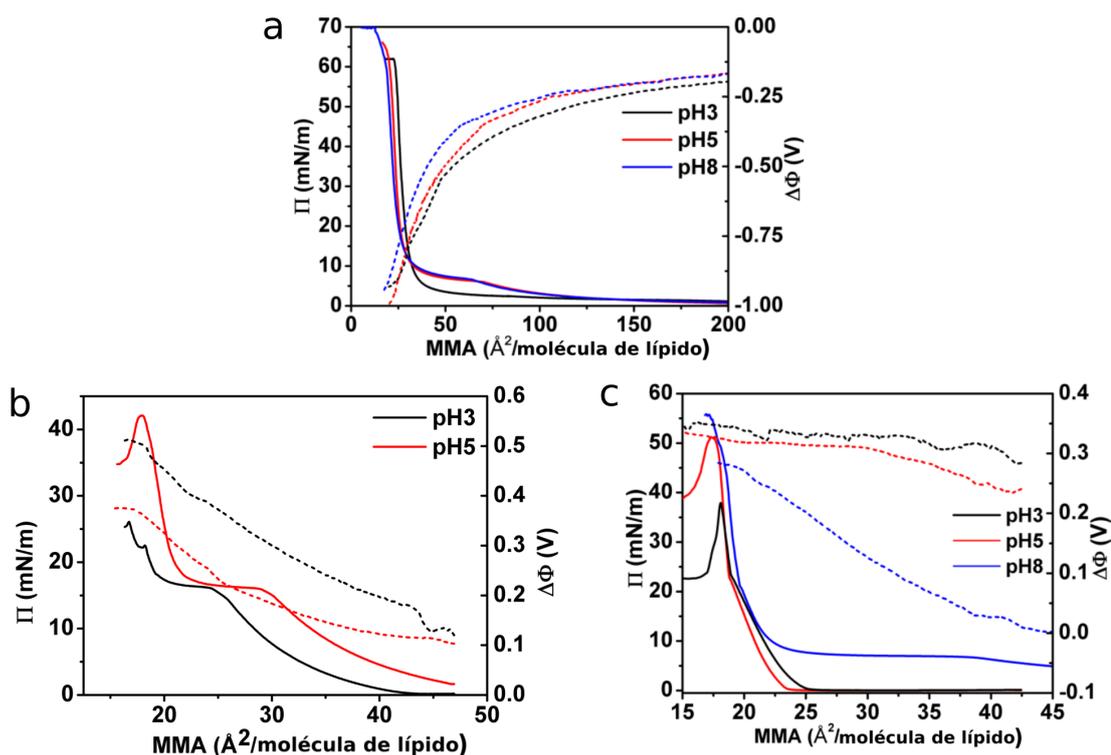


Figura 5.1 Isotermas de compresión (líneas continuas) y potencial superficial (líneas punteadas) en función del área molecular promedio (MMA, por sus siglas en inglés), cuya subfase fue NaCl 150 mM, a pH 3 (negro), 5 (rojo) y 8 (azul), para (a) ácido perfluorotetradecanoico (PFTD), (b) ácido mirístico (MA) y (c) ácido palmítico (PA). La temperatura se controló en todos los experimentos para que fuera $T = 25^\circ\text{C}$.

(MMA, por sus siglas en inglés) disminuye -eje x -, la presión superficial (línea sólida) aumenta -eje y izquierdo-, mientras que el potencial superficial (líneas punteadas) se hace más negativo -eje y derecho-. De forma opuesta, los ácidos grasos hidrogenados (Figura 5.1.b y Figura 5.1.c) muestran potenciales superficiales positivos al compactar las monocapas.

A continuación se procedió a analizar el efecto de la presión superficial inicial (o compactación inicial) de la monocapa sobre la incorporación de KR₉C. Para ello, se formaron monocapas de cada uno de estos lípidos en la interfase agua/aire, a diferentes valores de presión superficial inicial (Π_0), y tras lograrse una monocapa estable con presión superficial constante, el péptido se inyectó en la subfase en una concentración final de $10 \mu\text{M}$ (concentración de saturación para KR₉C). Se registró la evolución de la presión superficial tras la inyección y se determinó el valor final, Π_f , al alcanzar el *plateau*. A modo ilustrativo, en la Figura 5.2 se muestran dos curvas de penetración para valores de Π_0 de 20 y 30 mN/m, donde se grafica el cambio en la presión superficial ($\Delta\Pi$). Un aumento en este valor es indicativo de que el péptido está interaccionando con la monocapa y afectando la presión superficial. Si el cambio es grande, como los mostrados en la Figura 5.2, se asume que el péptido se incorporó.^{174,175}, llevando a

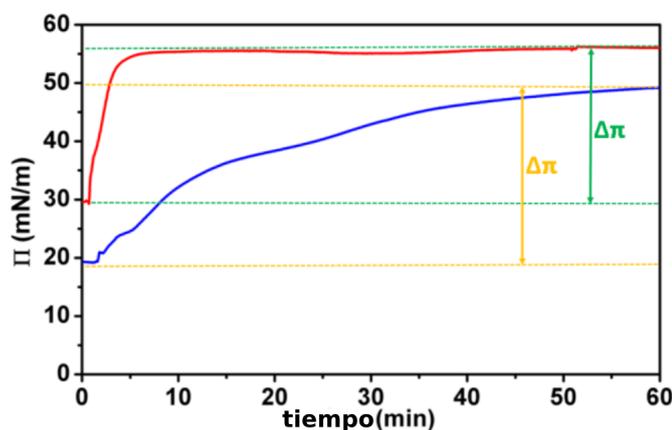


Figura 5.2 Curvas de penetración de KR₉C en monocapas de PFTD a dos Π_0 distintas: 20 mN/m (curva azul) y 30 mN/m (curva roja). La flecha vertical verde representa la diferencia de presión $\Delta\Pi$ entre la condición inicial $-\Pi_0 = 20$ mN/m- y el valor de Π plateau. De la misma manera, la flecha vertical naranja indica el $\Delta\Pi$ alcanzado por KR₉C para una condición inicial de presión superficial $\Pi_0 = 30$ mN/m.

una compresión de la monocapa de lípidos. Es importante mencionar que en ausencia de una monocapa (adsorción a una interfase limpia), el péptido no actuó como tensioactivo, es decir, la presión superficial permaneció nula durante, por lo menos, 1 hora.

La Figura 5.3 muestra la variación de $\Delta\Pi$ en función de la presión superficial inicial Π_0 . En la Figura 5.3.a, se presentan los resultados obtenidos para las monocapas de ácidos grasos hidrogenados (MA y PA). A pH 5 y 8, se detectó un aumento en la presión superficial al añadir KR₉C a la subfase, mientras que a pH 3 la presión superficial permaneció constante o incluso se observó una disminución. Esto último puede ser una consecuencia de la inestabilidad de la monocapa lipídica, con el concomitante escape de las moléculas a la subfase.

El hecho de que la incorporación del péptido dependa del pH, probablemente está relacionado con el grado de ionización del grupo ácido carboxílico de los ácidos grasos. A la concentración de sal empleada, se espera que los ácidos grasos hidrogenados presenten un cambio en el grado de ionización desde valores cercanos a cero a pH 3, hasta valores cercanos al 100% a pH 8, pasando por valores que rondan el 50% a pH 5. Por lo tanto, la tendencia de incorporación del péptido catiónico al aumentar el pH puede ser explicado considerando que el mismo penetra principalmente en monocapas cargadas. Se debe agregar, sin embargo, que el mayor $\Delta\Pi$ se obtuvo con un ácido graso diferente (PA en lugar de MA). No obstante, este cambio en la cadena del ácido graso no causa un efecto relevante a pH 3 y 5 (que es a los pH en que ambos ácidos grasos forman monocapas estables), como se puede observar en la Figura 5.3.b. En esta figura, se traza el cambio $\Delta\Pi$ (para $\Pi_0 = 10$ mN/m) como una función del

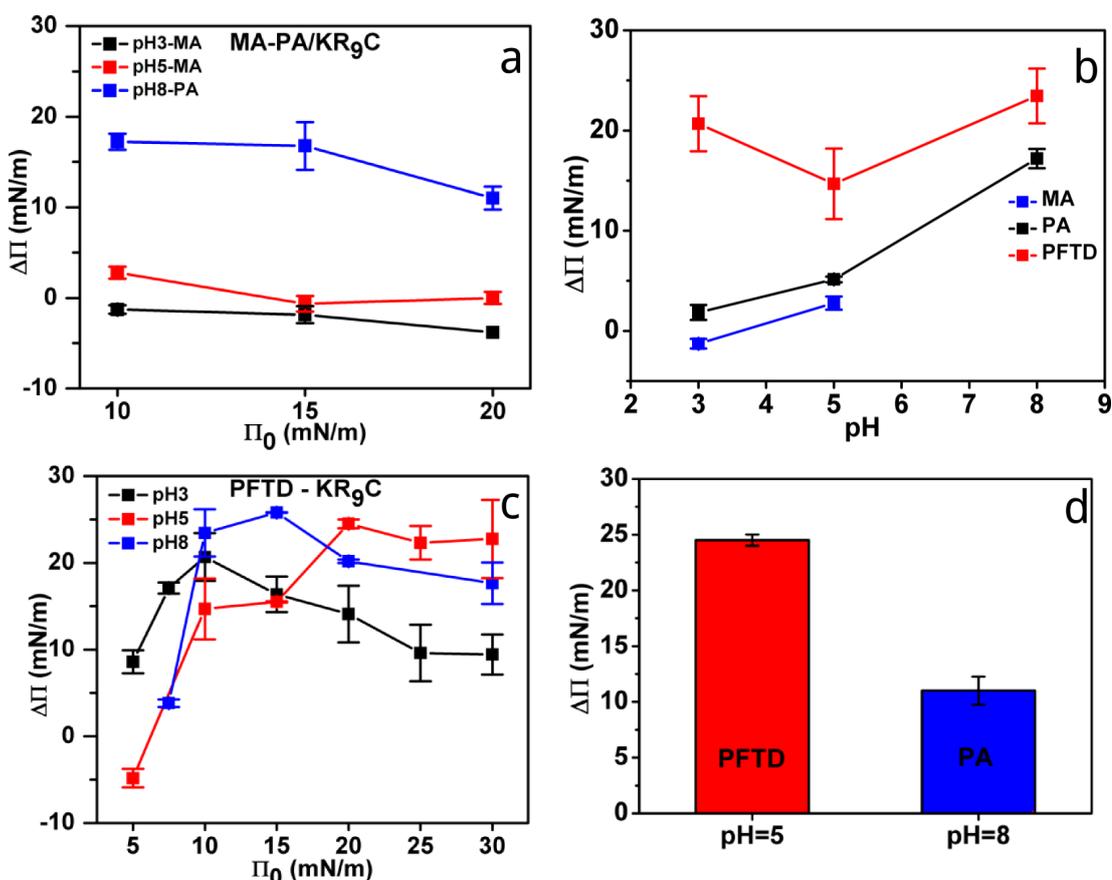


Figura 5.3 (a) $\Delta\Pi$ vs Π_0 para MA (pH 3 y 5) o PA (pH 8). (b) $\Delta\Pi$ vs pH para el ácido mirístico (azul), ácido palmítico (negro) y el ácido perfluorotetradecanoico (rojo), a $\Pi_0 = 10$ mN/m. (c) $\Delta\Pi$ vs Π_0 para PFTD. (d) $\Delta\Pi$ generado tras inyectar KR₉C en la subfase de monocapas de PFTD (rojo) y PA (azul), a $\Pi_0 = 20$ mN/m. Los valores presentados son el valor promedio de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar. $T = 25^\circ\text{C}$.

pH, donde se puede apreciar un incremento de 12 mN/m en $\Delta\Pi$ promovido por el péptido, en monocapas de PA cuando el pH se cambia de 5 a 8.

Con respecto al comportamiento de $\Delta\Pi$ al aumentar Π_0 (Figura 5.3.a), se observó una ligera disminución, lo que sugiere una dependencia muy sutil de la incorporación del péptido en el grado de compactación de la monocapa, contrariamente a la marcada pendiente comúnmente observada en otros sistemas¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. El valor de *cutoff* (Π_0 extrapolado para el cual $\Delta\Pi$ es cero) es mayor que la presión de colapso del ácido graso, lo cual advierte que si los ácidos grasos se mantienen en la interfase de membranas mezcla debido a una estabilización por interacción con otros lípidos, el péptido podría penetrar en las monocapas a presiones altas en las que la monocapa tiene una densidad lipídica comparable a la bicapa (es decir, 30 mN/m o superior¹⁸⁰).

La Figura 5.3.c muestra la incorporación de KR₉C en monocapas de PFTD. Dos características fundamentales distinguen este gráfico del mostrado en la Figura 5.3.a: en primer lugar,

los valores de $\Delta\Pi$ son altos incluso a pH 3 y, en segundo lugar, a bajos niveles de compactación de la monocapa $\Delta\Pi$ aumenta con Π_0 hasta cierto punto, y luego disminuye. La primera observación se puede explicar considerando que la sustitución de los átomos de hidrógeno por átomos de flúor, disminuye marcadamente la constante de disociación ácida de la molécula¹⁶⁹ y, por lo tanto, el grado de ionización de PFTD ya es mayor que cero a pH 3.

Para estimar el grado de ionización de PFTD a los pHs estudiados, graficamos la presión superficial correspondiente a la transición de fase líquido expandido a líquido condensado en función del pH (Figura 5.4). Se espera que este parámetro sea constante si el grado de ionización permanece sin cambios y que aumente a medida que las moléculas se ionizan. Por lo tanto, de esta gráfica concluimos que las monocapas de PFTD están completamente ionizadas a pH 8, mayormente ionizado a pH 5, y parcialmente cargadas (menos de 50%) a pH 3. Por lo tanto, el grado de ionización del ácido graso perfluorado a pH 3 (o 5) es comparable al del ácido graso hidrogenado a pH 5 (u 8).

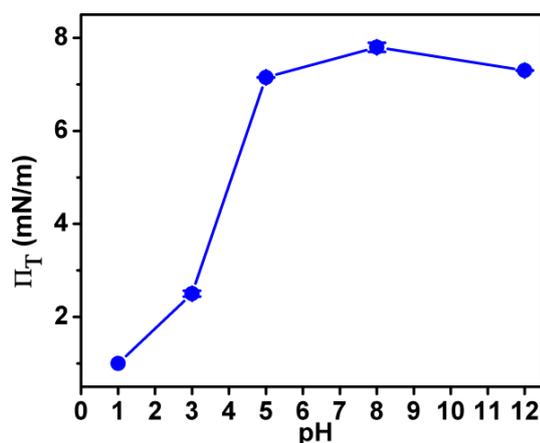


Figura 5.4 Dependencia del estado de transición con el pH para PFTD.

Para facilitar la comparación entre los ácidos grasos hidrogenados y fluorados, los valores de $\Delta\Pi$ a 20 mN/m se grafican en la Figura 5.3.c para pH 8 (PA) y 5 (PFTD). Estos valores de pH se seleccionaron para comparar los ácidos grasos en grados de ionización similares. A partir de esta comparación, es evidente que el péptido promueve mayores cambios en la presión superficial de la monocapa de PFTD con respecto a la de PA. Una hipótesis que podría explicar este comportamiento es el potencial superficial invertido del PFTD, respecto al de los ácidos grasos hidrogenados. Para comprobar esta hipótesis, se analizó la influencia del potencial superficial en la incorporación de KR_9C a las distintas monocapas.

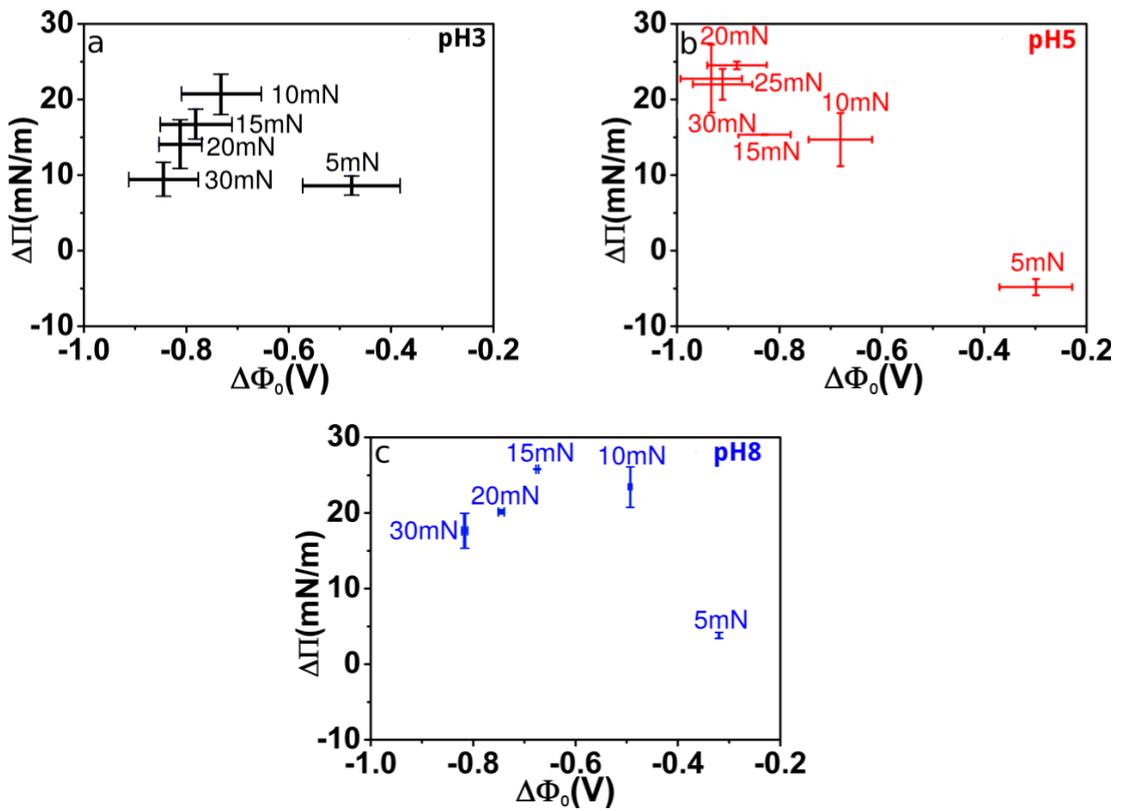


Figura 5.5 $\Delta\Pi$ vs $\Delta\Phi$ para KR_9C que interactúa con una monocapa de PFTD sobre una subfase de $NaCl$ 150 mM a (a) pH3, (b) pH5, y (c) pH8 ($T = 25^\circ C$).

La Figura 5.5 muestra los valores $\Delta\Pi$ de la Figura 5.3.b en función del potencial superficial inicial, para cada pH. Estos gráficos indican que $\Delta\Pi$ vs $\Delta\Phi$ pasa por un máximo, tal como observamos en la figura 5.3 para Π_0 . Las Figuras 5.3.b y 5.5 sugieren que hay una condición óptima para la incorporación del péptido que, a su vez, depende del pH. Este comportamiento bimodal se interpreta teniendo en cuenta dos factores opuestos: la incorporación del péptido se ve favorecida en monocapas con baja densidad y con valores de potencial superficial negativos. Dado que el potencial de superficie se vuelve más negativo a medida que se comprime la película (ver Figura 5.1), ambos parámetros cambian en direcciones opuestas, generando condiciones de penetración óptimas en las monocapas cuya compactación es intermedia.

El valor máximo de $\Delta\Pi^m$ se grafica como una función del pH en la Figura 5.6.a, sobre el que se superponen los valores correspondientes de presión superficial y potencial superficial, Π^m_0 y $\Delta\Phi^m$, respectivamente. Π^m_0 cambia con el pH, siendo más pequeño a pH 3, cuando las monocapas PFTD son más rígidas (Figura 5.4) debido a la neutralización parcial de las moléculas. Por lo tanto, la incorporación del CPP es máxima a presiones superficiales iniciales más bajas (Figura 5.5), y la presión superficial final alcanzada es menor. A pH 5 y 8, las

isotermas de compresión son similares (Figura 5.1). Sin embargo, en la Figura 5.6.b se puede observar que al comparar Π_0 de 10 y 20 mN/m, en ambos casos el potencial superficial es más negativo a pH 5 que a 8. Esto representa una mayor fuerza impulsora para la incorporación del péptido a pH 5, por lo que la inserción puede llevarse a cabo a Π^m_0 mayor que a pH 8.

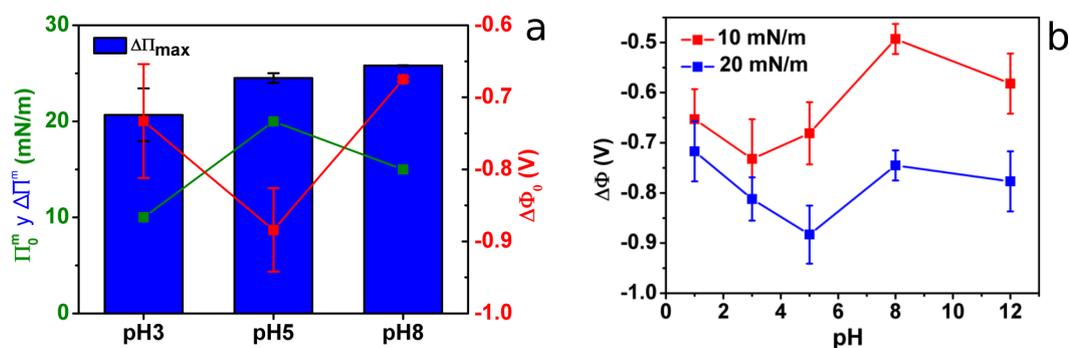


Figura 5.6 (a) Cambio de presión superficial, $\Delta\Pi^m$, asociado a la máxima incorporación de KR₉C en monocapas de PFTD a pH 3, 5 y 8. Las líneas roja y verde representan $\Delta\Phi^m$ y Π^m_0 a los cuales el máximo fue alcanzado. (b) Potencial superficial ($\Delta\Phi$) para una monocapa de PFTD a $\Pi_0 = 10$ mN/m (rojo) y 20 mN/m (azul). ($T = 25^\circ\text{C}$). Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm SD.

Se concluye esta sección con una observación secundaria, no obstante relevante. Moléculas de arginina en una solución cuya concentración era equivalente a la de KR₉C 10 μM , no se incorporaron a la monocapa de MA parcialmente ionizada, ni a la de PFTD completamente ionizada (ambas a pH 5 y $\Pi_0 = 10$ mN/m). Esto respalda la idea de que aumentar la longitud de la cadena de las poliargininas, dentro de ciertos márgenes, fomenta la incorporación del péptido en las membranas.¹⁶

5.3. Importancia del grupo ácido carboxílico en la incorporación del péptido

Los resultados de la sección anterior resaltan la relevancia de un grupo polar cargado negativamente y de un potencial superficial negativo sobre la incorporación de KR₉C en monocapas de ácidos grasos. Sin embargo, a la luz de la afirmación de que los grupos carboxilato favorecen la translocación de péptidos policatiónicos a través de membranas,¹⁶⁷ es importante comprobar si se trata de un efecto genérico, asociado por ejemplo a la carga superficial de la membrana resultante, o si es específico de ácidos grasos o moléculas similares.

Con el fin de investigar el papel de los carboxilatos en la adsorción e inserción de las pArg

a las membranas, se contrastaron los experimentos discutidos en la sección anterior con ensayos equivalentes realizados en monocapas de DMPG. En este último caso, el pH de la subfase se estableció en 5, garantizando la ionización casi completa de la monocapa.¹⁸¹ Las monocapas de DMPG componen entonces una monocapa cargada negativamente que no contiene un grupo carboxilato, lo cual permite evaluar la influencia de la carga en ausencia de este quelante de péptidos. Sin embargo, debe recordarse que DMPG contiene un grupo fosfato, que también ha sido propuesto como un quelante del grupo guanidinio^{167,182} y parece ser más eficiente que los ácidos grasos para extraer oligoargininas hacia una fase orgánica.¹⁸² Además, se ha demostrado que la presencia de lípidos con PG en membranas de PC favorece la penetración de los CPPs en MLs^{163,183} así como en vesículas de diferentes tamaños.^{27,33,59,77,184–187} Sorpresivamente, KR₉C no presentó incorporación en la monocapa de DMPG, como acusan los valores de $\Delta\Pi$ a cualquiera de las presiones superficiales inicialmente fijadas (ver Figura 5.7.a). Sin embargo, la falta de cambio en la presión superficial no deja sin efecto la posibilidad de que el CPP pueda adsorberse sobre la monocapa, unido a los grupos polares de los anfifilos, mientras permanece en el lado acuoso del interfase.¹⁸⁸ En la Figura 5.7.b se muestra una representación esquemática de cómo KR₉C se adsorbería debajo de una monocapa de DMPG, sin modificar el empaquetamiento de los lípidos de la monocapa.

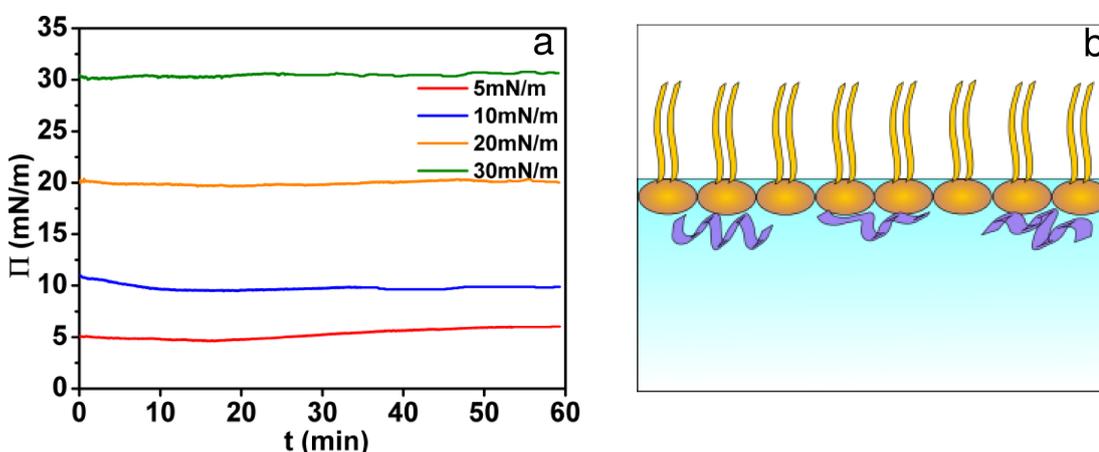


Figura 5.7 (a) Evolución temporal de la presión superficial tras inyectar KR₉C bajo una monocapa de DMPG a $\Pi_0 = 5, 10, 20$ y 30 mN/m ($T = 25^\circ\text{C}$). (b) Ilustración de cómo KR₉C (violeta) se acumula debajo de la monocapa de DMPG (amarillo). La estructura del péptido en la interfase es desconocida, por lo que el diagrama es esquemático.

Para explorar este escenario, se registró simultáneamente la evolución temporal de la presión superficial y la reflectividad de la monocapa, mientras que en otro conjunto de experimentos también se registró el potencial superficial, tras la inyección del péptido bajo las monocapas sostenidas a 10 mN/m. En general, la reflectividad de una interfase aumenta a medida que aumenta el espesor de la monocapa,¹⁷¹ lo que proporciona una medida cualitativa

de la acumulación de material debajo de la misma. Las Figuras 5.8.a-c muestran los resultados para monocapas hechas de MA, DMPG o PFTD, a pH 5.

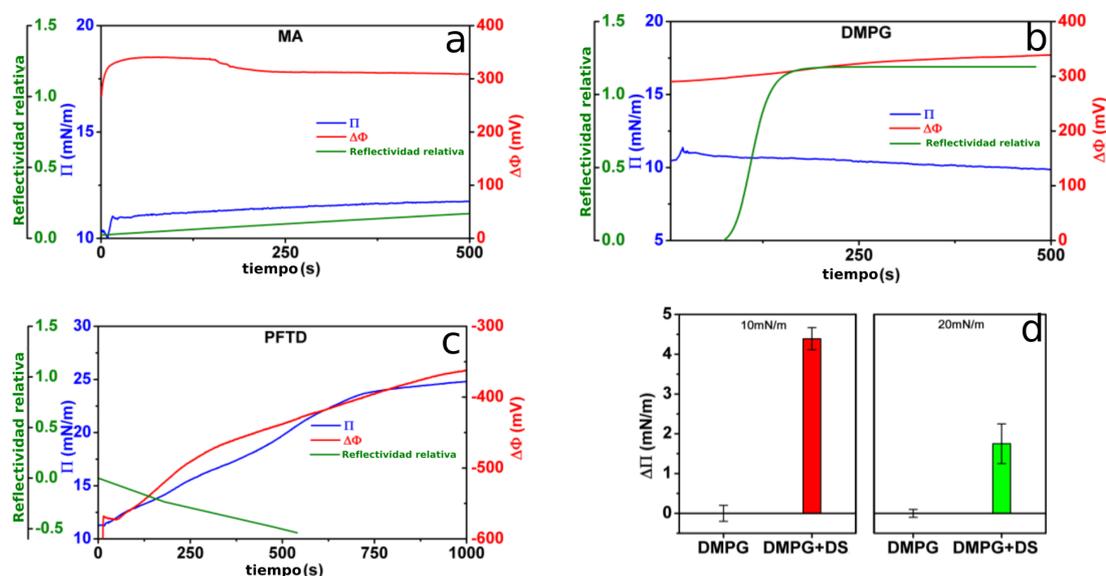


Figura 5.8 Evolución temporal de la presión superficial (Π , en azul), el potencial superficial ($\Delta\Phi$, en rojo), y la reflectividad relativa (en verde) para monocapas de (a) MA, (b) DMPG, y (c) PFTD, a pH 5 y $\Pi_0 = 10$ mN/m. (d) Cambio de presión superficial tras inyectar KR₉C en la subfase, debajo de una monocapa de DMPG, en presencia y ausencia de una subcapa de DS (sulfato de dextrano), a una presión superficial inicial de 10 mN/m (rojo) y 20 mN/m (verde). Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm SD.

Si bien la reflectividad de la monocapa de MA no cambió significativamente con la inyección del péptido, se observó un fuerte aumento en el caso de DMPG y una disminución en la monocapa de PFTD. Por el contrario, el potencial de superficie aumentó en todos los sistemas (en MA decae levemente tras cierto tiempo), con los mayores cambios observados en la monocapa de PFTD. El comportamiento de MA no fue muy sorprendente teniendo en cuenta que, a pH 5 y $\Pi_0 = 10$ mN/m, el péptido tiene un efecto relativamente pequeño en la presión superficial de esta monocapa (Figura 5.3). Por otro lado, la tendencia mostrada por DMPG sugiere que el péptido, a pesar de no incorporarse a la película, se acumula debajo de la monocapa, generando un aumento de la reflectividad de la interfase como ha sido observado anteriormente para polímeros catiónicos y aniónicos,¹⁸⁸ mientras que el aumento del potencial de superficie es leve. Se puede concluir que una superficie cargada negativamente promueve la unión a la superficie, o adsorción, del CPP; pero que la incorporación del péptido en la monocapa requiere de condiciones adicionales, que parecen ser propiciados por moléculas con un grupo ácido carboxílico.

La reducción en la reflectividad mostrada por PFTD puede parecer sorprendente, pero puede explicarse fácilmente teniendo en cuenta que la reflectividad de las monocapas fluo-

radas disminuye con la densidad de la misma,¹⁶⁹ a diferencia de las tendencias observadas en los lípidos hidrogenados. Por lo tanto, la disminución en la reflectividad de PFTD es una consecuencia directa del incremento en el empaquetamiento de las moléculas inducido por la incorporación del péptido. Al mismo tiempo, el cambio en el potencial superficial en este sistema es más pronunciado que en los otros dos casos, ya que la monocapa inicialmente muestra un potencial negativo, lo que lleva a cambios más grandes tras la incorporación de la pArg cargada positivamente.

Se ha demostrado que la presencia de glicosaminoglicanos aniónicos en la matriz extracelular, favorece la absorción celular de CPPs, al aumentar la concentración de péptidos cerca de la superficie de la célula.^{12,75,76,189} Para probar el efecto de este tipo de polímeros sobre la incorporación de KR₉C en monocapas de DMPG, los *films* lipídicos se prepararon sobre soluciones de sulfato de dextrano (DS, por sus siglas en inglés), un polisacárido aniónico que en presencia de CaCl₂ (10 mM) forma una subcapa polimérica debajo del *film*,¹⁸⁸ simulando glicosaminoglicanos. Bajo tales condiciones experimentales, se detectó un ligero aumento en la presión superficial de DMPG después de inyectar la pArg (Figura 5.8.d); sin embargo, el efecto continuó siendo menor que en el caso de las monocapas de ácidos grasos ionizados (pH 8 en Figura 5.3, por ejemplo). Por lo tanto, se puede concluir que KR₉C se incorpora sustancialmente en monocapas parcial y completamente ionizadas de MA, PA y PFTD, pero sólo levemente en monocapas aniónicas de DMPG al complementarse con una subcapa polimérica aniónica. Estas conclusiones respaldan la idea de que los lípidos carboxilados facilitan la difusión pasiva de las pArg a través de bicapas.

Es importante resaltar que estos últimos resultados no contradicen el incremento - ampliamente reportado- de la permeabilidad de vesículas que contienen lípidos con PG, a los CPPs.^{37,190,191} Estos lípidos con carga negativa muy posiblemente aumentan la concentración superficial del péptido que, a su vez, promueve saltos activados a través de la membrana. Schwieger *et. al* también han observado la incorporación de poliargininas en monocapas de DPPG, pero el péptido que utilizaron fue mucho más largo que KR₉C. Además, los resultados presentados en esta tesis tampoco se oponen a los obtenidos por Sakai *et al*,¹⁸² mencionados anteriormente, ya que en esos experimentos el CPP se une a moléculas de DMPG dispersas en una solución clorofórmica (sistema de extracción bifásica), en lugar de formar una membrana ordenada. Por el contrario, aquí los lípidos PG forman una monocapa bien ordenada con grupos

polares altamente hidratados.

No obstante, los resultados presentados en esta tesis parecen estar en desacuerdo con los de Alhakamy *et. al*, que mostraron que la nona-arginina ($10 \mu\text{M}$) se incorporó en monocapas de POPG, generando un cambio en la presión superficial de aproximadamente 4 mN/m . La discrepancia con nuestro resultado podría atribuirse a la insaturación de POPG, que promueve desorden en el arreglo de la capa monomolecular, probablemente afectando a la región de los grupos polares. Esta observación sugiere que es importante la accesibilidad del grupo fosfato en PG, que a su vez puede ser modulado por las cadenas hidrocarbonadas. De hecho, Alhakamy *et. al* informaron el efecto modulador de las colas hidrofóbicas para lípidos con PC: mientras que la nona-arginina genera un incremento de 2 mN/m en la presión superficial de monocapas de POPC, en las de DPPC no se observaron cambios. No se profundizará en este efecto, ya que el objetivo de esta sección es analizar el grupo carboxilato más que el grupo fosfato, sin embargo más experimentos sobre este tema serían valiosos.

Dado que los resultados presentados durante este capítulo indican que, al menos para MA, PA y PFTD, los ácidos carboxílicos ionizados favorecen la inserción de pArg en monocapas, se probaron otros ácidos grasos con el objetivo de generalizar dichas observaciones. Asimismo se evaluó el efecto de la cadena hidrocarbonada sobre la cinética de inserción.

5.4. El papel de las cadenas hidrofóbicas en la interacción del CPP con monocapas de ácidos grasos

Para investigar la influencia de las cadenas hidrofóbicas en la inserción de KR₉C, se agregaron dos ácidos grasos al análisis. Se estudiaron monocapas hechas de ácido oleico (OA), como un ejemplo de lípido insaturado y de ácido esteárico (SA), un lípido que forma películas sólidas. Estos experimentos se llevaron a cabo a pH 5, en el cual los anfífilos están parcialmente disociados y todos forman monocapas estables.

El objetivo de esta sección fue determinar el efecto de la cadena hidrocarbonada del ácido graso sobre la incorporación ($\Delta\Pi$) de KR₉C. Se realizaron monocapas de cada ácido graso mencionado a $\Pi_0 = 10 \text{ mN/m}$ (pH 5), y se inyectó el péptido en la subfase. En la Figura

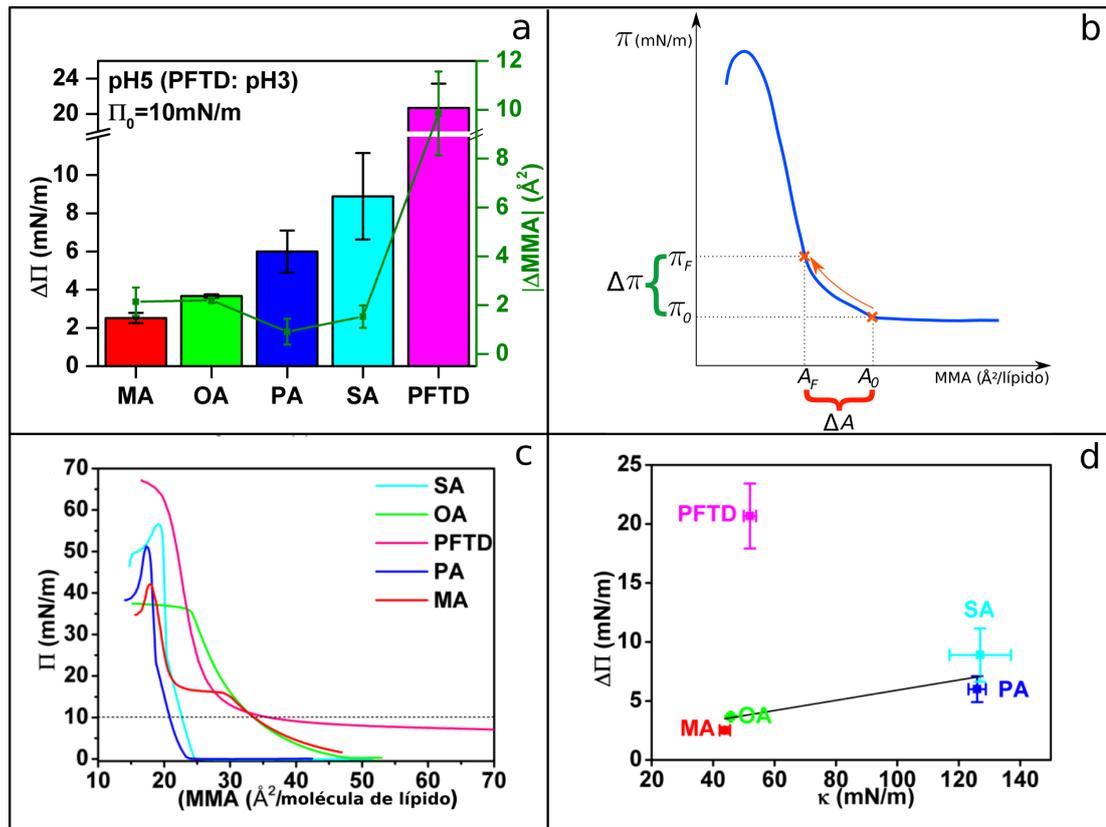


Figura 5.9 Interacción de KR₉C con monocapas de MA (rojo), OA (verde), PA (azul), SA (cian) y PFTD (rosa). (a) $\Delta\Pi$ inducido por KR₉C en monocapas a $\Pi_0 = 10$ mN/m. La línea verde representa la variación (en valor absoluto) del área molecular promedio (MMA) para cada lípido debido a la incorporación del péptido. (b) Determinación de ΔA sobre la isoterma de compresión de un lípido puro (azul): con la llave verde se indica la diferencia de presión superficial obtenida durante un experimento de penetración con KR₉C, y con la llave roja se indica la diferencia en MMA a la cual corresponde dicho $\Delta\Pi$. (c) Isotermas de compresión de los lípidos analizados. La línea de puntos horizontal representa la presión superficial inicial: 10 mN/m. (d) $\Delta\Pi$ inducido por KR₉C graficado en función del módulo de compresibilidad del lípido puro a 10 mN/m (esto es, la presión superficial inicial utilizada en todos los experimentos de penetración). Todos los experimentos fueron realizados a $T = 25^\circ\text{C}$ y pH 5, excepto para PFTD, que fueron realizados a pH 3.

5.9.a se compara el cambio en la presión superficial promovido por la incorporación del péptido. Se puede observar una tendencia creciente de $\Delta\Pi$ al aumentar el largo de cadena (a excepción de PFTD). Para comprender mejor este resultado, se profundizó sobre los parámetros que determinan la respuesta de la monocapa a la inserción del péptido. $\Delta\Pi$ depende tanto de la cantidad de péptido incorporado, como de la rigidez de la monocapa, es decir, la respuesta en presión superficial de la monocapa debido a un cambio en el área por lípido. La rigidez se puede cuantificar a través del módulo de compresibilidad $\kappa = -A \cdot (d\Pi/dA)_T$, donde A es el área molecular promedio. Para poder comparar el efecto del péptido en monocapas con diferente compresibilidad, se estimó el cambio en el área media ocupada por los lípidos tras la incorporación del péptido, ΔA .

Teniendo en cuenta que el área total de la monocapa permanece constante durante la

medición de una curva de penetración, ΔA se estimó suponiendo que el *film* lipídico se puede dividir en dos tipos de regiones. La primera se encontraría definida por zonas donde el péptido penetra en la monocapa y forma un agregado lípido-péptido, introduciendo desorden en la estructura bidimensional de la membrana. El segundo tipo de región sería la zona donde la monocapa no es afectada por el péptido, estando formada por tanto por el lípido puro. De acuerdo con este modelo, las regiones lipídicas puras se comprimen progresivamente a medida que el péptido penetra y forma el agregado lípido-péptido en las otras zonas. ΔA corresponde entonces al cambio en el área por lípido, debido a la incorporación del péptido y la consecuente formación de una nueva estructura péptido-lípido en la monocapa. Se estimaron los valores de ΔA para cada monocapa a partir del cambio en el MMA del lípido debido al cambio en presión superficial debido al agregado del péptido. Siguiendo con la ejemplificación mostrada en la Figura 5.9.b, los valores de MMA se obtuvieron de las isotermas de los lípidos puros presentadas en la Figura 5.9.c.

Los datos resultantes de ΔA (en valores absolutos) se presentan en color verde en la Figura 5.9.a (eje y derecho). De esta manera, se determinó sorprendentemente para todos los casos, un cambio de 2 \AA^2 en el área cuando el péptido se incorporó en monocapas de ácidos grasos hidrogenados, lo que corresponde a $\sim 6\%$ de cambio en el área global. Este cambio representa un porcentaje muy bajo, validando la suposición de una monocapa teselada, en la que persisten las regiones de lípido puro. La Figura 5.9.a muestra que, aunque $\Delta\Pi$ aumenta siguiendo el orden $MA \leq OA < PA \leq SA < PFTD$, los valores de ΔA son similares para todos los ácidos grasos hidrogenados. Por lo tanto, la tendencia en $\Delta\Pi$ es una consecuencia del estado de fase de las monocapas a $\Pi_0 = 10 \text{ mN/m}$: MA y OA se encuentran en estado líquido expandido, mientras que PA y SA están presentes en estado sólido (Figura 5.9.c).

Para cuantificar mejor esta observación, se graficó $\Delta\Pi$ en función del módulo de compresibilidad, κ , de las monocapas de lípidos puros a 10 mN/m . Los resultados se muestran en la Figura 5.9.d. $\Delta\Pi$ aumenta con κ para los ácidos grasos hidrogenados, mientras que el lípido fluorado muestra un gran $\Delta\Pi$, a pesar de su bajo módulo de compresibilidad, lo que a su vez se correlaciona con un valor alto de ΔA .

En general, se puede concluir que el parámetro más influyente en la incorporación de KR₉C en monocapas de ácidos grasos hidrogenados es la presencia del grupo carboxilato, en

lugar de la densidad lipídica. Esto explica la baja influencia de la presión superficial inicial sobre $\Delta\Pi$ (pendiente poco pronunciada), como se observa en la Figura 5.3.a. Además, la Figura 5.9.d resalta el hecho de que el potencial superficial negativo promueve una mayor inserción del péptido en monocapas de PFTD, comparativamente a cualquiera de los ácidos grasos saturados.

A juzgar por los valores de ΔA , todos los ácidos grasos saturados absorben cantidades similares de CPP en la monocapa. Sin embargo, la cinética de inserción del péptido depende de la longitud de la cadena hidrofóbica. La Figura 5.10.a muestra una curva de penetración esquemática en la cual se indica gráficamente la definición de tiempo de latencia y de tiempo medio ($t_{1/2}$). El primero de estos parámetros hace referencia al período de tiempo que transcurre hasta la observación de un primer aumento en la presión superficial. Por otra parte, el $t_{1/2}$ se define como el tiempo que el péptido demora en modificar la presión superficial en $\Delta\Pi/2$. En la Figura 5.10.b, se grafican estos parámetros cinéticos para las monocapas de los distintos lípidos estudiados. En este gráfico se puede observar una clara disminución en la velocidad de inserción del péptido a medida que aumenta la longitud de la cadena del lípido. Así, los dos ácidos grasos de 14 carbonos (MA y PFTD) muestran el valor más bajo de $t_{1/2}$ y sin tiempo de latencia, dentro de la resolución temporal de nuestros experimentos. Por el contrario, en las monocapas de los ácidos grasos con 18 carbonos, tanto saturados como insaturados, se observó una respuesta más lenta a la incorporación de KR₉C, mostrando además mayores tiempos de latencia. Estos resultados sugieren que la tasa de inserción de CPP en una estructura lipídica plana se encuentra dominada por la reorganización de las cadenas hidrocarbonadas, con barreras de energía más altas para cadenas más largas.

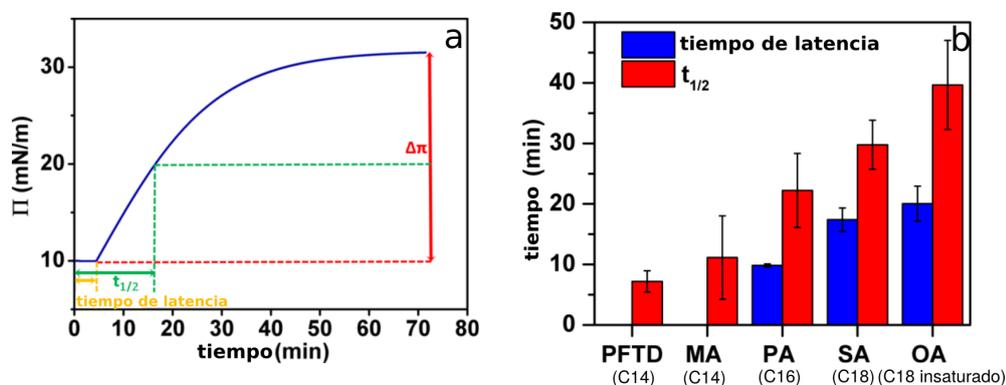


Figura 5.10 (a) Evolución temporal de la presión superficial de una monocapa de ácido perfluorotetradecanoico (PFTD) a $\Pi_0 = 10$ mN/m, tras la inyección de KR₉C en la subfase acuosa que contenía NaCl 150 mM a pH5. El tiempo de latencia (amarillo) es el período de tiempo transcurrido entre la inyección del péptido en la subfase y el momento en que comienza a aumentar la presión superficial. $t_{1/2}$ (verde) es el tiempo al cual el péptido produjo la mitad de $\Delta\Pi$ (rojo). (b) Valores de tiempo de latencia y $t_{1/2}$ asociados a la cinética de incorporación de KR₉C a monocapas de PFTD, MA, PA, SA y OA.

Considerando los resultados expuestos en este capítulo, se propone que los ácidos grasos forman una estructura péptido-lípido en la interfase, en la que el ácido carboxílico se encuentra quelando al guanidinio de las argininas como se propuso anteriormente⁶⁴. La relación péptido-lípido no parece depender del largo de cadena, observándose en todos los casos un efecto similar. La Figura 5.11 muestra esquemáticamente la estructura propuesta. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la traslocación de estos péptidos ocurriría acorde al modelo de traslocación adaptativa.

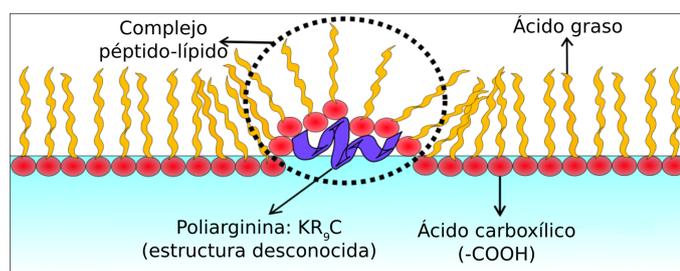


Figura 5.11 Ilustración del agregado péptido-lípido formado entre KR_9C (violeta) y los grupos carboxílicos (rojo). La estructura real del péptido en la interfase no fue estudiada por lo que el esquema es meramente ilustrativo.

5.5. Análisis de la inserción de R_9 en bicapas con ácidos grasos mediante simulaciones de grano grueso

Se realizaron cálculos de energía libre mediante simulaciones computacionales para el proceso de inserción de R_9 en bicapas mixtas con cierto contenido de PA. Para ello, en primer lugar se ensambló una bicapa de DOPC-PA 75:25, que resultó neutra dado que el grupo carboxílico se encontraba protonado. Se aplicó la técnica de *Umbrella Sampling* para obtener el perfil de energía libre para el proceso de inserción de R_9 , donde la variable colectiva fue la distancia en el eje z entre el COM_{R_9} y el COM_{bicapa} .

En la Figura 5.12, se encuentra representado en azul el perfil de energía libre para la bicapa neutra. En este caso, la adsorción del péptido en la interfase lipídica no resultó un proceso espontáneo y, en general, se observó que el proceso de inserción sube rápidamente a valores elevados de energía a medida que R_9 se aproxima al centro de la bicapa. Si luego se ioniza el grupo carboxílico de las moléculas de PA presentes en la bicapa, se obtiene el perfil de energía que se muestra en la Figura 5.12 en color rojo. Esta curva muestra que el

proceso de adsorción resultó favorable desde el punto de vista energético, dado que se establecen interacciones electrostáticas entre las cargas catiónicas de R₉ y las aniónicas de los carboxilatos. Por otro lado, el hecho de presentar el grupo polar ionizado generó que la inserción del péptido fuera un proceso mucho más favorable, lo cual se encuentra evidenciado por una disminución de ~150 kJ/mol en el máximo (barrera de activación, $\Delta G(z = 0 \text{ nm})$) respecto a la bicapa neutra. La comparación de estos dos procesos pone en evidencia uno de los factores que podría ser relevante para la traslocación de las pArg: la densidad de carga aniónica en la membrana. Un análisis más exhaustivo de esta variable se presenta en el capítulo siguiente.

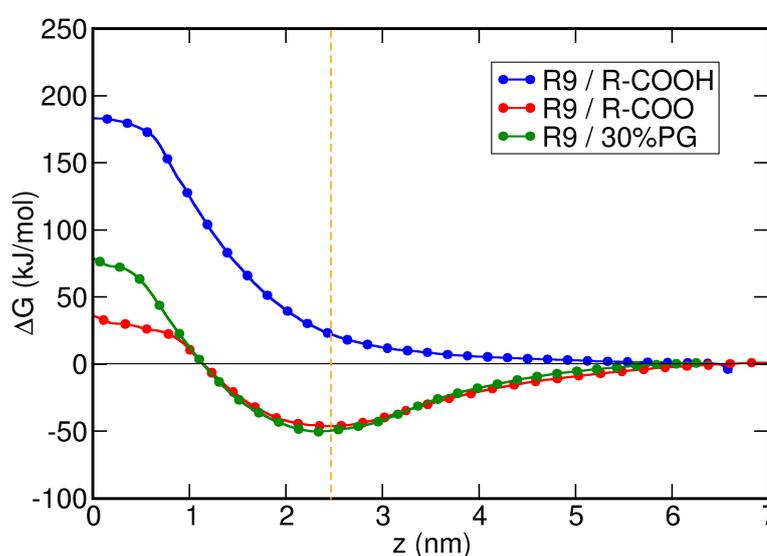


Figura 5.12 Perfiles de energía, $\Delta G(z)$, para la inserción de una molécula de R₉ en una bicapa de DOPC-PA 75:25 con el grupo carboxílico protonado (azul), o ionizado (rojo). A modo comparativo, se coloca la curva de energía libre para la inserción de R₉ en una bicapa de DOPG-DOPC 30:70 (verde), ya que tiene una densidad de carga aniónica similar a la bicapa que contiene el PA ionizado. La línea vertical de color naranja muestra la ubicación de la superficie de la bicapa. Los perfiles se referencian a cero en el centro de la solución que inicialmente contiene al CPP. El centro de la bicapa se ubica en $z = 0 \text{ nm}$.

Asimismo se obtuvo el perfil de energía libre para una bicapa con la misma densidad de carga aniónica, pero que contenía DOPG en lugar de PA ionizado. Esta variación en el sistema permitió evaluar si la disminución de energía en el proceso de inserción es producto de la presencia del ácido graso ionizado o si, por el contrario, es un efecto generado por la densidad de carga negativa en la bicapa. Observando nuevamente la Figura 5.12, pero ahora comparando las curvas en color rojo y verde, se evidencia en ambos casos la presencia de un mínimo de adsorción. El pozo energético en la interfase agua/lípidos resultó similar para los dos sistemas por el hecho de ser bicapas con igual densidad de carga. Sin embargo, al comenzar a desplazarse hacia el centro de la membrana, se observó que el proceso de inserción en la bicapa que contiene PA ionizado tiene menor barrera energética que la compuesta sólo por fosfolípidos. Es decir, los ácidos grasos ionizados promueven una incorporación más efectiva de R₉ en la

bicapa. Específicamente, se cuantificó una diferencia de ~ 40 kJ/mol entre ambos máximos. Esta diferencia posiblemente se deba a que el ácido graso consta de una sola cadena hidrofóbica, por lo que la restructuración de este lípido dentro de la bicapa implica un menor costo entrópico que la de DOPG. Herce *et. al* llegaron a una conclusión similar mediante estudios *in silico* respecto a la incorporación de TAT en una bicapa mixta compuesta por ácido oleico-DOPC.⁶⁴

5.6. Conclusiones parciales

En este capítulo se ha caracterizado la unión e inserción de un péptido de penetración celular, KR₉C, en monocapas lipídicas. Tres conclusiones principales se pueden extraer del presente estudio. Primero, la penetración del péptido en las monocapas de ácido graso está regulada por el pH de la subfase, ya que controla parcialmente la densidad de carga de la monocapa. Los *films* lipídicos aniónicos son más propensos a interactuar con CPPs policatiónicos, como se informó anteriormente para diferentes membranas modelo.^{163,192} Sin embargo, la densidad de carga superficial no es el único parámetro relevante. Se ha probado que el grupo funcional carboxilato fomenta la inserción de poliargininas, probablemente porque es un buen ligando para el grupo guanidinio de arginina, que está presente en grandes cantidades en casi todos los CPPs. Además, al estar formado por una cadena y no dos, el ácido graso puede reorganizarse alrededor del péptido con mayor facilidad que un glicerofosfolípido. Estos resultados concuerdan con otros previos donde los ácidos grasos son capaces de secuestrar CPPs de una solución acuosa.¹⁶⁷

El importante papel de los carboxilatos se evaluó mediante la comparación de la inserción del péptido en monocapas de DMPG y ácidos grasos a pH intermedio (Figura 5.8). Se observó que KR₉C se adsorbió en DMPG, pero no se insertó en la estructura lipídica. Podría argumentarse que la monocapa de DMPG tiene una menor densidad de carga que cualquiera de las monocapas de ácidos grasos, ya que el área molecular promedio de DMPG es más grande. No obstante, debe recordarse que la incorporación de KR₉C en MA ocurrió incluso a pH 5, donde la monocapa estaba sólo parcialmente ionizada. Además, estos resultados no deben ser interpretados como una ausencia completa de interacciones específicas entre los grupos fosfato y guanidinio, ya que ha sido previamente probado que KR₉C se incorpora a monocapas de PC.¹⁹³ Más precisamente, los resultados aquí presentados sugieren que el balance de interacciones específicas (enlaces puente de hidrógeno, etc.) y no específicas (electrostática y van der Waals) son diferentes para las

monocapas de ácidos grasos y de PG. Las fuerzas electrostáticas pueden ser similares en ambos casos, pero el grupo carboxilato de los ácidos grasos es capaz de quelar el grupo guanidinio formando un agregado péptido-lípido en la interfase, mientras que para DMPG esto podría estar siendo dificultado por la menor accesibilidad que tiene el péptido al grupo fosfato en el lado acuoso de la interfase.

En segundo lugar, un potencial superficial negativo favorece la incorporación del péptido en la monocapa, contrarrestando el efecto negativo de la densidad incrementada del *film* en ácidos grasos perfluorados. Podría argumentarse que la mayor afinidad de inserción de KR₉C por PFTD, en comparación con PA, no se debe a un potencial superficial negativo sino al hecho de que PFTD forma monocapas menos rígidas. Sin embargo, incluso teniendo en cuenta esas diferencias en las propiedades mecánicas, los efectos sobre la presión superficial y los cambios de área que se muestran en la Figura 5.9 son más grandes para monocapas de PFTD que para PA.

En tercer lugar, se analizó si el estado de fase de la monocapa o la longitud de la cadena hidrocarbonada afecta la inserción del péptido en monocapas de ácido graso. Los resultados mostraron que la inserción del péptido perturba el área de la monocapa (al formar un agregado péptido-lípido), de forma similar en todos los ácidos grasos hidrogenados probados, siendo la cinética de penetración dependiente de la longitud de la cadena hidrocarbonada. Puede resultar sorprendente que el proceso de incorporación no dependa de la rigidez de la monocapa, ya que comúnmente se observa (y también se espera) que las monocapas rígidas sean menos propensas a la incorporación de moléculas. Sin embargo, el resultado mostrado en la Figura 5.9 está de acuerdo con la escasa pendiente de los gráficos $\Delta\Pi$ vs Π_0 . Por lo tanto, se concluye que la penetración de KR₉C en monocapas de ácidos grasos no se inhibe con un alto grado de compactación. Más aún, la barrera energética para la inserción de pArg no es más grande en monocapas rígidas que en monocapas blandas, lo que sugiere que la formación de una estructura péptido-lípido estable paga el costo energético de la compresión global de la monocapa ($\Delta\Pi > 0$), haciendo que todo el proceso sea favorable incluso para *films* muy compactos.

En resumen, como se sugiere en la Figura 5.11, se propuso que KR₉C forma un complejo específico con ácidos carboxílicos, lo que conduce a la reorganización de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. Además, los resultados sugieren que estos agregados péptido-lípido tienen

una relación fija de péptido-ácido carboxílico (ionizado), independientemente de la longitud del ácido graso. Tal complejo no puede formarse con residuos de arginina no polimerizados, ya que los experimentos de control realizados con $90 \mu\text{M}$ de arginina no indujeron ningún aumento en la presión superficial de las monocapas de ácidos grasos. Por lo tanto, es necesaria una cadena de poliarginina para la inserción en la membrana, es decir, para que se forme un complejo estable de guanidinio-carboxilato. El costo energético para producir la reorganización en la interfase lipídica es mayor cuanto más extensas son las cadenas hidrocarbonadas, lo cual resulta un factor determinante respecto a la cinética de inserción del CPP. Las evidencias aquí presentadas respaldan algunas de las ideas detrás del llamado "mecanismo de translocación adaptativa"⁶³ para la permeación de los CPPs a través de membranas. Tal mecanismo propone que el péptido se asocia fuertemente a un cierto número de moléculas de lípidos, que finalmente transportarán el CPP a través de la membrana mientras enmascaran su carga eléctrica, haciendo que todo el proceso sea energéticamente favorable. Por último, se demostró que este tipo de agregados péptido-lípido puede formarse con KR₉C en monocapas compuestas por ácidos grasos.

En suma, se comprobó experimentalmente en monocapas así como a través de simulaciones moleculares en bicapas, que la presencia de ácidos grasos ionizados favorece la inserción de R₉ en las membranas lipídicas. A modo más general, se puede concluir que la densidad de carga aniónica en la interfase lipídica es un factor necesario en el proceso de adsorción, pero su rol en la inserción del péptido hasta aquí no queda totalmente dilucidado: ambos lípidos aniónicos producen una disminución de la barrera energética respecto a la bicapa neutra de DOPC-PA, siendo más favorable el proceso para PA ionizado que para DOPG. Para lograr mayor claridad sobre este último punto, resultó necesario realizar nuevos análisis computacionales sobre el efecto de la densidad de carga producida por la presencia de DOPG, cuyos resultados se presentan en el siguiente capítulo.

Capítulo 6

Efecto de la electrostática interfacial sobre el transporte de pArg y del complejo pArg-pGly a través de bicapas lipídicas

En este capítulo se analiza cómo la densidad de carga aniónica de la membrana modula los procesos de adsorción/inserción de la pArg R₉. Con este objetivo se realizaron simulaciones de Dinámica Molecular de grano grueso para obtener los perfiles de energía libre para dichos procesos, bajo diferentes condiciones de concentración de lípidos aniónicos en la bicapa.

También se analizó el efecto CPP de R₉ sobre una nona-glicina (G₉), utilizándola como un cargo hidrofílico modelo. Nuevamente se calcularon los costos energéticos de los procesos de adsorción/inserción, y se compararon los perfiles obtenidos para R₉, G₉ y el complejo R₉G₉, donde se unieron ambos péptidos químicamente. También se analizó la influencia de la electrostática interfacial sobre el transporte del complejo R₉G₉. Por último, se abordó la influencia del tamaño del cargo hidrofílico (G₉ vs. G₃₁) sobre el proceso de transporte mediado por R₉.

6.1. La densidad de carga aniónica de la bicapa favorece el transporte de R9 a través de bicapas lipídicas

En el Capítulo 5 se demostró que la presencia de lípidos aniónicos en membranas regula la adsorción de las pArg en la interfase lipídica. En este Capítulo, se presenta un análisis de la influencia de la densidad de carga negativa en la membrana (σ^-) sobre el proceso adsorción/inserción de R9 en la misma. Con este objetivo, se realizaron cálculos de energía libre mediante US, para estudiar el proceso de inserción de R9 en bicapas de DOPC-DOPG con proporciones crecientes del lípido aniónico, donde la CV fue definida como la distancia $COM_{R9}-COM_{bicapa}$.

En primer lugar, y para lograr un entendimiento más claro de los resultados obtenidos, se planteó un modelo fenomenológico simple que se ajusta al perfil de energía libre que se obtiene para el proceso de inserción de la pArg en la membrana lipídica. Típicamente, la adsorción del péptido catiónico a una interfase cargada negativamente tiene un mínimo de energía en la interfase lípido/solución.⁸¹ Asimismo, como se mostró en el Capítulo 4, existe un máximo de energía en dicho perfil que corresponde al estado donde el péptido se encuentra en el centro de la bicapa. El esquema del modelo se ilustra en la siguiente Figura:

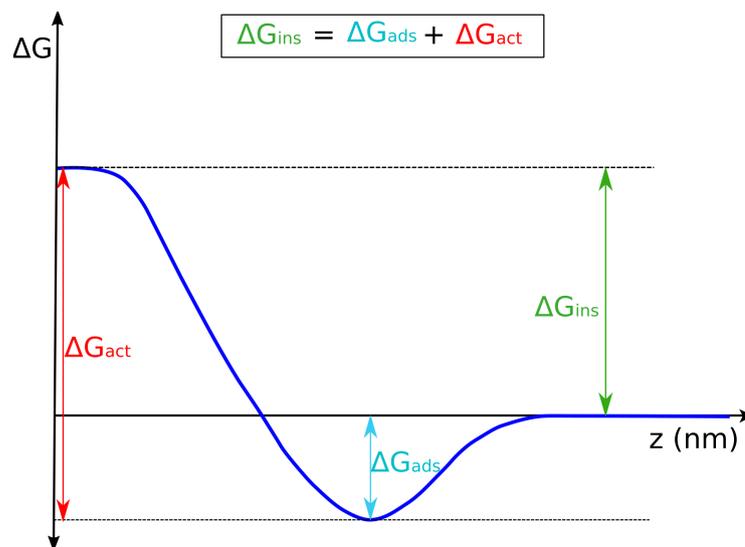


Figura 6.1 Esquema del modelo energético para el proceso de inserción de R9 en una bicapa, donde ΔG_{ins} , ΔG_{ads} y ΔG_{act} son los valores de energía libre para el proceso de inserción, adsorción y activación, respectivamente.

Este modelo sostiene que la velocidad de transporte a través de la membrana está

gobernada por ΔG_{ins} . A su vez, esta última variable se define como $\Delta G_{ins} = \Delta G_{ads} + \Delta G_{act}$, donde ΔG_{ads} es la energía de adsorción del péptido y ΔG_{act} es el costo energético asociado a la formación del estado de transición del proceso de inserción del péptido. Por ello, la expresión general es:

$$v = \alpha \cdot e^{-\frac{\Delta G_{ins}}{RT}} \cdot [pArg]_{bulk} \quad (6.1)$$

donde α es una constante con unidades de 1/tiempo y $[pArg]_{bulk}$ es la concentración de pArg en el *bulk* (o seno de la solución).

En la Figura 6.2 se muestran los perfiles de energía libre para cuatro condiciones de densidad de carga negativa en la membrana, esto es, sistemas donde las bicapas tenían 0, 10, 30 o 50% de DOPG. Tal como ya fue discutido en el Capítulo 4, la molécula de R₉ por su carácter policationico requiere atravesar una gran barrera energética para alcanzar el centro de una bicapa neutra de DOPC. Esto puede observarse en la curva azul de la Figura 6.2 (0% PG), para la cual tanto ΔG_{ads} como ΔG_{ins} resultaron valores positivos. Si se contrasta este perfil con el presentado en color negro (bicapa con 10% PG) claramente se puede observar que la presencia de un bajo porcentaje de lípido aniónico disminuyó ΔG_{ads} , haciendo de éste un proceso favorable. Este efecto resultó aún más pronunciado en los casos de 30 y 50% de PG (curvas roja y verde, respectivamente), donde el pozo energético aumentó proporcionalmente con el porcentaje de lípidos aniónicos en la bicapa.

Las principales causas de este mínimo de adsorción es la interacción electrostática favorable entre la carga policationica de R₉ y las cargas aniónicas de la membrana. Para mayor claridad, la Tabla 6.1 colecta los valores de ΔG_{ads} , ΔG_{ins} y ΔG_{act} , de los perfiles de energía libre presentados en la Figura 6.2.

Acorde al modelo presentado en la Figura 6.1, dado que ΔG_{ins} equivale a la suma de ΔG_{act} y ΔG_{ads} , cualquier factor que produzca una disminución en alguna de estas dos últimas variables, reducirá el valor de ΔG_{ins} , lo cual finalmente se traduce como un aumento de la velocidad de inserción de la pArg en la bicapa (Ecuación 6.1). A simple vista, las curvas de energía libre demuestran que el aumento progresivo de la especie aniónica en la bicapa produce

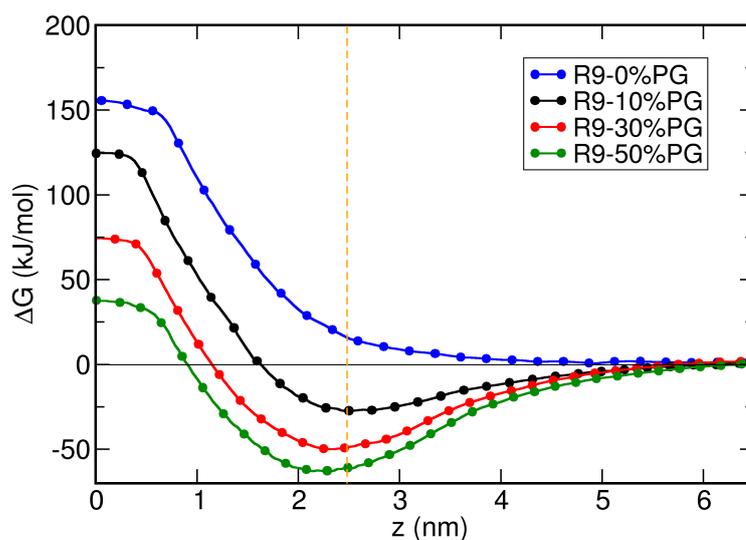


Figura 6.2 Perfiles de energía libre para el proceso de inserción de R_9 en bicapas DOPC-DOPG, con porcentajes de DOPG crecientes: 0 (azul), 10 (negro), 30 (rojo) y 50% (verde).

% PG	ΔG_{ads}	ΔG_{ins}	ΔG_{act} (kJ/mol)
0	17 ± 3	144 ± 5	144 ± 5
10	-27 ± 3	125 ± 4	152 ± 4
30	-50 ± 4	80 ± 5	129 ± 5
50	-61 ± 4	37 ± 3	99 ± 4

Tabla 6.1 Valores de energía libre extraídos de las curvas presentadas en la Figura 6.2 para los procesos de adsorción ($z \sim 2,5$ nm), inserción ($z = 0$ nm) y activación ($\Delta G_{z_{centro} - z_{bulk}}$), de R_9 en una bicapa de DOPC-DOPG.

un desplazamiento de la curva de energía libre hacia valores más bajos de energía. Es decir, hubo una reducción general en la energía de inserción dada por la disminución en las energías de adsorción y de activación.

Sin embargo, estas variables no sufrieron modificaciones proporcionales. En términos porcentuales, mientras que ΔG_{ins} sufrió una reducción del 74 % al pasar de una bicapa neutra (0%PG) a una cargada (50%PG), se encontró que ΔG_{ads} se redujo en un 77 %, y ΔG_{act} tan sólo lo hizo en un 31 %. En base a estos resultados, se podría afirmar que el aumento en la velocidad de traslocación se encuentra dado principalmente por la disminución en la energía de adsorción. Un estudio experimental realizado sobre vesículas aniónicas sugiere que las pArg podrían utilizar un mecanismo de internalización en dos pasos, donde inicialmente se establece una atracción electrostática que resulta rápida, no específica y relativamente débil; seguido de una interacción no electrostática que es fuerte, específica y representa el cuello de botella del proceso.¹⁹⁴

En la Figura 6.3 se muestran gráficamente las tendencias discutidas, donde se puede observar que la pendiente menos pronunciada en los gráficos de energía libre vs %PG, corresponde a ΔG_{act} , poniendo de relieve la poca dependencia de este parámetro con la densidad de carga negativa. Por el contrario, ΔG_{ins} y ΔG_{ads} presentan pendientes semejantes y pronunciadas, manifestando una fuerte correlación con la densidad de carga negativa, así como entre ellas. Esto mismo se corresponde con el hecho de que la densidad de carga negativa también afectó a la energía de activación, que en efecto redujo su barrera, pero de una manera bastante más atenuada con respecto a la energía de adsorción (menos de la mitad de reducción).

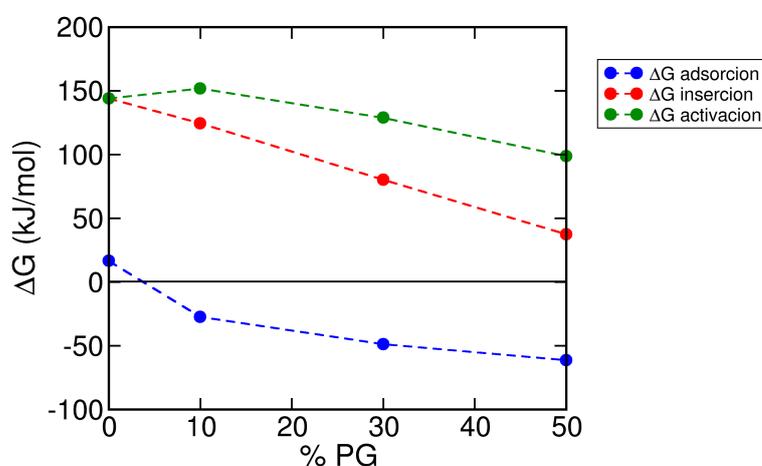


Figura 6.3 Gráficos ΔG vs %PG para los procesos de adsorción, activación e inserción de R_9 en bicapas mixtas de DOPC-DOPG con concentraciones variables de PG entre 0 y 50%.

Otra observación relevante fue que el péptido R_9 se insertó en la bicapa a través de un poro hidrofílico, de manera tal que sus cargas fueron apantalladas efectivamente por los lípidos aniónicos reclutados dentro del poro, lo cual se hace notable en la disminución del costo de inserción con el aumento de la densidad de carga negativa. En este sentido, tal como se demostró en capítulos anteriores, las pArg al adsorberse sobre una membrana lipídica pueden producir una reestructuración en dicha zona e inducir una curvatura negativa, que eventualmente induce poros hidrofílicos.⁷⁵

Finalmente cabe destacar que existe un desplazamiento del mínimo energético en los perfiles de ΔG a medida que aumenta la densidad de carga negativa. La atracción electrostática que se establece entre la creciente concentración de lípidos cargados en la hemicapa distal de la membrana y R_9 , eventualmente produce que la pArg se aloje más profundamente en el interior de la bicapa.

6.2. El efecto CPP de R₉: ¿cuánto cuesta transportar una molécula hidrofílica a través de la membrana?

Dada la vasta aplicación de las pArg como vehículos transportadores de diversos cargos (moléculas o nanopartículas), el siguiente paso en esta tesis fue estudiar el rol de la densidad de carga negativa sobre el transporte de una molécula hidrofílica mediado por R₉. Para realizar una primera evaluación sobre el proceso, se escogió como cargo una poliglicina (G₉) constituida por nueve aminoácidos de Glicina cuya estructura secundaria se considera como un ovillo al azar. El análisis inicial constó de una cuantificación del efecto del cargo sobre el costo de inserción en el centro de una bicapa de DOPC-DOPG 50:50. Se eligió esta condición inicial dado que fue la condición más extrema analizada anteriormente.

El análisis de los costos energéticos requeridos en este proceso de transporte fue realizado de manera semejante al de R₉: simulaciones US con campo de fuerza de Martini. Para el caso de R₉G₉, la definición de la CV fue consistente con el estudio realizado sobre R₉: la distancia z entre COM_{R_9} y COM_{bicapa} . Ésto permitió la comparación directa con los perfiles obtenidos para R₉. En el caso de G₉, la CV se definió como la distancia z entre COM_{G_9} y COM_{bicapa} .

En la Figura 6.4 se presentan los perfiles de ΔG vs z para R₉, G₉ y el complejo R₉G₉. En primer lugar, cabe resaltar la presencia de un mínimo de energía en las cercanías de la interfase agua/bicapa, que sólo puede ser evidenciada cuando R₉ está presente en la secuencia peptídica, esto es, R₉ o R₉G₉. Los valores de ΔG_{ads} para R₉ y R₉G₉ fueron similares dado que en ambos casos coincidían las características eléctricas del sistema: misma densidad de carga negativa en la bicapa, e igual carga en el péptido dada la presencia de R₉ en ambos péptidos. El valor nulo para ΔG_{ads} encontrado en el caso de G₉ es esperable, considerando que el péptido es neutro. Estos primeros resultados nuevamente ponen de relieve el efecto favorable de la interacción electrostática entre las cargas opuestas de pArg y los lípidos que constituyen la bicapa.

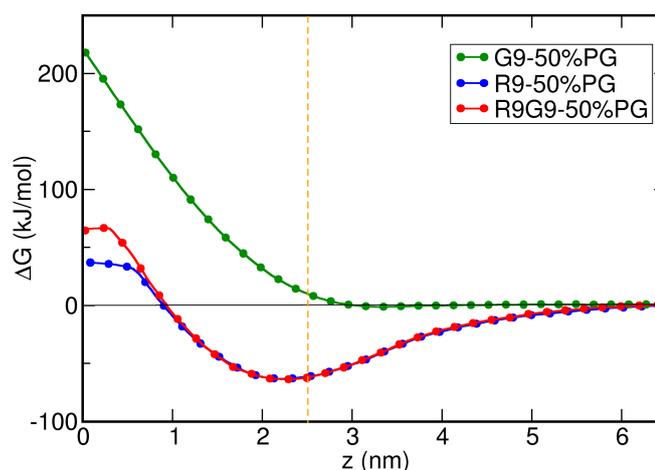


Figura 6.4 Perfiles de energía libre para los procesos de inserción R_9 (azul), G_9 (verde) y el complejo R_9G_9 (rojo), en una bicapa de DOPC-DOPG 50:50.

La inserción del péptido G_9 muestra un crecimiento energético monotónico al trasladarse desde la solución hacia el interior de la bicapa. Al comparar $\Delta G_{ins} = 220$ kJ/mol para G_9 , con $\Delta G_{ins} = 60$ kJ/mol para R_9G_9 , se logra explicar la calidad de CPP de R_9 : existe una diferencia en ΔG_{ins} de ~ 160 kJ/mol entre ambos péptidos, siendo más favorable la inserción para el complejo que contiene la pArg. Esto se puede circunscribir al hecho de que, a diferencia de R_9 , al no haber una fuerte componente electrostática entre G_9 y la bicapa, por un lado no existe una preconcentración interfacial del péptido y, por otro lado, la componente entálpica del proceso también se modifica al no existir interacciones entre la cadena lateral de glicina y los lípidos.

Más aún, realizando un análisis visual de las dinámicas moleculares, se observó que G_9 logró insertarse en la membrana tras aplicar cierto estrés mecánico sobre la misma para atravesarla. Esto se muestra gráficamente en la Figura 6.5, donde se presentan los perfiles de densidad de carga en función de z . En la Figura 6.5.a se puede apreciar que cuando R_9 se encuentra en el centro de la membrana, se genera un poro hidrofílico evidenciado por la presencia de las cabezas polares del DOPG tapizando la superficie del poro. Comparativamente, en la Figura 6.5.b, se puede observar que la curva roja (correspondiente a los lípidos de DOPG) presenta un corrimiento hacia el interior de la bicapa, señalado mediante la flecha negra, pero no se observa presencia de cabezas polares en el centro de la bicapa. Este desplazamiento representa la deformación de la bicapa efectuado por la inserción de G_9 , que inicialmente se encontraba en el compartimento derecho. Sin embargo, este desplazamiento no generó un poro hidrofílico, sino que el péptido se insertó en el centro de la bicapa mediante un defecto hidrofóbico.

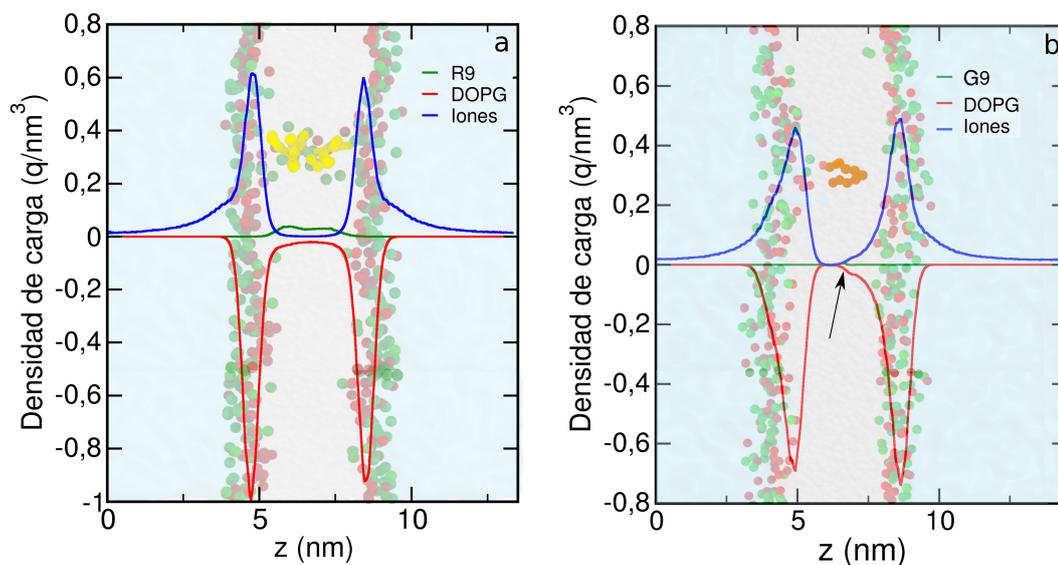


Figura 6.5 (a) Perfil de densidad de carga en función de la distancia z , cuando R_9 se encuentra ubicado en el centro de la bicapa de DOPC-DOPG 50:50. Las curvas representan la densidad de carga de DOPG (roja), R_9 (verde) y los iones sodio y cloruro (azul). En el fondo del gráfico se presenta esquemáticamente la ubicación de R_9 (amarillo) en la bicapa cuyas cabezas polares se representan en verde (DOPG) y rojo (DOPC). (b) Perfil de densidad de carga en función de la distancia z , cuando G_9 se encuentra ubicado en el centro de la bicapa de DOPC-DOPG 50:50. Las curvas representan la densidad de carga de DOPG (roja), G_9 (verde) y los iones sodio y cloruro (azul). En el fondo del gráfico se presenta esquemáticamente la ubicación de G_9 (naranja) en la bicapa.

La prueba fehaciente de la función CPP de R_9 se puede analizar evaluando si la barrera energética de inserción del péptido hidrofílico G_9 se reduce al ser químicamente enlazado a R_9 . En efecto, al cotejar ΔG_{ins} para G_9 y su complejo con R_9 , una indudable reducción de ~ 160 kJ/mol en la barrera energética demuestra que la pArg facilita (y acelera) la incorporación de la molécula hidrofílica en la bicapa. En otras palabras, el alto costo energético de incorporación del péptido neutro G_9 en la bicapa aniónica sería compensado, al menos en parte, por la energía de adsorción favorable asociada a la presencia de R_9 .

A modo comparativo, en la Figura 6.6 se presentan los renderizados de la estructura del poro generado por los distintos péptidos: mientras G_9 se inserta en la membrana mediante un defecto hidrofóbico, tanto R_9 como su complejo con G_9 presentan poros hidrofílicos, tapizados principalmente por los lípidos aniónicos.

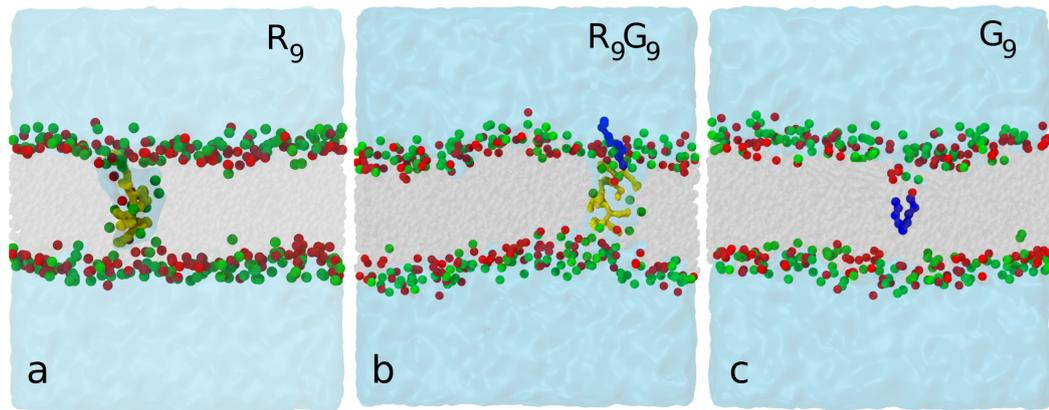


Figura 6.6 Ilustración esquemática de la estructura del poro generado por cada péptido: mientras que (a) R_9 (color amarillo) y (b) su complejo con G_9 (color azul) se insertan mediante un poro hidrofílico, la pGly (c) G_9 individual se inserta en la bicapa a través de un defecto hidrofóbico. A modo general, en color verde se muestran las cabezas polares de DOPG, en rojo las de DOPC, y en gris las colas hidrofóbicas de ambos lípidos.

Se concluye esta sección con una observación respecto al sistema con el complejo R_9G_9 . Una vez que R_9 se ubicó en el centro de la bicapa, se observó que G_9 rápidamente fue expulsado hacia la solución acuosa del compartimento inferior, tal como se muestra en la Figura 6.7. Esto se explica a la luz de lo expuesto para el caso de R_9 : dado que la pArg recluta lípidos aniónicos dentro del poro y que G_9 es una especie neutra, no existen fuerzas electrostáticas favorables que estabilicen a la pGly dentro del poro, por lo que se ubica preferencialmente hacia la solución. Nuevamente en solución adquiere los grados de libertad que dentro del poro no tenía.

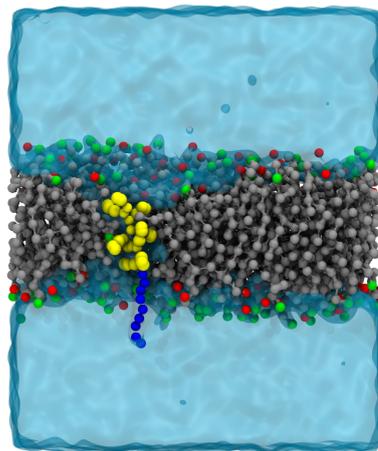


Figura 6.7 Ilustración esquemática de la estructura del poro generado por R_9G_9 . Se puede que mientras R_9 (amarillo) se encuentra en el centro hidrofóbico de la bicapa, G_9 (azul) se ubica hacia la solución acuosa. En color verde se muestran las cabezas polares de DOPG, en rojo las de DOPC, y en gris las colas hidrofóbicas de ambos lípidos.

6.3. Influencia de la carga superficial aniónica de la bicapa sobre el transporte de R_9G_9

En las secciones anteriores se discutió la relevancia que adquiere la densidad de carga negativa frente a la carga catiónica de R_9 , y cómo ello favorece el proceso general de inserción del péptido. Posteriormente, también se comprobó que esta misma pArg, de la cual es ampliamente reconocida su acción como CPP, actuaba como un catalizador del proceso de inserción del péptido hidrofílico G_9 . En función de estos resultados surgió el interrogante sobre cuál sería el efecto de la densidad de carga negativa sobre el transporte del complejo R_9G_9 .

Para llevar a cabo el estudio se procedió de manera similar a lo expuesto en la sección anterior, no obstante aquí la variable fue la densidad de carga negativa. La CV nuevamente fue definida como la distancia en el eje z entre COM_{R_9} y COM_{bicapa} . Al sistema ya evaluado que contenía 50% DOPG, se le agregaron dos sistemas que representan nuevas condiciones de densidad de carga: una bicapa netamente constituida por DOPC (0% PG), y otra de DOPC-DOPG con 30% PG.

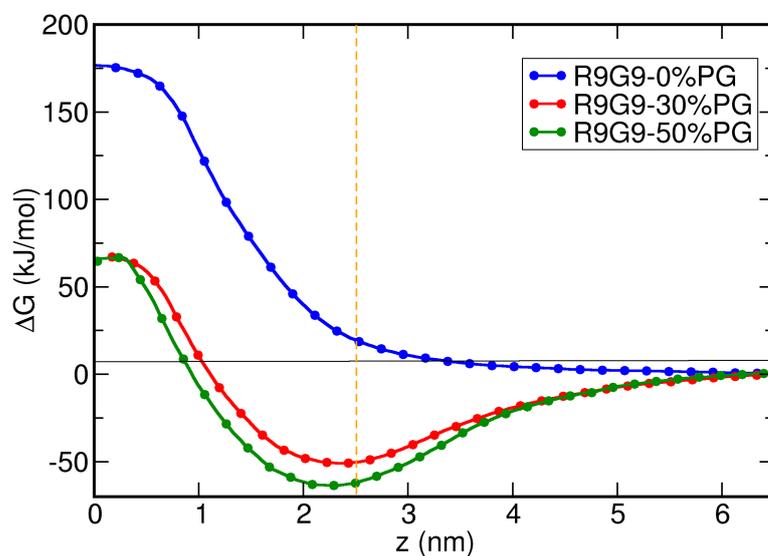


Figura 6.8 Perfiles de energía libre para los procesos de inserción del complejo R_9G_9 para concentraciones crecientes del lípido aniónico en la bicapa de DOPC-DOPG: 0% (azul), 30% (rojo) y 50% (verde) de DOPG.

En la Figura 6.8 se muestran los perfiles obtenidos para las tres condiciones de densidad aniónica evaluadas. A primera vista, los resultados muestran tendencias similares a las observadas en los sistemas previamente evaluados, para ΔG_{ads} : al aumentar la concentración de DOPG en la membrana desde 0 a 30%, aparece un mínimo de adsorción sobre la interfase

lípidos/solución, que posteriormente se acentúa levemente para 50%PG. Más aún, con el aumento de la densidad de carga negativa se puede observar un leve corrimiento del mínimo de adsorción hacia menores valores de z , es decir, hacia el centro de la bicapa.

Por otra parte, existe una reducción en ΔG_{ins} de ~ 115 kJ/mol, entre la bicapa neutra y la membrana con 30% de PG. Sin embargo, al comparar esta misma variable entre las bicapas con 30 y 50% PG se observaron valores similares, lo cual disiente con los resultados obtenidos para el CPP sólo. Es decir, un aumento de la densidad de carga negativa más allá del 30% no generó una mejoría (aumento) significativa en la velocidad de inserción del complejo R_9G_9 . Existen varios factores involucrados en este proceso que podrían dar explicación a este resultado. Una vez que el complejo se encuentra inserto en la bicapa, es posible que la presencia de G_9 evite que R_9 interactúe de manera efectiva con la bicapa, es decir, generaría una reducción de los contactos efectivos entre R_9 y las cabezas polares de DOPG en el poro hidrofílico. De esta manera, el efecto favorable de la electrostática se vería disminuido por G_9 . Otra hipótesis factible es el efecto *membranotrópico*¹⁹⁵ que ejerce G_9 sobre los lípidos: el hecho de insertar una macromolécula de mayor tamaño en la bicapa, introduce mayor desorden de los lípidos (mayor entropía), a una misma contribución entálpica favorable dada por las interacciones electrostáticas entre R_9 y DOPG. Más aún, otro aspecto importante es que el confinamiento impartido sobre G_9 al encontrarse en el interior del poro hidrofílico, genera una pérdida de grados de libertad conformacionales en el péptido, que contribuiría al aumento de la barrera energética del proceso de inserción.

A modo de resumen, la conjunción entre la adsorción favorable de R_9 y la inserción desfavorable de G_9 hacen de este proceso un término medio entre los correspondientes a cada péptido por separado. Es decir, la interacción electrostática que se establece entre las especies cargadas (R_9 y DOPG) actúa como fuerza impulsora de la inserción, generando un poro hidrofílico a través del cual el complejo R_9G_9 logra insertarse en la bicapa. No obstante, la ausencia de carga en G_9 junto con el mayor tamaño del complejo, hacen que el proceso sea más costoso.

6.4. Influencia del tamaño del cargo sobre el transporte mediado por R_9

Hasta el momento, el potencial de las pArg como CPPs ha sido ampliamente explotado en aplicaciones tales como el *drug delivery*, la terapia génica y el tratamiento del cáncer.^{61,196–198} En este contexto, estos péptidos han sido conjugados con cargos de naturaleza diversa: liposomas cargados con drogas (paclitaxel¹⁹⁹ o doxorubicina²⁰⁰), *quantum dots*,²⁰¹ péptidos,²⁰² proteínas,²⁰³ nanopartículas metálicas,²⁰⁴ ARN,^{205,206} fluoróforos.^{207–209} Nótese que cada uno de ellos presenta diferencias en cuanto a sus características químicas y físicas, esto es, tamaño, carga eléctrica, hidrofobicidad, forma, entre otras. Dichas propiedades impactan directamente sobre el mecanismo y la calidad del transporte de las pArg.

Este apartado se enfoca en caracterizar cuantitativamente cómo las propiedades del cargo modulan el transporte asistido por la pArg R_9 , a través de una bicapa lipídica. Con este objetivo, se diseñó una poliglicina lineal con 31 residuos, G_{31} , que triplicó en largo a G_9 , y mantuvo su estructura al azar. Es decir, la variable a evaluar en este caso es la masa molecular del cargo. Nuevamente se realizaron los cálculos de energía libre mediante US, pero se definieron dos CV distintas respecto a G_{31} : la distancia en el eje z entre (a) el centro de masa de la bicapa y el de G_{31} , y (b) el centro de masa de la bicapa y el extremo de G_{31} (posición del primer aminoácido). Para estos sistemas se decidió utilizar una bicapa con densidad de carga intermedia (DOPC-DOPG 70:30), ya que como fue expuesto en la sección anterior, aumentar la densidad de carga aniónica en la bicapa mas allá del 30 % de DOPG no generó mejoras significativas en la velocidad de inserción del complejo R_9G_9 .

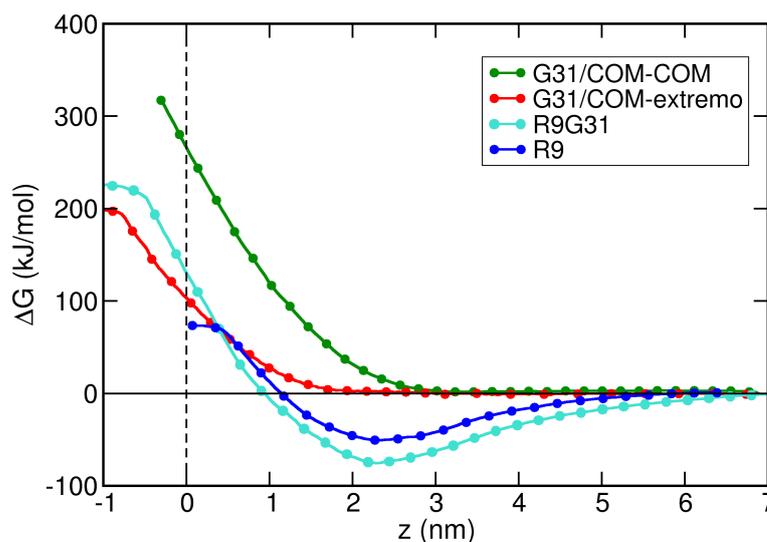


Figura 6.9 Perfiles de energía libre para los procesos de inserción de R_9 y G_{31} en una bicapa de DOPC-DOPG 70:30. En verde se muestra el perfil de energía libre para la variable colectiva definida como la distancia en el eje z entre el centro de masas de la bicapa y el centro de masa de G_{31} (COM-COM). En rojo se muestra el perfil de energía libre para la variable colectiva definida como la distancia en el eje z entre el centro de masas de la bicapa y el extremo de G_{31} (COM-extremo). En cian se presenta el perfil de energía libre para R_9G_{31} , donde la variable colectiva fue definida en función del centro de masas del complejo R_9G_{31} y el centro de masas de la bicapa. En azul se muestra el perfil de energía libre para R_9 cuya variable colectiva fue definida como la distancia en el eje z entre el centro de masas de la bicapa y el centro de masa de R_9 .

A partir de los resultados exhibidos en la Figura 6.9 y, comparativamente con los presentados en la Figura 6.8, se desprenden varios aspectos interesantes respecto al transporte de dichas macromoléculas. Para mayor claridad, en la Tabla 6.2 se listan los valores de ΔG para las dos pGly, sus complejos con R_9 , y la pArg sola.

ΔG (kJ/mol)	G_9	R_9G_9	G_{31}	R_9G_{31}	R_9
ΔG_{ins}	220 ± 7	65 ± 6	200 ± 7	220 ± 6	80 ± 5
ΔG_{ads}	20 ± 4	-50 ± 4	0 ± 1	-77 ± 3	-50 ± 4
ΔG_{act}	220 ± 6	115 ± 6	200 ± 5	307 ± 5	129 ± 5

Tabla 6.2 Valores de energía libre extraídos de las curvas presentadas en la Figuras 6.8 y 6.9 para los procesos de adsorción ($z \sim 2,5$ nm), inserción ($z = 0$ nm) y activación ($\Delta G_{act} = \Delta G_{estado\ de\ transición} - \Delta G_{ads}$), en una bicapa de DOPC-DOPG 70:30.

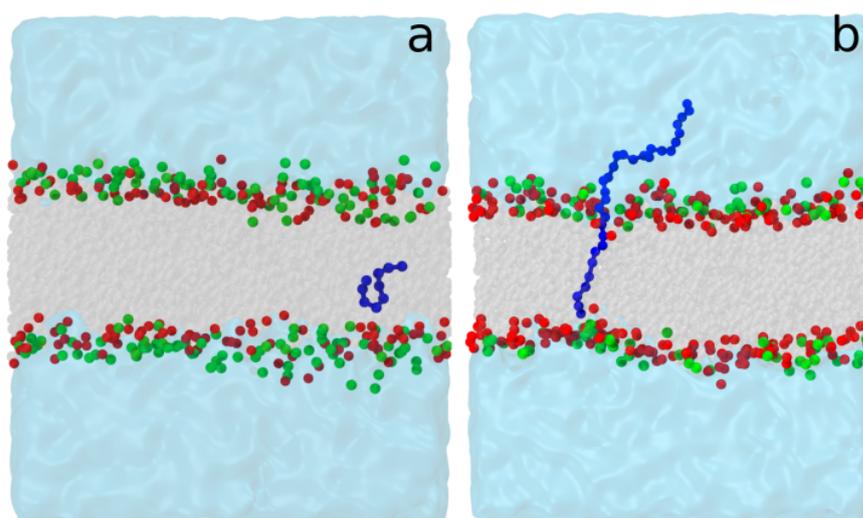


Figura 6.10 Renderizados que muestran la formación de un poro hidrofóbico tanto para (a) G_9 , como para (b) G_{31} .

En primer lugar, al comparar las energías de inserción de las pGly en ausencia de la pArg, se encontró que tanto G_9 como G_{31} requieren gastos energéticos de inserción similares. Dichos valores de ΔG_{ins} se pueden asociar al costo de apertura del defecto hidrofóbico a través del cual se insertan ambas pGly, como puede visualizarse en la Figura 6.10. Además, este mismo hecho explicó la diferencia en ΔG_{ins} entre las pGly y la pArg, ya que esta última se insertó formando un poro hidrofílico. Nótese que la Tabla 6.2 recoge los valores de ΔG para G_{31} cuya CV fue definida como la distancia z entre el centro de masa de la bicapa y el extremo de G_{31} .

En este punto adquiere relevancia la definición de la CV que se utilizó para G_{31} en cada caso. En ambos sistemas, G_{31} presentó una estructura globular tanto en solución como al encontrarse en contacto con la interfase lipídica, tal como se muestra en la Figura 6.11. Sin embargo, al intentar penetrar en la bicapa, el péptido que fue empujado desde su centro de masas (G_{31} COM-COM), el mismo produjo una deformación elástica de la misma, lo cual se tradujo en una elevada barrera energética: $\Delta G_{ins} \sim 320$ kJ/mol; 120 kJ/mol más elevada que al empujar el péptido desde el extremo (G_{31} extremo). Esta diferencia entre ambos sistemas se logra explicar, al menos en parte, al observar en la Figura 6.11 (COM-extremo, parte inferior derecha) que el extremo de G_{31} penetra en la bicapa, facilitando a posteriori la inserción del resto del péptido en el defecto hidrofóbico. En cambio, la forma globular de G_{31} COM-COM generó una deformación de la membrana que produjo un gran aumento en ΔG_{ins} , sin lograr finalmente insertarse en la misma. Se puede concluir que la forma en que se definió la variable colectiva produjo diferencias en la forma en que G_{31} interactuó con la bicapa y esto eventualmente

impactó en el perfil de energía libre que se obtuvo en cada caso.

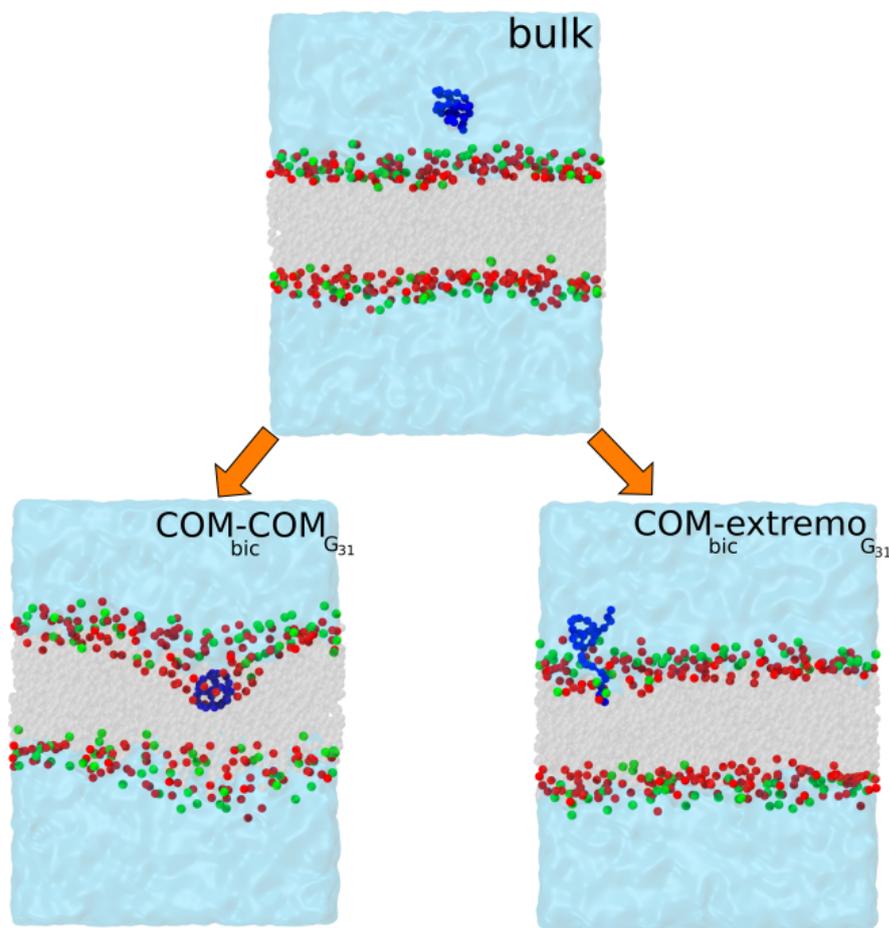


Figura 6.11 Renderizados de la estructura del péptido G_{31} donde se compara la forma en que interactúa con la bicapa en función de la definición de la CV: a la izquierda la CV fue $COM_{bic}-COM_{G_{31}}$, mientras que a la derecha fue $COM_{bic}-extremo$ de G_{31} . Cabe destacar que el péptido en solución tiene una disposición espacial tipo globular.

Como se presentó en la sección anterior, la pArg ejerció un efecto catalizador sobre la pGly G_9 , ya que el complejo presentó una barrera de inserción 70% menor a la de la pGly individual (ver Tabla 6.2). En consecuencia, se procedió a evaluar si este efecto podría extrapolarse a la pGly de mayor peso molecular, G_{31} . En este caso se obtuvieron magnitudes de ΔG_{ms} comparables tanto para la pGly individual como para su complejo con R_9 , a partir de lo cual se advierte que esta última no facilitó el transporte del cargo a través de la membrana. Si se discriminan los distintos componentes energéticos del proceso se puede observar que mientras ΔG_{ads} es similar para R_9G_9 y R_9G_{31} (para igual densidad de carga en la membrana), los valores de energía de activación de cada proceso difieren ampliamente entre sí: ΔG_{act} para R_9G_{31} casi triplica el valor de ΔG_{act} para R_9G_9 , lo cual es consistente con el mayor tamaño del complejo.

6.5. Conclusiones parciales

En base a los resultados expuestos en este capítulo, queda claro que, en general, la energía de inserción de la pArg individual resultó menor que la de sus complejos con pGly. Esto se encuentra respaldado por observaciones experimentales *in vitro* realizadas por Maiolo *et. al.*,²¹⁰ en las que se evidenció una reducción general en la eficiencia de internalización de los complejos pArg-cargo con respecto a las pArg individuales, lo cual es consistente con los valores de ΔG_{ins} presentados en esta tesis.

En cuanto al proceso de adsorción, se encontró que la entidad catiónica R₉ introduce una interacción electrostática favorable con la bicapa aniónica, que finalmente controla el proceso de unión de los complejos R₉-pGly. No obstante, esta energía de adsorción favorable no resultó ser el factor determinante en el transporte de las pGly, ya que el aumento en la densidad de carga aniónica en la bicapa (σ^-) no produjo una reducción en la barrera de inserción, al menos en el caso de R₉G₉.

Por otro lado, el aumento del tamaño del cargo (G₉ vs G₃₁), resultó un factor negativo respecto a la inserción del complejo en la bicapa. En otras palabras, mientras que R₉ ejerció su efecto CPP sobre la pGly de menor tamaño, no modificó considerablemente la barrera energética de inserción en el caso de G₃₁. Sin embargo se debe tener en cuenta que el presente estudio se centró en el análisis de la inserción del complejo asociado a una única pArg (concentración de R₉ constante). En este sentido, Park *et. al.* observaron una correlación directa entre la concentración superficial de R₉ en nanopartículas poliméricas que transportaban ARN, y la localización intracelular de este último.²⁰⁵

Capítulo 7

Efecto de las propiedades mecánicas de bicapas lipídicas sobre el proceso de adsorción/inserción de R₉

En este capítulo se discute cómo la fluidez de distintas membranas modelo modula la interacción con la pArg KR₉C. Específicamente se estudiaron tres modelos de membrana: monocapas, vesículas unilamelares grandes (LUVs) y gigantes (GUVs), analizando diferentes composiciones lipídicas. En monocapas, se analizaron las características morfológicas de cada mezcla lipídica, así como su respuesta ante la inserción de KR₉C. En LUVs se realizó un seguimiento temporal del potencial zeta en función de la concentración *bulk* creciente de la pArg. De esta manera, se realizó una evaluación sobre cómo las propiedades de las vesículas modulan la interacción con el CPP. En el caso de las GUVs, se realizó un análisis de las fluctuaciones de la membrana a concentraciones crecientes de KR₉C. Así se determinó la influencia de la pArg sobre la estabilidad de las bicapas.

En conjunto, los resultados presentados en este capítulo plantean otro aspecto relevante del proceso de traslocación de R₉: las propiedades mecánicas de la membrana blanco.

7.1. Adsorción de KR₉C sobre LUVs: análisis del potencial zeta, ζ

Las vesículas unilamelares son sistemas ampliamente utilizados como modelos para estudiar la interacción péptido-lípido. Más precisamente en esta tesis fueron utilizadas para estudiar la afinidad de la pArg KR₉C por bicapas lipídicas aniónicas con diferentes propiedades mecánicas. Para ello se sintetizaron LUVs de dos composiciones diferentes: una de las mezclas consistió en DOPC-DOPG 50:50 y la otra en DPPC-DOPG 50:50. El objetivo detrás de dichas composiciones fue obtener vesículas con una misma densidad aniónica superficial pero con propiedades mecánicas distintas, ya que la presencia de un lípido zwitteriónico saturado (DPPC) genera mayor rigidez en la membrana que cuando el fosfolípido tiene ambos grupos acilo insaturados (DOPC). Esto se debe a que las cadenas hidrofóbicas de los lípidos saturados, por su disposición espacial, establecen interacciones de Van der Waals más efectivas, por lo tanto, definiendo un ordenamiento lateral más compacto en la membrana.

Al dispersar una partícula cargada en una solución acuosa, se desarrolla una doble capa eléctrica sobre su superficie.²¹¹ La primera capa que rodea a la partícula consta de iones de carga opuesta a la partícula (capa de Stern). A continuación, se localiza una segunda capa, donde los iones pueden difundir con mayor libertad, por lo que se denomina capa difusa. Sobre esta última se define una frontera imaginaria denominada plano de deslizamiento ($a \sim 0,2$ nm de la superficie de la partícula),²¹² que divide el solvente que migra con la partícula del solvente que permanece en reposo. La diferencia de potencial en este plano respecto al del seno de la solución se denomina potencial zeta o electrocinético, ya que la partícula responde al campo eléctrico externo de acuerdo al potencial en ese plano.²¹³ De esta manera, la técnica permite obtener información sobre la movilidad electroforética de las partículas en solución que migran hacia el electrodo de carga opuesta, y a partir de ésta determinar el ζ mediante ecuaciones adecuadas.

En esta tesis, se utilizó esta técnica para evaluar la existencia de una interacción favorable entre la pArg y las vesículas aniónicas. En principio, la carga catiónica del péptido establecería una interacción electrostática con las membranas compuestas por lípidos aniónicos, por lo que el uso de ζ como una medida de la afinidad de KR₉C por la vesícula sería adecuado, ya que la movilidad electroforética inicial de las vesículas debería verse alterada tras la adsorción/inserción del péptido y esto se vería reflejado en el valor del potencial ζ .

Para poder medir el parámetro en cuestión, se adicionaron volúmenes de KR₉C a una alícuota de suspensión de LUVs de 100 nm de diámetro, de manera tal que se alcanzaran concentraciones de 1; 2,5; 5 o 10 μ M. Posteriormente, se registraron dos medidas de potencial ζ por cada muestra, siendo el resultado mostrado en la Figura 7.1.a el promedio de estas \pm SE.

El eje x de la Figura 7.1.a representa la relación péptido/lípido, para lo cual se cuantificó la cantidad de lípido presente en la muestra final de cada medida utilizando el método de Bradford explicado en el Capítulo 3. En primer lugar, la figura evidencia que la presencia de la pArg efectivamente produjo una alteración del ζ de las vesículas, independientemente de la composición de las mismas. Más precisamente, el potencial ζ fue más positivo para las muestras en presencia de mayor concentración de péptido. Esto indica que KR₉C se adsorbió sobre la superficie de las vesículas. Este resultado confirma lo anteriormente discutido en el Capítulo 5 en el cual se demostró que KR₉C se adsorbió en monocapas aniónicas de DMPG. Asimismo, en el Capítulo 6 los estudios *in silico* evidenciaron que R₉ se adsorbió favorablemente ($\Delta G_{ads} < 0$) cuando la bicapa lipídica contenía al menos 10% de DOPG, mientras que no existió adsorción espontánea cuando la bicapa era neutra.

En pos de una comparación más eficaz entre mezclas, en la Figura 7.1.b se muestran los resultados de ζ en función de la relación $P/L_{1/2}$, es decir, la relación péptido/lípido que genera la mitad de la respuesta total en ζ . Para la relación $P/L_{1/2}$, se consideró la concentración absoluta de lípido en masa (ver método de determinación de lípido total en Capítulo 3, sección 4.1). Como se puede observar, las vesículas de DPPC-DOPG presentaron menor $P/L_{1/2}$ que las de DOPC-DOPG.

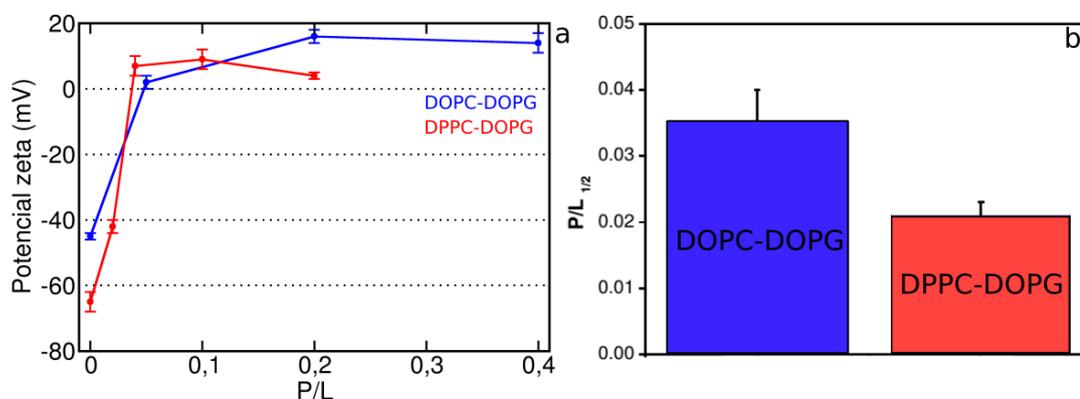


Figura 7.1 (a) Curvas de potencial zeta (ζ) en función de la relación P/L para las mezclas de DOPC-DOPG (azul) y de DPPC-DOPG (rojo). (b) Relación $P/L_{1/2}$ para DOPC-DOPG 50:50 (azul) y de DPPC-DOPG 50:50 (rojo).

En general, se propone que la adsorción e inserción de proteínas cargadas a vesículas con carga opuesta se lleva a cabo en dos etapas.²¹⁴ En la primera, la fuerza impulsora es la interacción electrostática que deriva en la neutralización de la zona de contacto.²¹⁵ La segunda etapa involucra interacciones hidrofóbicas y/o puentes de hidrógeno, e incluso una ruptura significativa de la membrana. De acuerdo con esta premisa, los resultados reportados aquí describen la primera fase de unión del péptido a la vesícula, que corresponden a la atracción electrostática que neutraliza la carga aniónica de las vesículas.

Estudios realizados sobre la interacción de péptidos catiónicos con membranas lipídicas, demuestran que el ζ de LUVs aniónicas se volvió menos negativo, o incluso positivo, a medida que la relación P/L aumentó. Específicamente, Takechi *et al* obtuvieron una tendencia similar a la presentada en la Figura 7.1.a, incluso con valores de potencial similares para cada P/L al estudiar la adsorción de una pArg de mayor tamaño que KR₉C sobre vesículas aniónicas de composición más compleja.²¹⁶ Una evaluación análoga fue realizada con otra pArg alcanzando resultados similares: las vesículas de PG adquirieron valores de ζ progresivamente menos negativos a medida que se incrementó la relación P/L.²¹⁷

Para constatar la estabilidad de las vesículas frente al agregado del péptido, se realizaron mediciones por dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés), reproduciendo las relaciones P/L a las cuales se midió ζ . En la Figura 7.2 se presentan los gráficos de distribución de tamaño de las vesículas para ambas mezclas a concentraciones crecientes de KR₉C. En ambos casos, el incremento de la concentración de KR₉C mantuvo las estructuras iniciales de ~ 100 nm de diámetro, es decir, las vesículas de ambas mezclas resultaron estables frente a la presencia del péptido.

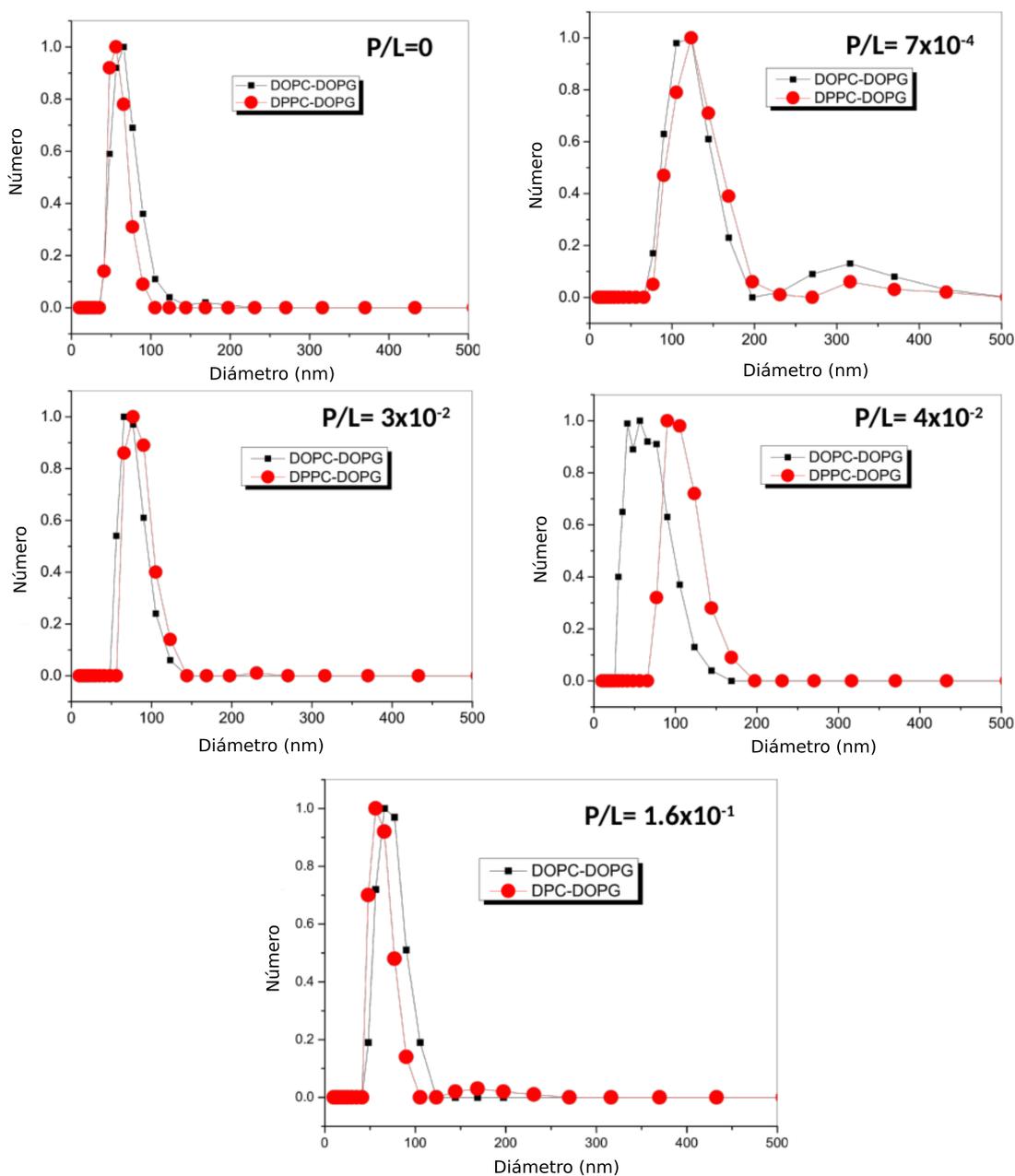


Figura 7.2 Gráficos obtenidos mediante DLS para las mezclas DOPC-DOPG y DPPC-DOPG a relaciones P/L crecientes. Estas curvas evidencian la presencia de LUVs de diámetro ~100 nm, en todo el rango de concentración de KR₉C evaluado.

7.2. Interacción de KR₉C con monocapas lipídicas

Para poder profundizar sobre el comportamiento de ambas composiciones respecto a la interacción con la pArg, se realizaron experimentos en monocapas que fueron realizados por el Dr. Crosio, miembro activo del grupo de Biofísica bajo la dirección de la Dra. Natalia Wilke.

Estudios previos aseguran que tanto en bicapas²¹⁸ como en monocapas^{219,220}, las mezclas de PG y PC saturadas no presentan separación de fases siempre y cuando (a) ambos lípidos contengan grupos acilos idénticos en longitud (ej. palmitoil en DPPC y DPPG), y (b) se encuentren en ausencia de iones complejantes en el medio (ej. el calcio).²¹⁹ En principio, la miscibilidad de esta mezcla estaría favorecida por la interacción puente de hidrógeno entre las cabezas polares de dichos lípidos (específicamente entre grupos fosfato e hidroxilo), y por la repulsión electrostática entre los grupos polares de PG, que disminuye al diluirse en la PC. Ante la presencia de cationes complejantes estas interacciones disminuyen y se ve favorecida la separación de fases. Tal fue el caso registrado por Koppenol *et. al*, en el cual el agregado de calcio en la subfase acentuó la separación de fases en monocapas mezcla de DPPC-DOPG.²²¹

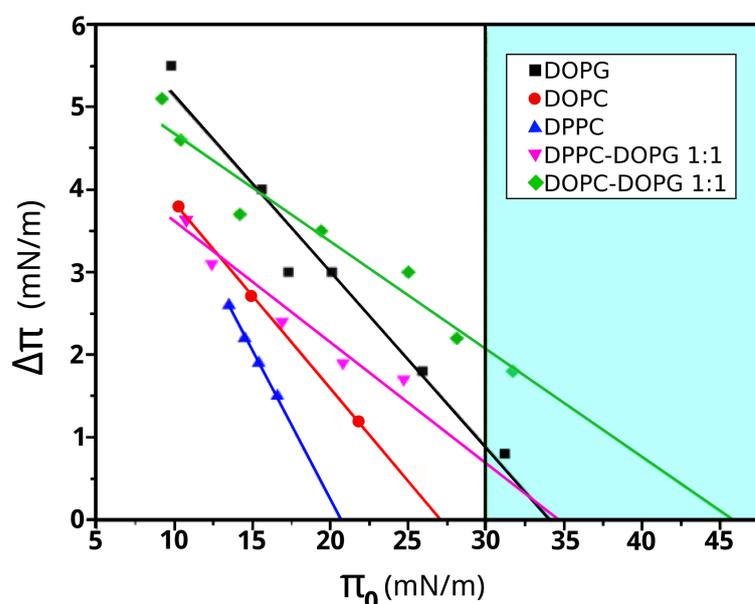


Figura 7.3 Gráfico de $\Delta\Pi$ vs Π_0 para las monocapas puras de DPPC, DOPC, DOPG, y de las mezclas DOPC-DOPG y DPPC-DOPG. Estas curvas representan los valores de *cut-off* para KR₉C, es decir, la máxima presión lateral a la cual el péptido se incorpora en la monocapa. La región del gráfico de color celeste señala las condiciones comparables con bicapas.

Los resultados obtenidos se graficaron como curvas $\Delta\Pi$ vs Π_0 , donde el valor *cut-off* es la extrapolación al eje de coordenadas, es decir, el valor de Π_0 para el cual $\Delta\Pi = 0$, y se entiende como la presión superficial a la cual el péptido ya no ingresa más a la monocapa. En la Figura 7.3 se presenta dicho gráfico, en el cual se observa que la mezcla de DOPC-DOPG presentó un valor de *cut-off* mayor que la de DPPC-DOPG. Es decir que dicha mezcla permite la incorporación de péptido a mayores Π , lo cual resulta razonable dada su mayor fluidez. Más aún, se debe destacar que las mezclas de fosfolípidos presentaron un efecto sinérgico que favoreció la incorporación del péptido en las mezclas respecto a las monocapas puras. En el caso de DPPC

puro, dada las características fisicoquímicas del lípido, la menor presión inicial lograda fue de 13 mN/m. De todas formas, se realizaron otras mediciones a Π_0 de 14, 15 y 16 mN/m, por lo que se puede hacer un ajuste lineal y extrapolarlo al valor que se obtendría a 10 mN/m, si se quisiera comparar con los $\Delta\Pi$ obtenidos para los otros casos.

En segundo lugar se realizó un análisis de coexistencia de fases mediante microscopía de fluorescencia. Para ello se adicionó un fosfolípido marcado con una sonda fluorescente (Rho-PE) a la eventual mezcla lipídica en estudio. A continuación, se procedió a compactar la monocapa hasta una presión superficial a la cual la densidad lipídica es similar a la de bicapas, esto es, $\Pi = 30$ mN/m. En la Figura 7.4 se muestra la evolución temporal de las monocapas de DOPC-DOPG y de DPPC-DOPG a $\Pi_0 = 30$ mN/m tras inyectar KR₉C en la subfase. Nótese que $t = 0$ indica el estado de la monocapa previo a dicha inyección.

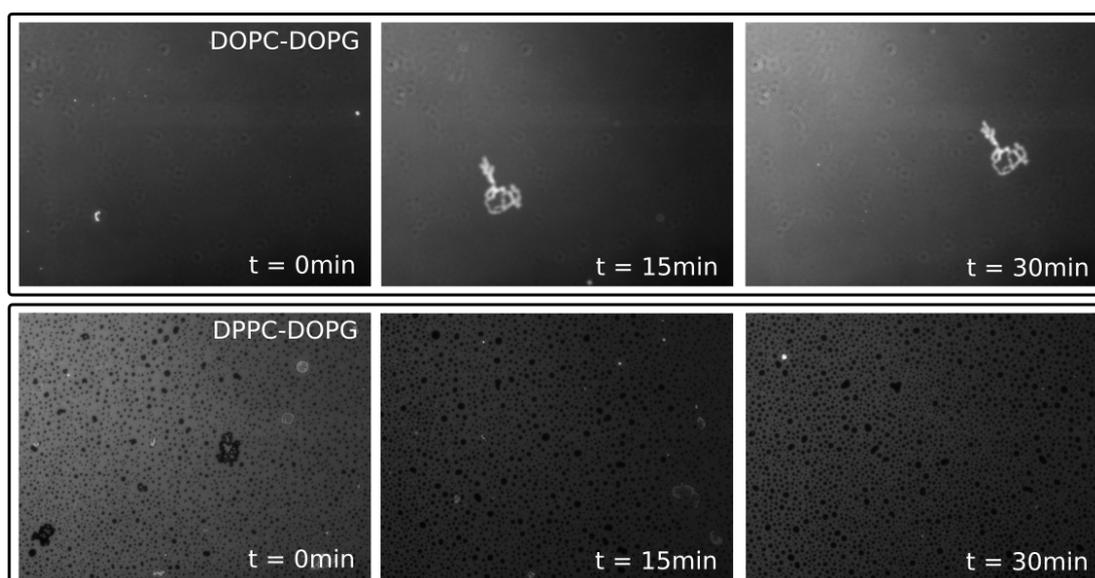


Figura 7.4 Micrografías de fluorescencia de monocapas de DOPC-DOPG (panel superior) y de DPPC-DOPG (panel inferior) tras inyectar KR₉C en la subfase a una concentración final de 10 μ M. Cabe destacar que a $t = 0$ min, el péptido aún no había sido inyectado. Se puede observar que mientras en la monocapa de DOPC-DOPG, prevalece la existencia de fase fluida al término del experimento (30 min), en la monocapa de DPPC-DOPG se acentuó aún más la presencia de dominios de fase condensada (oscura).

Como se puede observar, en el caso de la mezcla DOPC-DOPG, prevaleció la existencia de la fase fluida hasta la finalización del experimento ($t = 30$ min). Por otro lado, en la mezcla DPPC-DOPG se registró la presencia de dominios desde $t = 0$, y se observó un aumento del porcentaje de área cubierta por fase sólida (oscura) en el tiempo. En otras palabras, la interacción de KR₉C con la monocapa favoreció la segregación de fases en esta mezcla. Más aún, al compactar la monocapa en ausencia de péptido, a una Π semejante a la Π_f a la cual

se llegó tras inyectar el péptido, no se observó un aumento significativo de fase sólida. Esto significa que el aumento de fase sólida observado al inyectar el péptido ($\sim 25\%$), no solo fue causado por el incremento en la presión debido a la incorporación del péptido, sino que éste efectivamente genera en la monocapa regiones compactas donde la sonda no es soluble.

7.3. Análisis morfológico de GUVs en presencia de KR₉C

Se sabe que tanto la curvatura como la tensión de la membrana son factores que influyen sobre la incorporación de CPPs en vesículas.²²² En este sentido, las GUVs representan un sistema modelo caracterizado por una curvatura pequeña, tensión controlable y una superficie amplia que puede ser fácilmente visualizada mediante microscopía.²²³ Asimismo, estas vesículas resultan sensibles a los parámetros ambientales tales como la temperatura, el campo eléctrico, las restricciones mecánicas, la modificación local de su composición así como a la inserción de compuestos exógenos; siendo todos ellos factores que alteran el equilibrio energético de la bicapa.^{224,225}

Las bicapas lipídicas sufren fluctuaciones térmicas que deforman la membrana, incluyendo el estiramiento y la torsión. Estos mismos parámetros mecánicos pueden ser utilizados para estudiar la interacción de drogas con membranas lipídicas. Este análisis se basa en el principio de que la incorporación de una molécula externa a la bicapa podría alterar las interacciones lípido-lípido, es decir, el empaquetamiento lipídico y, eventualmente, las propiedades mecánicas de la membrana.²²⁶ Con este objetivo, se procedió a evaluar el efecto de KR₉C sobre la forma de vesículas unilamelares gigantes compuestas por DOPC-DOPG 50:50 y por DPPC-DOPG 50:50.

Como se expuso anteriormente, dichas composiciones representan mezclas que se diferencian entre sí por su fluidez. De esta manera, se buscó identificar cómo la interacción del CPP afectó la respuesta (fluctuaciones) de vesículas con propiedades mecánicas distintas.

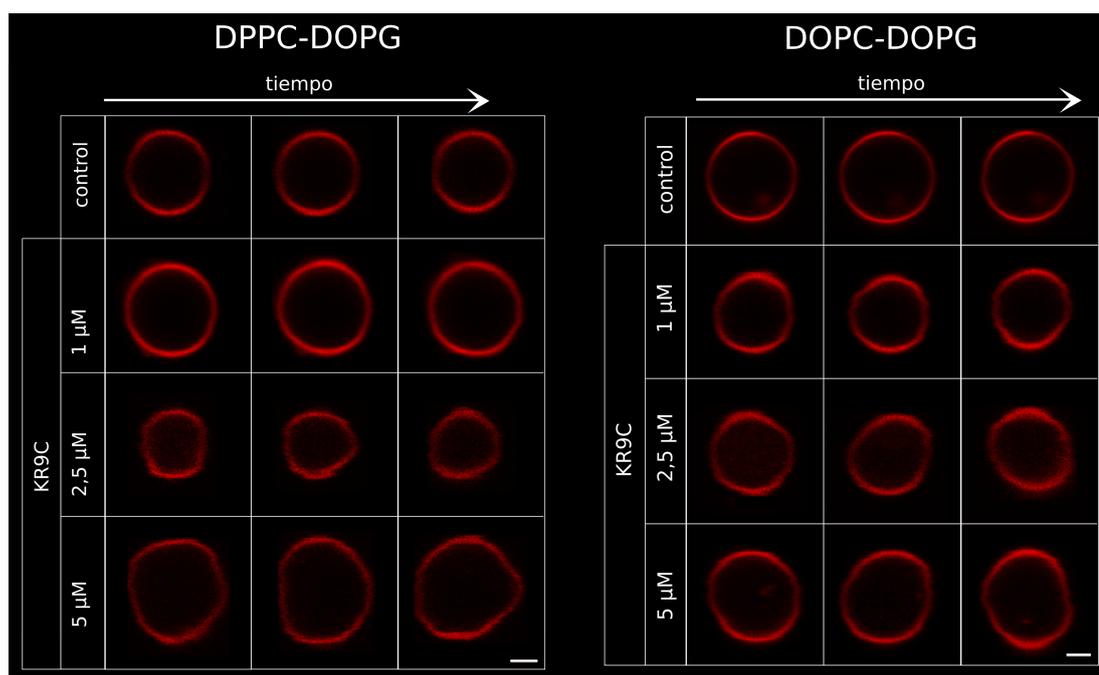


Figura 7.5 Micrografías de fluorescencia de GUVs. Se presentan vesículas de DPPC-DOPG (panel izquierdo) y DOPC-DOPG (panel derecho), sometidas a distintas concentraciones de KR₉C: 0 (control); 1; 2,5 y 5 μ M. En cada panel, de izquierda a derecha, se pueden apreciar tres imágenes secuenciales de cada vesícula. La escala de ambos paneles equivale a 2 μ m.

En la Figura 7.5 se muestra una vesícula individual de cada mezcla, bajo las distintas condiciones de concentración de KR₉C. En dicha secuencia temporal, se puede apreciar que para ambas mezclas se observan fluctuaciones de forma respecto a su control y que las mismas aumentan con la concentración. La variación en la fluctuaciones de las vesículas es sutil (a simple vista es difícil determinar si una vesícula fluctúa más que otra), por lo cual se realizó una cuantificación mediante el software *Image J*. Cabe destacar que las vesículas colocadas en la Figura 7.5 son representativas dentro su población.

A partir de las micrografías obtenidas de cada vesícula se realizó un análisis de la forma de las vesículas, específicamente, de su relación de aspecto AR, en un período de tiempo (ver ecuación en Capítulo 3). Para cada vesícula se obtuvo un valor AR promedio con su respectiva desviación estándar (SD), y se procedió a graficar dichos datos de SD en histogramas. De esta manera, se buscó realizar comparación de la respuesta poblacional de las vesículas ante la presencia de concentraciones crecientes de péptido.

En la Figura 7.6 se muestran los histogramas de la desviación estándar de AR para todas las vesículas analizadas por cada condición de concentración de KR₉C. Al observar los

histogramas se puede apreciar que al aumentar la concentración de la pArg, en ambos casos la desviación estándar se desplaza hacia la derecha. Esto indica un aumento en la fluctuación de las vesículas con la concentración. Se debe aclarar que sólo se realizó un análisis general de estos histogramas, ya que para determinar diferencias significativas entre cada condición se debería realizar un test estadístico, para lo cual se necesita mayor cantidad de datos. Además, no se puede realizar una comparación directa entre los histogramas de ambas mezclas ya que cada una de ellas debe ser normalizada en función de su condición control.

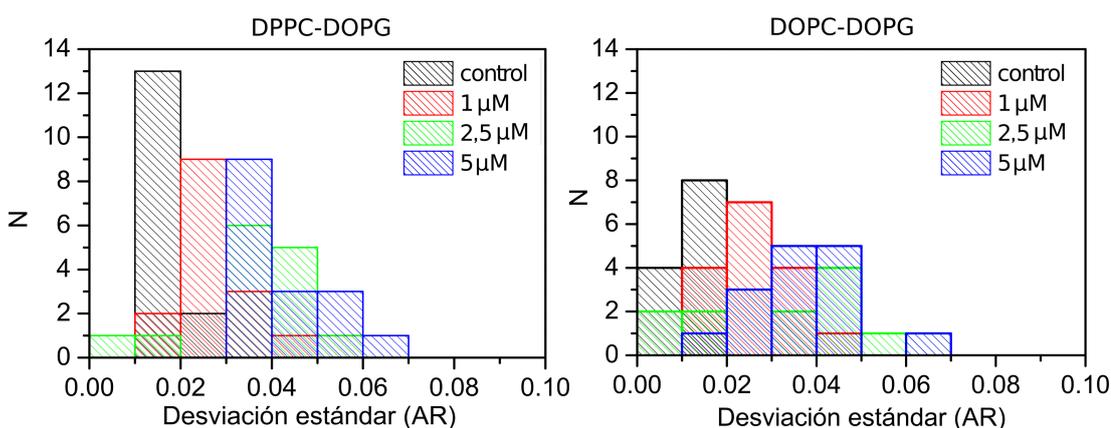


Figura 7.6 Histogramas de la desviación estándar de la relación de aspecto, para las concentraciones de KR₉C de 0; 1; 2,5 y 5 μM. A la izquierda se muestra el histograma para la mezcla DPPC-DOPG, y a la derecha el de DOPC-DOPG. En ambos casos, en color negro se representa la condición control, en rojo la condición con 1 μM, en verde la de 2,5 μM y en azul la de 5 μM.

A continuación se analizó la relación entre la concentración de KR₉C y la cantidad de vesículas fluctuantes. Estas últimas fueron definidas como aquellas cuya SD es superior al percentil 95 (P95) de la población menos fluctuante (condición control), acorde al protocolo detallado en el Capítulo 3 y anteriormente utilizado en el grupo de la Dra. Wilke.²²⁷ Cabe destacar que este análisis se realizó independientemente para cada composición lipídica, es decir, hubieron dos valores de P95 definidos en función de su condición control.

En la Figura 7.7 se muestra el porcentaje de vesículas fluctuantes en función de la concentración de KR₉C. A modo general, el gráfico pone en evidencia que tanto las vesículas de DOPC-DOPG como las de DPPC-DOPG son sensibles a la presencia del péptido en el medio. Es decir, KR₉C afectó las propiedades mecánicas de las vesículas independientemente de la composición. Sin embargo, se pudo observar que la cantidad de vesículas fluctuantes de DOPC-DOPG fue levemente superior al caso de DPPC-DOPG, en presencia del péptido. Aquí cabe aclarar que las vesículas también fueron expuestas a una concentración de KR₉C de 10 μM, observándose la ruptura de un elevado porcentaje de las GUVs de DPPC-DOPG, razón por

la cual esta condición no fue tomada en cuenta para la cuantificación.

Comparativamente, ambas mezclas presentaron una tendencia creciente de vesículas fluctuantes con la concentración (ver Figura 7.7). Sin embargo, la respuesta de cada mezcla se puede comprender mejor al correlacionarlas con las descripciones realizadas previamente en monocapas y LUVs. En el caso de la mezcla DOPC-DOPG, dada la prevalencia de la fase fluida observada en monocapas, la mezcla presentó un valor de *cut-off* elevado (ver Figura 7.3), razón por la cual también las LUVs se saturaron a mayor relación P/L (ver Figura 7.1.a). De forma contraria, la monocapa mezcla de DPPC-DOPG presentó dominios de fase condensada (ver Figura 7.4), por lo cual es más rígida y su valor de *cut-off* más pequeño. Asimismo, estos valores de *cut-off* explican el hecho de que las LUVs de DPPC-DOPG presentaron menor $P/L_{1/2}$ que las de DOPC-DOPG (ver Figura 7.1.b). En este sentido, existe evidencia experimental que sugiere que, por ejemplo, la Penetratina induce la formación de túbulos en GUVs que presentan fase fluida, pero no así en vesículas que son más rígidas.^{187,228}

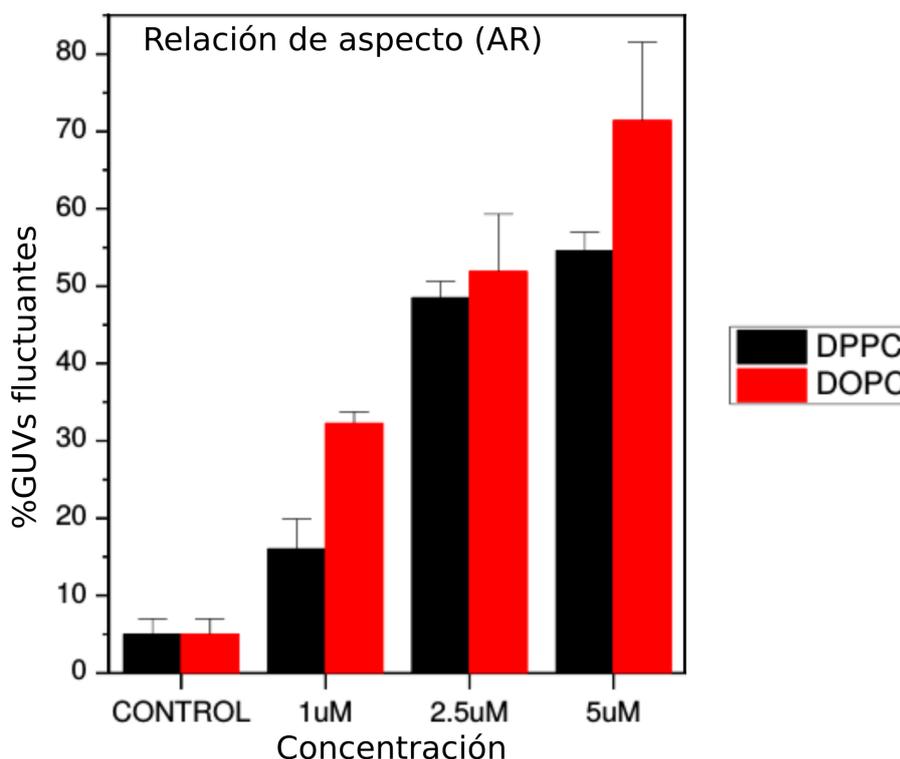


Figura 7.7 Porcentaje de la población de GUVs que fluctúan para cada condición de concentración de KR₉C. El parámetro evaluado fue la relación de aspecto de cada vesícula, es decir, la relación entre sus ejes mayor y menor. Se evaluaron 15 GUVs por cada condición de concentración en dos experimentos independientes, por lo que el valor representado es el promedio \pm SE.

Se debe tener en cuenta que la forma de una GUV individual se encuentra determinada por la mínima energía de flexión (*bending rigidity*), dados ciertos volumen, área superficial y diferencia de área entre las hemicapas externa e interna (ΔA). La adsorción/inserción de un compuesto exógeno -como es KR₉C- debería producir un aumento en ΔA , lo cual altera el equilibrio energético de la vesícula: se produce un rearrreglo de los lípidos de membrana, que eventualmente genera la destrucción de la vesícula. En ese sentido, la mayor rigidez de la mezcla de DPPC-DOPG logra explicar la sensibilidad de estas vesículas a la ruptura. Más aún, el hecho de que KR₉C promoviera segregación de fases al interactuar con monocapas de esta mezcla, incrementa la probabilidad de aparición de defectos de membrana en los bordes de dominio.

7.4. Conclusiones parciales

El análisis realizado en este Capítulo permitió evaluar la influencia de la pArg sobre las propiedades mecánicas de dos mezclas lipídicas (DOPC-DOPG 50:50 y DPPC-DOPG 50:50), en tres modelos de membrana: monocapa, LUVs y GUVs. A la luz de los resultados, queda claro que la fluidez de la membrana es un factor importante respecto a la deformación que puede inducir la pArg.

En suma, los experimentos presentados en esta sección sugieren que el CPP induce cambios apreciables en la forma y la rigidez de GUVs de DOPC-DOPG y DPPC-DOPG, los cuales podrían atribuirse a cambios en las constantes elásticas de la bicapa lipídica. Es importante además destacar que el estudio del efecto de las pArg sobre las propiedades mecánicas de bicapas lipídicas continúa siendo estudiado en el grupo de la Dra. Wilke. De esta manera, los resultados presentados en esta sección podrán adquirir otra relevancia a la luz de los nuevos descubrimientos.

Capítulo 8

Conclusiones Generales

En la presente tesis se analizó la interacción, incorporación y posterior traslocación de péptidos de penetración celular a través de membranas lipídicas neutras y cargadas de diferente composición. Se utilizaron tanto métodos experimentales como simulaciones computacionales. En particular, se estudió el efecto de los siguientes parámetros del péptido y de la membrana sobre la adsorción e incorporación del péptido en agregados lipídicos 2D:

- hidrofiliidad del péptido
- potencial transmembrana y del potencial dipolar de la membrana
- carga superficial de la membrana
- rigidez de la membrana

Además se analizó la capacidad de un péptido en particular para atravesar membranas con cargos de diferentes tamaños.

Los resultados presentados en esta tesis indican que un potencial electrostático aplicado a través de una bicapa reduce la barrera energética del proceso de inserción, afectando levemente la adsorción de las pArg (R_9 y R_8W_3) en la interfase lipídica. Las pArg son impulsadas a migrar a través de la membrana a favor del gradiente electrostático debido a que son macroiones positivos. A su vez, el movimiento del macroion disminuye el potencial transmembrana del sistema.

En el contexto del efecto de la electrostática de la membrana sobre la interacción péptido-membrana, el potencial dipolar resulta ser un parámetro clave. Los experimentos realizados con monocapas de ácidos grasos perfluorados e hidrogenados indican que potenciales dipolares negativos favorecen notablemente la inserción del macroion catiónico. Con respecto a la densidad de carga superficial negativa dada por la presencia de lípidos aniónicos en la membrana, se demostró que se induce una energía de adsorción favorable sobre el péptido, con un consecuente aumento en la concentración local de péptido en la superficie de la membrana. Sin embargo, este hecho no correlaciona en todos los sistemas con una inserción más favorable de la pArg. Por un lado, los experimentos con monocapas de DMPG indican que KR_9C se adsorbe en la interface pero no se incorpora en la región de las cadenas hidrocarbonadas. Por otro lado, en simulaciones de bicapas con cantidad creciente de PG se probó que una mayor densidad

aniónica hace más negativa la energía de adsorción, sin embargo la energía de activación no sufre cambios considerables.

En cuanto a la identidad química de las especies que forman la membrana, se encontró que la presencia del grupo carboxilato favorece considerablemente el proceso de incorporación y de traslocación de la pArg. A esta conclusión se arribó por medio de experimentos con monocapas y de simulaciones. Esto puede deberse, por un lado, al conocido efecto quelante del guanidinio de la arginina sobre el carboxilato del ácido graso, y por el otro, al menor costo entrópico de reorganizar un lípido de una sola cadena hidrofóbica con respecto a uno de dos, cuando el péptido se encuentra dentro de la bicapa.

El estado de fase de la membrana aparece como otro factor de regulación en la interacción y traslocación de péptidos. Los experimentos preliminares presentados en esta tesis sugieren que el péptido es capaz de incorporarse más efectivamente a membranas en estado líquido-desordenado, mientras que a su vez la capacidad lítica del péptido en estas membranas es menor. Esto puede deberse, por un lado, al menor costo energético requerido para producir la deformación de la membrana al ingresar el péptido, y por el otro, a la capacidad de estas membranas a deformarse sin romperse. A diferencia de las membranas fluidas, las membranas rígidas son poco deformables, por lo que tienden a romperse con mayor facilidad.

Con respecto a las características del péptido se encontró, como era esperable, que la adsorción y la traslocación se ven favorecidas para péptidos anfipáticos con respecto a los hidrofílicos.

Se encontró que una molécula de CPP es suficiente para catalizar la traslocación de un cargo hidrofílico pequeño aunque, como es de esperar, el aumento del tamaño del cargo limita la inserción del complejo en la bicapa. Es probable que mientras mayor sea el volumen del cargo, más moléculas de CPP sean necesarias para promover su transporte pasivo a través de la bicapa lipídica.

Más allá del modelo que logre explicar el mecanismo de traslocación de las pArg, todos los parámetros evaluados en esta tesis efectivamente presentan un papel activo en el transporte: (1) la densidad superficial de carga negativa favorece la adsorción y preconcentración de la pArg en la interfase agua/lípido; (2) la presencia de un ácido graso reduce la energía de activación

del proceso de inserción; (3) el potencial transmembrana actúa promoviendo la cinética de traslocación de las pArg en favor del gradiente electrostático.

Capítulo 9

Perspectivas a futuro

- Resulta relevante estudiar el proceso de inserción de R_9G_9 en bicapas que contengan PA ionizado, mediante simulaciones computacionales. De esta forma se podría determinar si el efecto catalizador de los ácidos grasos ionizados se puede extrapolar al transporte del CPP con el cargo hidrofílico.
- Con el objetivo de obtener una visión *in silico* global sobre los estudios experimentales realizados en GUVs, sería interesante analizar el patrón de fluctuación de una bicapa de DPPC-DOPG 50:50 en contacto con 100 R_9 .
- Analizar la interacción de KR_9C con membranas modelo cuya composición incluya al colesterol. De esta forma se extiende el estudio a membranas en estado de fase líquido-ordenado.
- Realizar estudios de deformación de membrana en GUVs mediante el uso de pinzas ópticas. El objetivo sería analizar posibles diferencias en las propiedades mecánicas de la membrana ante la presencia de concentraciones variables de pArg. Asimismo se podrían evaluar diversas composiciones lipídicas en las GUVs.
- Habiendo analizado algunos factores que intervienen en el proceso de traslocación de forma individual, sería sumamente relevante realizar los cálculos de energía libre para un sistema que contemple cierta densidad de carga aniónica en la bicapa, a través de la cual se aplica cierto potencial electrostático $\Delta\Phi$. Para ello, en primer lugar, se debería evaluar el efecto de $\Delta\Phi$ en sistemas *in silico* con bicapas parcialmente cargadas, por ejemplo, DOPC-DOPG 50:50. A su vez, dicha densidad de carga puede ser asignada a un fosfolípido así como a un ácido graso, dando dos sistemas de estudio alternativos, diferenciados por el tipo de lípido constituyente. Asimismo, bajo estas mismas condiciones de contorno, se puede analizar el costo de inserción de la pArg y del complejo pArg-pGly. De esta forma, se podrían obtener nuevas conclusiones a partir de sistemas *in silico* que conjuguen simultáneamente varios factores del proceso de traslocación.
- Analizar experimentalmente la traslocación de KR_9C acoplado a un cargo hidrosoluble (por ejemplo, la proteína fluorescente GFP) a través de GUVs de composición variable. Alternativamente se podría generar otro entorno de estudio al agregar valinomicina al medio, con el objetivo de producir una diferencia de potencial transmembrana en las vesículas.

Publicaciones surgidas a partir de la tesis

- Matías A. Via, Joaquín Klug, Natalia Wilke, Luis S. Mayorga, and M. G. Del Pópolo. The interfacial electrostatic potential modulates the insertion of cell-penetrating peptides into lipid bilayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20:5180–5189, 2018
- Matías A. Via, Mario G. Del Pópolo, and Natalia Wilke. Negative dipole potentials and carboxylic polar head groups foster the insertion of cell-penetrating peptides into lipid monolayers. *Langmuir*, 34(9):3102–3111, 2018
- Matías A. Via, Natalia Wilke, and Mario G. Del Pópolo. Surface charge and fatty acids modulate the membrane permeation rate of polyarginines, improving its cpp effect. *en preparación*, 2019

Presentaciones a congresos y simposios científicos

- **“6th International Iberian Biophysics Congress and X Iberoamerican Congress of Biophysics”**
 - Autores: Via, Matías; Wilke, Natalia y Del Pópolo, Mario
 - Presentación de póster: “Surface charge and fatty acids modulate the membrane permeation rate of cell-penetrating-peptides: Adsorption energy counterbalances pore formation cost”
 - Fecha: 20 al 22 de junio de 2018
 - Lugar: Universidad Jaume I, Castellón de La Plana, España.
- **“IILAFeBS, IX IberoAmerican congress of Biophysics, XLV SAB Annual Meeting”**
 - Autores: Via, Matías; Del Pópolo, Mario y Wilke, Natalia
 - Presentación de póster digital: “Interaction of cell penetrating peptides with model membranes”
 - Fecha: 23 al 25 de noviembre de 2016
 - Lugar: Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.
- **“VI Encuentro Argentino de Materia Blanda”**
 - Autores: Via, Matías; Del Pópolo, Mario y Wilke, Natalia
 - Presentación de póster: “Interacción de péptidos de penetración celular con membranas modelo”
 - Fecha: 17 al 19 de agosto de 2016
 - Lugar: Facultad de Matemáticas, Astronomía, Física y Computación (FAMAF) de la

Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

■ **“XXIV Jornadas de Investigación y VI de Posgrado, SeCyT-UNCuyo, 2016”**

-Autores: Via, Matías; Klug, Joaquín; Wilke, Natalia y Del Pópolo, Mario

-Presentación de póster: “Traslocación de péptidos de penetración celular a través de bicapas lipídicas”

-Fecha: Abril 2016

-Lugar: Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza

■ **"Latin American Crosstalk In Biophysics And Physiology"**

-Autores: Via, Matías; Klug, Joaquín; Wilke, Natalia; Mayorga, Luis y Del Pópolo, Mario

-Presentación de póster: “Translocation of cell-penetrating peptides across lipid bilayers”

-Fecha: 26-29 de noviembre de 2015

-Lugar: Salto, República Oriental del Uruguay

■ **"Nanocórdoba 2014"**

-Autores: Via, Matías; Klug, Joaquín; Wilke, Natalia; Mayorga, Luis y Del Pópolo, Mario

-Presentación de póster: “Interacción de nanopartículas con membranas modelo y membranas celulares in-vivo”

-Fecha: Octubre 2014

-Lugar: Córdoba, Capital

Referencias

1. John Boyle. Molecular biology of the cell, 5th edition by b. alberts, a. johnson, j. lewis, m. raff, k. roberts, and p. walter. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 36(4):317–318.
2. Alan D. Frankel and Carl O. Pabo. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6):1189 – 1193, 1988.
3. Maurice Green and Paul M. Loewenstein. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*, 55(6):1179 – 1188, 1988.
4. Jinseu Park, Jiyeon Ryu, Kyeong-Ae Kim, Hak Joo Lee, Jae Hoon Bahn, Kyuhyung Han, Eui Yul Choi, Kil Soo Lee, Hyeok Yil Kwon, and Soo Young Choi. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. *Journal of General Virology*, 83(5):1173–1181, 2002.
5. Eric Vivès, Priscille Brodin, and Bernard Lebleu. A truncated hiv-1 tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 272(25):16010–16017, 1997.
6. A Joliot, C Pernelle, H Deagostini-Bazin, and A Prochiantz. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(5):1864–1868, 1991.
7. D Derossi, A H Joliot, G Chassaing, and A Prochiantz. The third helix of the antenna-pedia homeodomain translocates through biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(14):10444–50, 1994.

8. Piyush Agrawal, Sherry Bhalla, Salman Sadullah Usmani, Sandeep Singh, Kumardeep Chaudhary, Gajendra P. S. Raghava, and Ankur Gautam. Cppsite 2.0: a repository of experimentally validated cell-penetrating peptides. *Nucleic Acids Research*, 44(D1):D1098–D1103, 2016.
9. Francesca Milletti. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discovery Today*, 17(15):850 – 860, 2012.
10. Cell-penetrating peptides: Mechanisms and applications. *Current Pharmaceutical Design*, 11(28), 2005.
11. Margus Pooga, Ursel Soomets, Mattias M Hällbrink, Andres Valkna, Külliki Saar, Khadijeh Rezaei, Ulrika Kahl, J X. Hao, Xiao-Jun Xu, Zsuzsanna Wiesenfeld-Hallin, Tomas G M Hökfelt, Tamas Bartfai, and Ülo Langel. Cell penetrating pna constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nature Biotechnology*, 16:857–861, 1998.
12. André Ziegler, Xiaochun Li Blatter, Anna Seelig, and Joachim Seelig. Protein transduction domains of hiv-1 and siv tat interact with charged lipid vesicles. binding mechanism and thermodynamic analysis. *Biochemistry*, 42(30):9185–9194, 2003. PMID: 12885253.
13. Anna Elmquist, Maria Lindgren, Tamas Bartfai, and Ülo Langel. Ve-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pvec, with carrier functions. *Experimental Cell Research*, 269(2):237 – 244, 2001.
14. Johansson H. J. Holm T. El-Andaloussi, S. and U. Langel. A novel cell-penetrating peptide, m918, for efficient delivery of proteins and peptide nucleic acids. *Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(10):1820 – 1826, 2007.
15. Shiroh Futaki, Tomoki Suzuki, Wakana Ohashi, Takeshi Yagami, Seigo Tanaka, Kunihiro Ueda, and Yukio Sugiura. Arginine-rich peptides: An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8):5836–5840, 2001.
16. D.J. Mitchell, L. Steinman, D.T. Kim, C.G. Fathman, and J.B. Rothbard. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *The Journal of Peptide Research*, 56(5):318–325, 2000.

17. Helene L. Åmand, Hanna A. Rydberg, Louise H. Fornander, Per Lincoln, Bengt Nordén, and Elin K. Esbjörner. Cell surface binding and uptake of arginine- and lysine-rich penetratin peptides in absence and presence of proteoglycans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(11):2669 – 2678, 2012.
 18. Paul A. Wender, Dennis J. Mitchell, Kanaka Pattabiraman, Erin T. Pelkey, Lawrence Steinman, and Jonathan B. Rothbard. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24):13003–13008, 2000.
 19. Yongchao Su, Tim Doherty, Alan J Waring, Piotr Ruchala, and Mei Hong. Roles of arginine and lysine residues in the translocation of a cell-penetrating peptide from (13)c, (31)p and (19)f solid-state nmr. *Biochemistry*, 48(21):0006–2960, 2009.
 20. Mario Vazdar, Jan Heyda, Philip E. Mason, Giulio Tesei, Christoph Allolio, Mikael Lund, and Pavel Jungwirth. Arginine “magic”: Guanidinium like-charge ion pairing from aqueous salts to cell penetrating peptides. *Accounts of Chemical Research*, 51(6):1455–1464, 2018. PMID: 29799185.
 21. Marie-Lise Jobin and Isabel D. Alves. On the importance of electrostatic interactions between cell penetrating peptides and membranes: A pathway toward tumor cell selectivity? *Biochimie*, 107:154 – 159, 2014. From Membranes to Pathologies.
 22. Alexandros Pantos, Ioannis Tsogas, and Constantinos M. Paleos. Guanidinium group: A versatile moiety inducing transport and multicompartimentalization in complementary membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(4):811 – 823, 2008.
 23. Gisela Lattig-Tunnemann, Manuel Prinz, Daniel Hoffmann, Joachim Behlke, Caroline Palm-Apergi, Ingo Morano, Henry D. Herce, and M. Cristina Cardoso. Backbone rigidity and static presentation of guanidinium groups increases cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Nature Communications*, 2(453):318–325, 2011.
 24. Jonathan B. Rothbard, Theodore C. Jessop, and Paul A. Wender. Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(4):495 – 504, 2005.
-

25. Hanna A. Rydberg, Maria Matson, Helene L. Åmand, Elin K. Esbjörner, and Bengt Nordén. Effects of tryptophan content and backbone spacing on the uptake efficiency of cell-penetrating peptides. *Biochemistry*, 51(27):5531–5539, 2012.
 26. David I. Chan, Elmar J. Prenner, and Hans J. Vogel. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(9):1184 – 1202, 2006. Membrane Biophysics of Antimicrobial Peptides.
 27. Marie-Lise Jobin, Marine Blanchet, Sarah Henry, Stéphane Chaignepain, Claude Manigand, Sabine Castano, Sophie Lecomte, Fabienne Burlina, Sandrine Sagan, and Isabel D. Alves. The role of tryptophans on the cellular uptake and membrane interaction of arginine-rich cell penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(2):593 – 602, 2015.
 28. Joost C M Holthuis and Anant K. Menon. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature*, 510:48–57, 2014.
 29. Daniel Lingwood and Kai Simons. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961):46–50, 2010.
 30. K.W. Jeon and J.F. Danielli. Micrurgical studies with large free-living amebas. volume 30 of *International Review of Cytology*, pages 49 – 89. Academic Press, 1971.
 31. Nicole J. Yang and Marlon J. Hinner. *Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins*, pages 29–53. Springer New York, New York, NY, 2015.
 32. F Szoka and D Papahadjopoulos. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 9(1):467–508, 1980. PMID: 6994593.
 33. Per E. G. Thorén, Daniel Persson, Elin K. Esbjörner, Mattias Goksör, Per Lincoln, and Bengt Nordén. Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides. *Biochemistry*, 43(12):3471–3489, 2004. PMID: 15035618.
 34. Per E.G. Thorén, Daniel Persson, Mattias Karlsson, and Bengt Nordén. The antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers – the first direct observation. *FEBS Letters*, 482(3), 2000.
-

35. Daniel Persson, Per E. G. Thorén, Per Lincoln, and Bengt Nordén. Vesicle membrane interactions of penetratin analogues. *Biochemistry*, 43(34):11045–11055, 2004. PMID: 15323563.
 36. Toshinori Shimanouchi, Peter Walde, James Gardiner, Yogesh R. Mahajan, Dieter Seebach, Anita Thomae, Stefanie D. Krämer, Matthias Voser, and Ryoichi Kuboi. Permeation of a beta-heptapeptide derivative across phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(11):2726 – 2736, 2007.
 37. Donato Terrone, Stephane Leung Wai Sang, Liya Roudaia, and John R. Silvius. Penetratin and related cell-penetrating cationic peptides can translocate across lipid bilayers in the presence of a transbilayer potential. *Biochemistry*, 42(47):13787–13799, 2003. PMID: 14636045.
 38. Alexey Sharonov and Robin M. Hochstrasser. Single-molecule imaging of the association of the cell-penetrating peptide pep-1 to model membranes. *Biochemistry*, 46(27):7963–7972, 2007. PMID: 17567046.
 39. Hans Binder and Göran Lindblom. Charge-dependent translocation of the trojan peptide penetratin across lipid membranes. *Biophysical Journal*, 85(2):982–995, 2003.
 40. Jr. G.L. Gaines. *Insoluble monolayer at liquid-gas interfaces*. Interscience Publishers, 1966.
 41. Natalia Wilke. Chapter two - lipid monolayers at the air–water interface: A tool for understanding electrostatic interactions and rheology in biomembranes. volume 20 of *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, pages 51 – 81. Academic Press, 2014.
 42. KSV. *Langmuir and Langmuir-Blodgett devices. All Models*.
 43. Marc Eeman. From biological membranes to biomimetic model membranes. 2010.
 44. A.D. Bangham, M.M. Standish, and J.C. Watkins. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1):238 – IN27, 1965.
 45. Grazia Sessa and Gerald Weissmann. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research*, 9(3):310–318, 1968.
-

46. Carla M. Rosetti, Agustín Mangiarotti, and Natalia Wilke. Sizes of lipid domains: What do we know from artificial lipid membranes? what are the possible shared features with membrane rafts in cells? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(5):789 – 802, 2017.
 47. Alexey S. Ladokhin, Sajith Jayasinghe, and Stephen H. White. How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? *Analytical Biochemistry*, 285(2):235 – 245, 2000.
 48. Ole G Mouritsen. Model answers to lipid membrane questions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(9):a004622, September 2011.
 49. Aurélien Roux, Damien Cuvelier, Pierre Nassoy, Jacques Prost, Patricia Bassereau, and Bruno Goud. Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *The EMBO Journal*, 24(8):1537–1545, 2005.
 50. Philippe Méléard, Luis A. Bagatolli, and Tanja Pott. Chapter 9 - giant unilamellar vesicle electroformation: From lipid mixtures to native membranes under physiological conditions. In *Methods in Enzymology*, volume 465 of *Methods in Enzymology*, pages 161 – 176. Academic Press, 2009.
 51. EA Evans and R Skalak. In *Mechanics and thermodynamics of biomembranes*. CRC Press Inc., 1980.
 52. Jonas Henriksen, Amy C. Rowat, and John H. Ipsen. Vesicle fluctuation analysis of the effects of sterols on membrane bending rigidity. *European Biophysics Journal*, 33(8):732–741, Dec 2004.
 53. John P. Reeves and Robert M. Dowben. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *Journal of Cellular Physiology*, 73(1):49–60.
 54. J.F. Faucon, M. D. Mitov, P. Méléard, I. Bivas, and P. Bothorel. Bending elasticity and thermal fluctuations of lipid membranes. theoretical and experimental requirements. *J. Phys. France*, 50(17):2389–2414, 1989.
 55. Miglena I. Angelova and Dimiter S. Dimitrov. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 81:303–311, 1986.
-

-
56. M. I. Angelova, S. Soléau, Ph. Méléard, F. Faucon, and P. Bothorel. Preparation of giant vesicles by external ac electric fields. kinetics and applications. In C. Helm, M. Lösche, and H. Möhwald, editors, *Trends in Colloid and Interface Science VI*, pages 127–131, Darmstadt, 1992. Steinkopff.
 57. Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 154(2):115 – 119, 2008.
 58. Chen-Yu Jiao, Diane Delaroche, Fabienne Burlina, Isabel D Alves, Gérard Chassaing, and Sandrine Sagan. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(49):33957 – 33965, 2012.
 59. Astrid Walrant, Alexander Vogel, Isabelle Correia, Olivier Lequin, Bjoern E.S. Olausson, Bernard Desbat, Sandrine Sagan, and Isabel D. Alves. Membrane interactions of two arginine-rich peptides with different cell internalization capacities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(7):1755 – 1763, 2012.
 60. W. Berkeley Kauffman, Taylor Fuselier, Jing He, and William C. Wimley. Mechanism matters: A taxonomy of cell penetrating peptides. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(12):749 – 764, 2015.
 61. S. Deshayes, M. C. Morris, G. Divita, and F. Heitz. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(16):1839–1849, Aug 2005.
 62. Jonathan B. Rothbard, Theodore C. Jessop, and Paul A. Wender. Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(4):495 – 504, 2005. Protein- and Peptide-Mediated Transduction: Mechanisms and Implications for Drug Delivery.
 63. Isabel D. Alves, Astrid Walrant, Cherine Bechara, and Sandrine Sagan. Is there anybody in there? on the mechanisms of wall crossing of cell penetrating peptides. *Current Protein and Peptide Science*, 13(7):658–671, 2012.
 64. Henry D. Herce, Angel E. Garcia, and M. Cristina Cardoso. Fundamental molecular mechanism for the cellular uptake of guanidinium-rich molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 136(50):17459–17467, 2014. PMID: 25405895.
-

-
65. Yehonathan Pouny, Doron Rapaport, Amram Mor, Pierre Nicolas, and Yechiel Shai. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 31(49):12416–12423, 1992. PMID: 1463728.
 66. Katsumi Matsuzaki, Shuji Yoneyama, Osamu Murase, and Koichiro Miyajima. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan x translocation. *Biochemistry*, 35(25):8450–8456, 1996. PMID: 8679603.
 67. Delin Sun, Jan Forsman, Mikael Lund, and Clifford E. Woodward. Effect of arginine-rich cell penetrating peptides on membrane pore formation and life-times: a molecular simulation study. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16:20785–20795, 2014.
 68. Margherita Di Pisa, Gérard Chassaing, and Jean-Marie Swiecicki. Translocation mechanism(s) of cell-penetrating peptides: Biophysical studies using artificial membrane bilayers. *Biochemistry*, 54(2):194–207, 2015. PMID: 25490050.
 69. Junxiao Ye, Ergang Liu, Zhili Yu, Xing Pei, Sunhui Chen, Pengwei Zhang, Meong-Cheol Shin, Junbo Gong, Huining He, and Victor C. Yang. Cpp-assisted intracellular drug delivery, what is next? *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), 2016.
 70. Fatemeh Madani, Staffan Lindberg, Ülo Langel, and Shiroh Futaki. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *Journal of Biophysics*, 2011(1):1–10, 2011.
 71. Jiaqi Lin and Alfredo Alexander-Katz. Cell membranes open “doors” for cationic nanoparticles/biomolecules: Insights into uptake kinetics. *ACS Nano*, 7(12):10799–10808, 2013. PMID: 24251827.
 72. Marc-Antoine Sani and Frances Separovic. How membrane-active peptides get into lipid membranes. *Accounts of Chemical Research*, 49(6):1130–1138, 2016. PMID: 27187572.
 73. Sílvia Pujals, Jimena Fernández-Carneado, Carmen López-Iglesias, Marcelo J. Kogan, and Ernest Giralt. Mechanistic aspects of cpp-mediated intracellular drug delivery: Relevance of {CPP} self-assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(3):264 – 279, 2006.
 74. May C. Morris, Sebastien Deshayes, Frederic Heitz, and Gilles Divita. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biology of the Cell*, 100(4):201–217, 2008.
-

-
75. Nathan Schmidt, Abhijit Mishra, Ghee Hwee Lai, and Gerard C.L. Wong. Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS Letters*, 584(9):1806–1813, 2010.
 76. André Ziegler. Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(4–5):580 – 597, 2008. Membrane Permeable Peptide Vectors: Chemistry and Functional Design for the Therapeutic Applications.
 77. Yuki Takechi, Hirokazu Tanaka, Hiroki Kitayama, Haruka Yoshii, Masafumi Tanaka, and Hiroyuki Saito. Comparative study on the interaction of cell-penetrating polycationic polymers with lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165(1):51 – 58, 2012.
 78. Frederic Heitz, May Catherine Morris, and Gilles Divita. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British Journal of Pharmacology*, 157(2):195–206, 2009.
 79. A. Komin, L.M. Russell, K.A. Hristova, and P.C. Searson. Peptide-based strategies for enhanced cell uptake, transcellular transport, and circulation: Mechanisms and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, pages–, 2016.
 80. Yuan Hu, Xiaorong Liu, Sudipta Kumar Sinha, and Sandeep Patel. Translocation thermodynamics of linear and cyclic nonaarginine into model dppc bilayer via coarse-grained molecular dynamics simulation: Implications of pore formation and nonadditivity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(10):2670–2682, 2014. PMID: 24506488.
 81. Yuan Hu and Sandeep Patel. Structural and thermodynamic insight into spontaneous membrane-translocating peptides across model pc/pg lipid bilayers. *The Journal of Membrane Biology*, 248(3):505–515, 2015.
 82. Yuan Hu and Sandeep Patel. Thermodynamics of cell-penetrating hiv1 tat peptide insertion into pc/ps/chol model bilayers through transmembrane pores: the roles of cholesterol and anionic lipids. *Soft Matter*, 12:6716–6727, 2016.
 83. Yechiel Shai. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alfa-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1462(1):55 – 70, 1999.
-

-
84. Peter Järver and Ülo Langel. Cell-penetrating peptides—a brief introduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(3):260 – 263, 2006. Mechanisms of Carrier-Mediated Intracellular Delivery of Therapeutics.
 85. Katsumi Matsuzaki, Ken ichi Sugishita, and Koichiro Miyajima. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative bacteria. *FEBS Letters*, 449(2):221 – 224, 1999.
 86. Martin P. Stewart, Robert Langer, and Klavs F. Jensen. Intracellular delivery by membrane disruption: Mechanisms, strategies, and concepts. *Chemical Reviews*, 118(16):7409–7531, 2018. PMID: 30052023.
 87. Thomas M. Weiss Lai Ding Lin Yang, Thad A. Harroun and Huey W. Huang. Barrel-stave model or toroidal model? a case study on melittin pores. *Biophysical Journal*, 81(3):1475–1485, 2001.
 88. Arnaud Hemmerle, Giovanna Fragneto, Jean Daillant, and Thierry Charitat. Reduction in tension and stiffening of lipid membranes in an electric field revealed by x-ray scattering. *Phys. Rev. Lett.*, 116:228101, Jun 2016.
 89. Dennis S. Bruhn, Michael A. Lomholt, and Himanshu Khandelia. Quantifying the relationship between curvature and electric potential in lipid bilayers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(21):4812–4817, 2016. PMID: 27163659.
 90. Gisela Tünnemann, Robert M. Martin, Simone Haupt, Christoph Patsch, Frank Edenhofer, and M. Cristina Cardoso. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of tat-containing proteins and peptides in living cells. *The FASEB Journal*, 20(11):1775–1784, 2006. PMID: 16940149.
 91. Jonathan B. Rothbard, Theodore C. Jessop, Richard S. Lewis, Bryce A. Murray, and Paul A. Wender. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *Journal of the American Chemical Society*, 126(31):9506–9507, 2004. PMID: 15291531.
 92. Elin K. Esbjörner, Per Lincoln, and Bengt Nordén. Counterion-mediated membrane penetration: Cationic cell-penetrating peptides overcome born energy barrier by ion-pairing
-

- with phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(6):1550 – 1558, 2007.
- 93.** Henry D. Herce and Angel E. Garcia. Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the hiv-1 tat peptide across lipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(52):20805–20810, 2007.
- 94.** HD. Herce, AE. Garcia, J. Litt, RS. Kane, P. Martin, N. Enrique, A. Rebolledo, and V Milesi. Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophysical Journal*, 97(7):19117–1925, 2008. PMID: 26621095.
- 95.** Daan Frenkel and Berend Smit. *Understanding Molecular Simulation*. Academic Press, Inc., Orlando, FL, USA, 2nd edition, 2001.
- 96.** J. M. Haile. *Molecular Dynamics Simulation: Elementary Methods*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, 1st edition, 1992.
- 97.** M. P. Allen and D. J. Tildesley. *Computer Simulations of Liquids*. Clarendon Press.
- 98.** Frank Jensen. *Introduction to Computational Chemistry*. John Wiley & Sons, Chichester, 2nd edition, 2007.
- 99.** Siewert J. Marrink and D. Peter Tieleman. Perspective on the martini model. *Chem. Soc. Rev.*, 42:6801–6822, 2013.
- 100.** Siewert J. Marrink, H. Jelger Risselada, Serge Yefimov, D. Peter Tieleman, and Alex H. de Vries. The martini force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(27):7812–7824, 2007. PMID: 17569554.
- 101.** Siewert J. Marrink, Alex H. de Vries, and Alan E. Mark. Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(2):750–760, 2004.
- 102.** Xavier Periole, Thomas Huber, Siewert-Jan Marrink, and Thomas P. Sakmar. G protein-coupled receptors self-assemble in dynamics simulations of model bilayers. *Journal of the American Chemical Society*, 129(33):10126–10132, 2007. PMID: 17658882.
- 103.** Xavier Periole, Adam M. Knepp, Thomas P. Sakmar, Siewert J. Marrink, and Thomas Huber. Structural determinants of the supramolecular organization of g protein-coupled
-

- receptors in bilayers. *Journal of the American Chemical Society*, 134(26):10959–10965, 7 2012.
- 104.** Cesar A. López, Andrzej J. Rzepiela, Alex H. de Vries, Lubbert Dijkhuizen, Philippe H. Hünenberger, and Siewert J. Marrink. Martini coarse-grained force field: Extension to carbohydrates. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 5(12):3195–3210, 2009. PMID: 26602504.
- 105.** César A. López, Zofie Sovova, Floris J. van Eerden, Alex H. de Vries, and Siewert J. Marrink. Martini force field parameters for glycolipids. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9(3):1694–1708, 2013. PMID: 26587629.
- 106.** Raisa Kociurzynski, Martina Pannuzzo, and Rainer A. Böckmann. Phase transition of glycolipid membranes studied by coarse-grained simulations. *Langmuir*, 31(34):9379–9387, 2015. PMID: 26267673.
- 107.** Jaakko J. Uusitalo, Helgi I. Ingólfsson, Parisa Akhshi, D. Peter Tieleman, and Siewert J. Marrink. Martini coarse-grained force field: Extension to dna. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(8):3932–3945, 2015. PMID: 26574472.
- 108.** Kristyna Pluhackova and Rainer A. Böckmann. Biomembranes in atomistic and coarse-grained simulations. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 27(32):323103, 2015.
- 109.** Semen O. Yesylevskyy, Lars V. Schäfer, Durba Sengupta, and Siewert J. Marrink. Polarizable water model for the coarse-grained martini force field. *PLOS Computational Biology*, 6(6):1–17, 06 2010.
- 110.** Jiaqi Lin and Alfredo Alexander-Katz. Probing lipid bilayers under ionic imbalance. *Biophysical Journal*, 111(11):2460–2469, 2016.
- 111.** Kristyna Pluhackova, Tsjerk A. Wassenaar, Sonja Kirsch, and Rainer A. Böckmann. Spontaneous adsorption of coiled-coil model peptides k and e to a mixed lipid bilayer. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(12):4396–4408, 2015. PMID: 25719673.
- 112.** Berk Hess, Carsten Kutzner, David van der Spoel, and Erik Lindahl. Gromacs 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.*, 4(3):435–447, 2008. PMID: 26620784.
-

-
- 113.** Tom Darden, Darrin York, and Lee Pedersen. Particle mesh ewald: An $n \cdot \log(n)$ method for ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, 98(12):10089–10092, 1993.
- 114.** In-Chul Yeh and Max L. Berkowitz. Ewald summation for systems with slab geometry. *The Journal of Chemical Physics*, 111(7):3155–3162, 1999.
- 115.** Johannes Kästner. Umbrella sampling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 1(6):932–942.
- 116.** Shankar Kumar, John M. Rosenberg, Djamal Bouzida, Robert H. Swendsen, and Peter A. Kollman. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. i. the method. *Journal of Computational Chemistry*, 13(8):e179.
- 117.** B. Roux. Influence of the membrane potential on the free energy of an intrinsic protein. *Biophysical Journal*, 73:2980–2989, 1997.
- 118.** (accedido 10-Oct-2018).
- 119.** Alessandro Laio and Michele Parrinello. Escaping free-energy minima. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20):12562–12566, 2002.
- 120.** Alessandro Barducci, Giovanni Bussi, and Michele Parrinello. Well-tempered metadynamics: A smoothly converging and tunable free-energy method. *Phys. Rev. Lett.*, 100:020603, Jan 2008.
- 121.** Alessandro Barducci, Massimiliano Bonomi, and Michele Parrinello. Metadynamics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 1(5):826–843.
- 122.** Rafael C. Bernardi, Marcelo C.R. Melo, and Klaus Schulten. Enhanced sampling techniques in molecular dynamics simulations of biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(5):872 – 877, 2015. Recent developments of molecular dynamics.
- 123.** Dario Gioia, Martina Bertazzo, Maurizio Recanatini, Matteo Masetti, and Andrea Cavalli. Dynamic docking: A paradigm shift in computational drug discovery. *Molecules*, 22(11), 2017.
-

-
- 124.** Davide Branduardi, Giovanni Bussi, and Michele Parrinello. Metadynamics with adaptive gaussians. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(7):2247–2254, 2012. PMID: 26588957.
- 125.** (accedido 9-Oct-2018).
- 126.** Massimiliano Bonomi, Davide Branduardi, Giovanni Bussi, Carlo Camilloni, Davide Provasi, Paolo Raiteri, Davide Donadio, Fabrizio Marinelli, Fabio Pietrucci, Ricardo A. Broglia, and Michele Parrinello. Plumed: A portable plugin for free-energy calculations with molecular dynamics. *Computer Physics Communications*, 180(10):1961 – 1972, 2009.
- 127.** Bauer B. A. Davis J. E. Lucas, T. R. and S. Patel. Molecular dynamics simulation of hydrated dppc monolayers using charge equilibration force fields. *Journal of Computational Chemistry*, 33(2):141–152, 2012.
- 128.** Howard Brockman. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Current Opinion in Structural Biology*, 9(4):438 – 443, 1999.
- 129.** Weiam Daear, Mark Mahadeo, and Elmar J Prenner. Applications of brewster angle microscopy from biological materials to biological systems. *Biochimica et biophysica acta*, 1859 10:1749–1766, 2017.
- 130.** Xiaofeng Fan, Weitao Zheng, and David J. Singh. *Light scattering and surface plasmons on small spherical particles*, volume 3. 06 2014.
- 131.** Emma L. Gilroy, Matthew R. Hicks, David J. Smith, and Alison Rodger. Viscosity of aqueous dna solutions determined using dynamic light scattering. *Analyst*, 136:4159–4163, 2011.
- 132.** Patrícia S. Santiago, Franciane Moura, Leonardo M. Moreira, Marco M. Domingues, Nuno C. Santos, and Marcel Tabak. Dynamic light scattering and optical absorption spectroscopy study of ph and temperature stabilities of the extracellular hemoglobin of glossoscolex paulistus. *Biophysical Journal*, 94(6):2228 – 2240, 2008.
- 133.** M. I. Angelova, S. Soléau, Ph. Méléard, F. Faucon, and P. Bothorel. Preparation of giant vesicles by external ac electric fields. kinetics and applications. In C. Helm, M. Lösche, and H. Möhwald, editors, *Trends in Colloid and Interface Science VI*, pages 127–131, Darmstadt, 1992. Steinkopff.
-

134. Qingchuan Li, Xuejing Wang, Shenghua Ma, Ying Zhang, and Xiaojun Han. Electroformation of giant unilamellar vesicles in saline solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 147:368 – 375, 2016.
 135. Julio Alejandro Di Rienzo. *Estadística para las ciencias agropecuarias /*. Brujas, Córdoba :, 5ª. ed. edition, 2003. La Biblioteca posee: 2 ej.
 136. Ove Sten-Knudsen. *Biological Membranes: Theory of Transport, Potentials and Electric Impulses*. Cambridge University Press, 2002.
 137. Sakmann B. Neher E. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554):799–802, 1976.
 138. B. M.; Lev-Ram V.; Hildesheim R. Grinvald, A.; Salzberg. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Biophysical Journal*, 51:643–651, 1987.
 139. RJ Clarke. The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection. *Advances in colloid and interface science*, 89-90:263—281, January 2001.
 140. Lauren Barnett, Jelena Platisa, Marko Popovic, Vincent A. Pieribone, and Thomas Hughes. A fluorescent, genetically-encoded voltage probe capable of resolving action potentials. *PLOS ONE*, 7(9):1 – 7, 2012.
 141. Hiroki Mutoh, Amelie Perron, Dimitar Dimitrov, Yuka Iwamoto, Walther Akemann, Dmitriy M. Chudakov, and Thomas. Knöpfel. Spectrally-resolved response properties of the three most advanced fret based fluorescent protein voltage probes. *PLOS ONE*, 4(2):1 – 5, 2009.
 142. Zhou Han, Lei Jin, Fuyi Chen, Joseph J. Loturco, Lawrence B. Cohen, Alexey Bondar, Josef Lazar, and Vincent A. Pieribone. Mechanistic studies of the genetically encoded fluorescent protein voltage probe arlight. *PLOS ONE*, 9(11):1 – 21, 2014.
 143. Amelie Perron, Hiroki Mutoh, Walther Akemann, Sunita Ghimire, Dimitar Dimitrov, Yuka Iwamoto, and Thomas Knöpfel. Second and third generation voltage-sensitive fluorescent proteins for monitoring membrane potential. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2:5, 2009.
-

-
144. W. Akemann, H. Mutoh, A. Perron, J. Rossier, and T. Knöpfel. Imaging brain electric signals with genetically targeted voltage-sensitive fluorescent proteins. *Nature Methods*, 7:643, 2010.
 145. B. Roux. The membrane potential and its representation by a constant electric field in computer simulations. *Biophysical Journal*, 95(9):4205–4216, 2008.
 146. D.P. Tieleman, H.J.C. Berendsen, and M.S.P. Sansom. Voltage-dependent insertion of alamethicin at phospholipid/water and octane/water interfaces. *Biophysical Journal*, 80(1):331 – 346, 2001.
 147. James Gumbart, Fatemeh Khalili-Araghi, Marcos Sotomayor, and Benoît Roux. Constant electric field simulations of the membrane potential illustrated with simple systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(2):294 – 302, 2012. Membrane protein structure and function.
 148. Jun-Sik Sin, Song-Jin Im, and Kwang-Il Kim. Asymmetric electrostatic properties of an electric double layer: a generalized poisson-boltzmann approach taking into account non-uniform size effects and water polarization. *Electrochimica Acta*, 153:531 – 539, 2015.
 149. Dehez F.; Treptow W. Delemotte, L. and M. Tarek. Modeling membranes under a trans-membrane potential. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(18):5547–5550, 2008. PMID: 18412411.
 150. Nanda H. Petrache-H. I. Sachs, J. N. and T. B. Woolf. Changes in phosphatidylcholine headgroup tilt and water order induced by monovalent salts: Molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal*, 86(6):3772–3782, 2004. Membrane protein structure and function.
 151. An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations. *The Journal of General Physiology*, 140(6):587–594, 2012.
 152. Kinetics, statistics, and energetics of lipid membrane electroporation studied by molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal*, 95(4).
-

153. Grubmuller H. de Groot-B. L. Kutzner, C. and U. Zachariae. Computational electrophysiology: The molecular dynamics of ion channel permeation and selectivity in atomistic detail. *Biophysical Journal*, 101(4):809–817, 2011.
 154. M. Casciola, D. Bonhenry, M. Liberti, F. Apollonio, and M. Tarek. A molecular dynamic study of cholesterol rich lipid membranes: comparison of electroporation protocols. *Bioelectrochemistry*, 100:11 – 17, 2014. Bio-Electroporation organised by COST TD1104.
 155. Yukun Wang, Tangzheng Zhao, Dongqing Wei, Erik Strandberg, Anne S. Ulrich, and Jakob P. Ulmschneider. How reliable are molecular dynamics simulations of membrane active antimicrobial peptides? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(9):2280 – 2288, 2014. Interfacially active peptides and proteins.
 156. Siebrasse J. P. Ciobanasu, C. and U. Kubitscheck. Cell-penetrating hiv1 tat peptides can generate pores in model membranes. *Biophysical Journal*, 99(1):153–162, 2010.
 157. Kun Huang and Angel E. García. Free energy of translocating an arginine-rich cell-penetrating peptide across a lipid bilayer suggests pore formation. *Biophysical Journal*, 104(2):412 – 420, 2013.
 158. Wai-Ming Yau, William C. Wimley, Klaus Gawrisch, and Stephen H. White. The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*, 37(42):14713–14718, 1998. PMID: 9778346.
 159. J A Killian, G Lindblom, and S Persson. Molecular ordering of interfacially localized tryptophan analogs in ester- and ether-lipid bilayers studied by 2h-nmr. *Biophysical Journal*, 75(3):1365 – 1371, 1998. PMID: 9778346.
 160. Georg Blaser, John M. Sanderson, and Mark R. Wilson. Free-energy relationships for the interactions of tryptophan with phosphocholines. *Org. Biomol. Chem.*, 7:5119–5128, 2009.
 161. Zhen-lu Li, Hong-ming Ding, and Yu-qiang Ma. Translocation of polyarginines and conjugated nanoparticles across asymmetric membranes. *Soft Matter*, 9:1281–1286, 2013.
 162. Natalia Wilke. Lipid monolayers at the air–water interface. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 20:51 – 81, 2014.
-

-
- 163.** Nabil A. Alhakamy, Anubhav Kaviratna, Cory J. Berkland, and Prajnaparamita Dhar. Dynamic measurements of membrane insertion potential of synthetic cell penetrating peptides. *Langmuir*, 29(49):15336–15349, 2013. PMID: 24294979.
- 164.** Régine Maget-Dana. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1462(1–2):109 – 140, 1999.
- 165.** J.M. Smaby and H.L. Brockman. Surface dipole moments of lipids at the argon-water interface. similarities among glycerol-ester-based lipids. *Biophysical Journal*, 58(1):195 – 204, 1990.
- 166.** Hiroki Yokoyama, Hiromichi Nakahara, and Osamu Shibata. Miscibility and phase behavior of dppg and perfluorocarboxylic acids at the air–water interface. *Chemistry and Physics of Lipids*, 161(2):103 – 114, 2009.
- 167.** Henry D. Herce, Angel E. Garcia, and M. Cristina Cardoso. Fundamental molecular mechanism for the cellular uptake of guanidinium-rich molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 136(50):17459–17467, 2014. PMID: 25405895.
- 168.** Viola Vogel and Dietmar Möbius. Local surface potentials and electric dipole moments of lipid monolayers: Contributions of the water/lipid and the lipid/air interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 126(2):408 – 420, 1988.
- 169.** M. Broniatowski and P. Dynarowicz-Łątka. Langmuir monolayers from perfluorobutyl-n-eicosane. *Journal of Fluorine Chemistry*, 125(10):1501 – 1507, 2004.
- 170.** J. J. Betts and B. A. Pethica. The ionization characteristics of monolayers of weak acids and bases. *Trans. Faraday Soc.*, 52:1581–1589, 1956.
- 171.** N. Wilke. Lipid monolayers at the air-water interface: A tool for understanding electrostatic interactions and rheology in bio-membranes. In *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, pages 51 – 81. ELSEVIER SCIENCE BV, 2014.
- 172.** Franco Vega Mercado, Bruno Maggio, and Natalia Wilke. Phase diagram of mixed monolayers of stearic acid and dimyristoylphosphatidylcholine. effect of the acid ionization. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(5):386 – 392, 2011.
-

-
173. N. Wilke. Monomolecular films of surfactants with phase-coexistence: Distribution of the phases and their consequences. In *Comprehensive guide for nanocoatings technology*, pages 139 – 158. NOVA Science, 2015.
174. Gerhard Schwarz and Susanne E. Taylor. Thermodynamic analysis of the surface activity exhibited by a largely hydrophobic peptide. *Langmuir*, 11(11):4341–4346, 1995.
175. Gerhard Schwarz and Susanne E. Taylor. Peptide-lipid interactions in langmuir monolayers at the air/water interface. a novel thermodynamic analysis of a two-component surfactant system. *Supramolecular Science*, 4(3):479 – 483, 1997.
176. Régine Maget-Dana. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1462(1–2):109 – 140, 1999.
177. Mariana Varas, Mariela Sánchez-Borzzone, Julieta M. Sánchez, Susana R. de Barioglio, and María A. Perillo. Surface behavior and peptide–lipid interactions of the cyclic neuropeptide melanin concentrating hormone. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(24):7330–7337, 2008. PMID: 18503269.
178. Ernesto E Ambroggio, Frances Separovic, John Bowie, and Gerardo D Fidelio. Surface behaviour and peptide–lipid interactions of the antibiotic peptides, maculatin and citropin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1664(1):31 – 37, 2004.
179. Lohans Pedrera, Andreza B. Gomide, Rafael E. Sánchez, Uris Ros, Natalia Wilke, Fabiola Pazos, María E. Lanio, Rosangela Itri, María Laura Fanani, and Carlos Alvarez. The presence of sterols favors sticholysin i-membrane association and pore formation regardless of their ability to form laterally segregated domains. *Langmuir*, 31(36):9911–9923, 2015. PMID: 26273899.
180. R.A. Demel, W.S.M. Geurts van Kessel, R.F.A. Zwaal, B. Roelofsen, and L.L.M. van Deenen. Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 406(1):97 – 107, 1975.
181. Ana P. Ramos, Christiane Pavani, Yassuko Iamamoto, and Maria E.D. Zaniquelli. Porphy-
-

- rin–phospholipid interaction and ring metallation depending on the phospholipid polar head type. *Journal of Colloid and Interface Science*, 350(1):148 – 154, 2010.
- 182.** Naomi Sakai, Toshihide Takeuchi, Shiroh Futaki, and Stefan Matile. Direct observation of anion-mediated translocation of fluorescent oligoarginine carriers into and across bulk liquid and anionic bilayer membranes. *ChemBioChem*, 6(1):114–122, 2005.
- 183.** Nabil A. Alhakamy, Ibrahim Elandalousi, Saba Ghazvini, Cory J. Berkland, and Prajna-paramita Dhar. Effect of lipid headgroup charge and ph on the stability and membrane insertion potential of calcium condensed gene complexes. *Langmuir*, 31(14):4232–4245, 2015. PMID: 25768428.
- 184.** XiaoCong He, Min Lin, Jun Guo, ZhiGuo Qu, and Feng Xu. Experimental and simulation studies of polyarginines across the membrane of giant unilamellar vesicles. *RSC Adv.*, 6:30454–30459, 2016.
- 185.** Marcel Reuter, Christian Schwieger, Annette Meister, Göran Karlsson, and Alfred Blume. Poly-l-lysines and poly-l-arginines induce leakage of negatively charged phospholipid vesicles and translocate through the lipid bilayer upon electrostatic binding to the membrane. *Biophysical Chemistry*, 144(1–2):27 – 37, 2009.
- 186.** A.M. Bouchet, F. Lairion, J.-M. Ruyschaert, and M.F. Lensink. Oligoarginine vectors for intracellular delivery: Role of arginine side-chain orientation in chain length-dependent destabilization of lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165(1):89 – 96, 2012.
- 187.** Antonin Lamazière, Gérard Chassaing, Germain Trugnan, and Jesus Ayala-Sanmartin. Tubular structures in heterogeneous membranes induced by the cell penetrating peptide penetratin. *Communicative & Integrative Biology*, 2(3):223–224, 2009. PMID: 19641736.
- 188.** Candelaria I. Cámara and Natalia Wilke. Interaction of dextran derivatives with lipid monolayers and the consequential modulation of the film properties. *Chemistry and Physics of Lipids*, 204:34 – 42, 2017.
- 189.** Elisabete Gonçalves, Eric Kitas, and Joachim Seelig. Binding of oligoarginine to membrane lipids and heparan sulfate: structural and thermodynamic characterization of a cell-penetrating peptide. *Biochemistry*, 44(7):2692–2702, 2005. PMID: 15709783.
-

190. Sabrina Sharmin, Md. Zahidul Islam, Mohammad Abu Sayem Karal, Sayed Ul Alam Shibly, Hideo Dohra, and Masahito Yamazaki. Effects of lipid composition on the entry of cell-penetrating peptide oligoarginine into single vesicles. *Biochemistry*, 55(30):4154–4165, 2016. PMID: 27420912.
 191. Md. Zahidul Islam, Hirotaka Ariyama, Jahangir Md. Alam, and Masahito Yamazaki. Entry of cell-penetrating peptide transportan 10 into a single vesicle by translocating across lipid membrane and its induced pores. *Biochemistry*, 53(2):386–396, 2014. PMID: 24397335.
 192. Emelía Eiríksdóttir, Karidia Konate, Úlo Langel, Gilles Divita, and Sébastien Deshayes. Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1798(6):1119 – 1128, 2010.
 193. Matías A. Via, Joaquín Klug, Natalia Wilke, Luis S. Mayorga, and M. G. Del Pópolo. The interfacial electrostatic potential modulates the insertion of cell-penetrating peptides into lipid bilayers. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20:5180–5189, 2018.
 194. Thomas Hitz, Rico Iten, James Gardiner, Kenji Namoto, Peter Walde, and Dieter Seebach. Interaction of alfa- and beta-oligoarginine-acids and amides with anionic lipid vesicles: a mechanistic and thermodynamic study. *Biochemistry*, 45(18):5817–5829, 2006. PMID: 16669625.
 195. Astrid Walrant, Sébastien Cardon, Fabienne Burlina, and Sandrine Sagan. Membrane crossing and membranotropic activity of cell-penetrating peptides: Dangerous liaisons? *Accounts of Chemical Research*, 50(12):2968–2975, 2017. PMID: 29172443.
 196. Hiroshi Mitsui, Takashi Inozume, Reiko Kitamura, Naotaka Shibagaki, and Shinji Shimada. Polyarginine-mediated protein delivery to dendritic cells presents antigen more efficiently onto mhc class i and class ii and elicits superior antitumor immunity. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(8):1804 – 1812, 2006.
 197. Omid Veisheh, Forrest M. Kievit, Hyejung Mok, Joseph Ayesh, Cassra Clark, Chen Fang, Matthew Leung, Hamed Arami, James O. Park, and Miqin Zhang. Cell transcytosing poly-arginine coated magnetic nanovector for safe and effective sirna delivery. *Biomaterials*, 32(24):5717 – 5725, 2011.
-

198. Simon W Jones, Richard Christison, Ken Bundell, Catherine J Voyce, Sarah M V Brockbank, Peter Newham, and Mark A Lindsay. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *British Journal of Pharmacology*, 145(8):1093–1102, 2005.
 199. Yayuan Liu, Rui Ran, Jiantao Chen, Qifang Kuang, Jie Tang, Ling Mei, Qianyu Zhang, Huile Gao, Zhirong Zhang, and Qin He. Paclitaxel loaded liposomes decorated with a multifunctional tandem peptide for glioma targeting. *Biomaterials*, 35(17):4835 – 4847, 2014.
 200. Swati Biswas, Pranali P. Deshpande, Federico Perche, Namita S. Dodwadkar, Shailendra D. Sane, and Vladimir P. Torchilin. Octa-arginine-modified pegylated liposomal doxorubicin: An effective treatment strategy for non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*, 335(1):191 – 200, 2013.
 201. Betty R. Liu, Yue wern Huang, Jeffrey G. Winiarz, Huey-Jenn Chiang, and Han-Jung Lee. Intracellular delivery of quantum dots mediated by a histidine- and arginine-rich hr9 cell-penetrating peptide through the direct membrane translocation mechanism. *Biomaterials*, 32(13):3520 – 3537, 2011.
 202. Daejin Kim, In-Hyun Lee, Sunghyun Kim, Minsuk Choi, Hyungjun Kim, Sukyung Ahn, Phei Er Saw, Hyungsu Jeon, Yumi Lee, and Sangyong Jon. A specific stat3-binding peptide exerts antiproliferative effects and antitumor activity by inhibiting stat3 phosphorylation and signaling. *Cancer Research*, 74(8):2144–2151, 2014.
 203. Azam Bolhassani, Behnaz Sadat Jafarzade, and Golnaz Mardani. In vitro and in vivo delivery of therapeutic proteins using cell penetrating peptides. *Peptides*, 87:50 – 63, 2017.
 204. Samad Mussa Farkhani, Abbas Asoudeh Fard, Parvin Zakeri-Milani, Javid Shahbazi Mojarrad, and Hadi Valizadeh. Enhancing antitumor activity of silver nanoparticles by modification with cell-penetrating peptides. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(5):1029–1035, 2017. PMID: 27357085.
 205. Soyeon Park, Eun Ju Jeong, Jangwook Lee, Taiyoun Rhim, Sang Kyung Lee, and Kuen Yong Lee. Preparation and characterization of nonaarginine-modified chitosan nanoparticles for sirna delivery. *Carbohydrate Polymers*, 92(1):57 – 62, 2013.
 206. Jagat R. Kanwar, Ganesh Mahidhara, and Rupinder K. Kanwar. Antiangiogenic therapy
-

- using nanotechnological-based delivery system. *Drug Discovery Today*, 16(5):188 – 202, 2011.
- 207.** Elamprakash N. Savariar, Csilla N. Felsen, Nadia Nashi, Tao Jiang, Lesley G. Ellies, Paul Steinbach, Roger Y. Tsien, and Quyen T. Nguyen. Real-time in vivo molecular detection of primary tumors and metastases with ratiometric activatable cell-penetrating peptides. *Cancer Research*, 73(2):855–864, 2013.
- 208.** Gerile Candan, Hiroyuki Michiue, Sanae Ishikawa, Atsushi Fujimura, Keiichiro Hayashi, Atsuhito Uneda, Akiko Mori, Iori Ohmori, Tei ichi Nishiki, Hideki Matsui, and Kazuhito Tomizawa. Combining poly-arginine with the hydrophobic counter-anion 4-(1-pyrenyl)-butyric acid for protein transduction in transdermal delivery. *Biomaterials*, 33(27):6468 – 6475, 2012.
- 209.** Toshihide Takeuchi, Michie Kosuge, Akiko Tadokoro, Yukio Sugiura, Mayumi Nishi, Mitsuhiro Kawata, Naomi Sakai, Stefan Matile, and Shiroh Futaki. Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate. *ACS Chemical Biology*, 1(5):299–303, 2006. PMID: 17163758.
- 210.** James R. Maiolo, Marc Ferrer, and Elizabeth A. Ottinger. Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1712(2):161 – 172, 2005.
- 211.** F. Javier Montes Ruiz-Cabello, Gregor Trefalt, Plinio Maroni, and Michal Borkovec. Electric double-layer potentials and surface regulation properties measured by colloidal-probe atomic force microscopy. *Phys. Rev. E*, 90:012301, Jul 2014.
- 212.** J. Kim, M. Mosior, L.A. Chung, H. Wu, and S. McLaughlin. Binding of peptides with basic residues to membranes containing acidic phospholipids. *Biophysical Journal*, 60(1):135 – 148, 1991.
- 213.** Marco M. Domingues, Patrícia S. Santiago, Miguel A. R. B. Castanho, and Nuno C. Santos. What can light scattering spectroscopy do for membrane-active peptide studies? *Journal of Peptide Science*, 14(4):394–400.
- 214.** Sharon L. Schendel and William A. Cramer. On the nature of the unfolded intermediate in the in vitro transition of the colicin e1 channel domain from the aqueous to the membrane phase. *Protein Science*, 3(12):2272–2279.
-

-
215. M. Zasloff. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415:389–395, 2002.
216. Yuki Takechi, Hirokazu Tanaka, Hiroki Kitayama, Haruka Yoshii, Masafumi Tanaka, and Hiroyuki Saito. Comparative study on the interaction of cell-penetrating polycationic polymers with lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165(1):51 – 58, 2012.
217. João Miguel Freire, Marco M. Domingues, Joana C Matos, Manuel Nuno Melo, Ana Salomé Veiga, Nuno Miguel Carvalho Santos, and Miguel A. R. B. Castanho. Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. In *European Biophysics Journal*, 2010.
218. E. J. Findlay and P. G. Barton. Peptide-lipid interaction sites affect vesicles' responses to antimicrobial peptides. *Biochemistry*, 17(12):2400–5, 1978.
219. E.M. El Mashak, F. Lakhdar-Ghazal, and J.F. Tocanne. Effect of ph, mono- and divalent cations on the mixing of phosphatidylglycerol with phosphatidylcholine. a monolayer (π , δv) and fluorescence study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 688(2):465 – 474, 1982.
220. Keough K. M. W. Physical chemical properties of some mixtures of lipids and their potential for use as exogenous pulmonary surfactants. *Current Concepts in Surfactant Research. 2nd International Symposium on Surfactant Research*, 18:257 – 262, 1984.
221. Sandy Koppenol, Hyuk Yu, and George Zografis. Mixing of saturated and unsaturated phosphatidylcholines and phosphatidylglycerols in monolayers at the air/water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 189(1):158 – 166, 1997.
222. Daniel Persson, Per E.G. Thorén, Elin K. Esbjörner, Mattias Goksör, Per Lincoln, and Bengt Nordén. Vesicle size-dependent translocation of penetratin analogs across lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1665(1):142 – 155, 2004.
223. Christoph Allolio, Aniket Magarkar, Piotr Jurkiewicz, Katarína Baxová, Matti Javanainen, Philip E. Mason, Radek Šachl, Marek Cebecauer, Martin Hof, Dominik Horinek, Veronika Heinz, Reinhard Rachel, Christine M. Ziegler, Adam Schröfel, and Pavel Jungwirth. Arginine-rich cell-penetrating peptides induce membrane multilamellarity and
-

- subsequently enter via formation of a fusion pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(47):11923–11928, 2018.
- 224.** Yukihiro Tamba and Masahito Yamazaki. Single giant unilamellar vesicle method reveals effect of antimicrobial peptide magainin 2 on membrane permeability. *Biochemistry*, 44(48):15823–15833, 2005. PMID: 16313185.
- 225.** Tomoki Tanaka, Yukihiro Tamba, Shah Md Masum, Yuko Yamashita, and Masahito Yamazaki. La(3+) and gd(3+) induce shape change of giant unilamellar vesicles of phosphatidylcholine. *Biochimica et biophysica acta*, 1564(1):173—182, August 2002.
- 226.** N. Fa, L. Lins, P.J. Courtoy, Y. Dufrière, P. Van Der Smissen, R. Brasseur, D. Tyteca, and M.-P. Mingeot-Leclercq. Decrease of elastic moduli of dopc bilayers induced by a macrolide antibiotic, azithromycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(7):1830 – 1838, 2007.
- 227.** Candelaria I. Cámara, Florencia E. Lurgo, Maria Laura Fanani, and Natalia Wilke. Mechanical stability of lipid membranes decorated with dextran sulfate. *ACS Omega*, 3(9):11673–11683, 2018.
- 228.** Antonin Lamazière, Claude Wolf, Olivier Lambert, Gérard Chassaing, Germain Trugnan, and Jesus Ayala-Sanmartin. The homeodomain derived peptide penetratin induces curvature of fluid membrane domains. *PLOS ONE*, 3(4):1–8, 04 2008.
- 229.** Matías A. Via, Mario G. Del Pópolo, and Natalia Wilke. Negative dipole potentials and carboxylic polar head groups foster the insertion of cell-penetrating peptides into lipid monolayers. *Langmuir*, 34(9):3102–3111, 2018.
- 230.** Matías A. Via, Natalia Wilke, and Mario G. Del Pópolo. Surface charge and fatty acids modulate the membrane permeation rate of polyarginines, improving its cpp effect. *en preparación*, 2019.
-