

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA-Universidad de la República

Permeabilidad de membranas lipídicas al peróxido de hidrógeno

Lic. Ana Clara López Royes

Orientador: Matías Möller

Co-orientador: Leonor Thomson

Laboratorios de Fisiología Biológica y Enzimología,

Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Montevideo, Diciembre 2020



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer especialmente a mis orientadores Matías y Leonor por su dedicación, paciencia, y un sinfín de discusiones, correcciones y consejos a lo largo de todo el proceso. El apoyo constante de ambos ha sido fundamental para realizar este trabajo.

A los compañeros de los laboratorios de Físicoquímica Biológica y Enzimología por la ayuda brindada durante estos años. Es un placer compartir mesadas, escritorios y reuniones con ellos.

A mi familia y amigos por acompañarme durante estos años, especialmente a Anto por su paciencia y por el apoyo durante todo el proceso.

Por último, a las agencias financiadoras, el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, la Comisión Sectorial de Investigación Científica y la Agencia Nacional de Investigación e Innovación.

Índice

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Membranas celulares	5
Difusión simple a través de membranas lipídicas	9
Membranas en la compartimentación de especies reactivas.....	14
Peróxido de hidrógeno: propiedades fisicoquímicas y efectos biológicos	15
Permeabilidad de membrana al H ₂ O ₂	19
OBJETIVOS.....	23
Objetivos específicos	23
MATERIALES y MÉTODOS	24
Equipamiento y reactivos	24
Determinación del coeficiente de reparto de H ₂ O ₂ entre agua y solventes orgánicos	24
Preparación y purificación de liposomas	27
Determinación del radio hidrodinámico.....	28
Determinación del coeficiente de permeabilidad.....	28
Determinación de la energía de activación.....	29
Fluidez de la membrana.....	29
Extracción de lípidos de glóbulos rojos	30
RESULTADOS	32
Coeficiente de reparto del H ₂ O ₂ entre agua y solventes orgánicos	33
Permeabilidad	37
Preparación y caracterización de liposomas.....	38
Determinación de la permeabilidad al H ₂ O ₂	41
Efecto de la temperatura y colesterol en liposomas de DMPC:DPPG	43
Efecto de la temperatura y colesterol en liposomas de DOPC:POPG.....	46

Energía de activación de la permeabilidad	48
Fluidez de membrana	50
Fluidez en liposomas de DMPC:DPPG	51
Fluidez en liposomas de DOPC:POPG	53
Liposomas símil glóbulo rojo.....	57
DISCUSIÓN GENERAL.....	61
CONCLUSIONES	65
REFERENCIAS.....	66

RESUMEN

En condiciones fisiológicas el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una especie oxidante producida por varios mecanismos enzimáticos. Tiene muchas funciones fisiológicas que incluyen defensa contra patógenos, vasodilatación y regulación del crecimiento celular, migración y proliferación. Se ha demostrado que la permeabilidad de la membrana celular al H_2O_2 depende parcialmente de la presencia de acuaporinas específicas, pero no hay datos sobre la difusión simple a través de la fracción lipídica de la membrana.

En este trabajo se determinó el coeficiente de partición (K_D°) entre disolventes orgánicos (octanol, hexadecano y aceite de oliva) y agua, así como la termodinámica del proceso. Esto nos da una idea del perfil de solubilidad del H_2O_2 a diferentes profundidades de membrana. Se encontró un K_D° de 0.07 en 1-octanol vs. agua, y disminuyó 4 órdenes de magnitud en hexadecano vs. agua. La distribución en disolventes orgánicos es termodinámicamente desfavorable. La principal barrera para el transporte de H_2O_2 a través de la membrana es termodinámica y se debe a la baja solubilidad del H_2O_2 en la fracción hidrófoba de la bicapa.

Por otro lado, se determinó el coeficiente de permeabilidad (P_m) al H_2O_2 de membranas puramente lipídicas. Para ello se prepararon liposomas con catalasa encapsulada, que nos permitieron determinar el P_m comparando la velocidad de consumo de H_2O_2 por la catalasa entre liposomas intactos y lisados. Ya que debido a la barrera de permeabilidad que presenta la membrana la velocidad con que la catalasa consume H_2O_2 es más lenta cuando está encapsulada que cuando está libre en solución. Los resultados indican que la permeabilidad de membranas compuestas por DMPC y DOPC con diferentes proporciones de DPPG, POPG y colesterol, varía entre $5 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ y $5.5 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$. Se estimó la energía de activación de la permeabilidad para estas membranas. También se buscó correlacionar el estado de empaquetamiento de los lípidos de la membrana con el P_m , utilizando propiedades de fluorescencia del laurdan, pero la relación no fue clara. Por último, se determinó el P_m en liposomas compuestos por lípidos extraídos de membranas de glóbulos rojos, cuyo valor a 25°C fue $(1.4 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$, del orden del P_m determinado para glóbulos rojos humanos intactos.

INTRODUCCIÓN

Membranas celulares

Las membranas son estructuras básicas para la función celular en todos los organismos vivos. Para que en una célula se den las reacciones necesarias para su funcionamiento sus componentes tienen que estar confinados en el espacio y separados del ambiente que la rodea.

En las células eucariotas, las membranas lipídicas funcionan como barreras selectivas que delimitan tanto las células como sus organelos citoplasmáticos, compartimentando así los procesos biológicos, y organizando sus funciones. Además de actuar como barrera permitiendo el flujo selectivo de nutrientes, productos de desechos, iones, etc., en las membranas ocurren diversos procesos bioquímicos, de regulación y de comunicación intercelular.

Las membranas celulares están compuestas principalmente por lípidos y proteínas, y en menor proporción por carbohidratos asociados (hasta un 10% del peso de algunas membranas)¹. En la actualidad suelen estar representadas por el modelo del mosaico fluido propuesto por Singer y Nicolson hace casi medio siglo² (Figura 1.A y B). En este modelo, los fosfolípidos que componen la membrana forman una bicapa, en la cual las regiones apolares se orientan hacia el centro y sus grupos polares quedan expuestos hacia el exterior de la bicapa interactuando con la fase acuosa, e inmersas en esta bicapa lipídica se acomodan diferentes tipos de proteínas.

A las proteínas asociadas a la membrana se las divide en dos grupos: proteínas integrales de membrana, que atraviesan la bicapa lipídica e interactúan con ésta mediante fuerzas hidrofóbicas y proteínas periféricas que se asocian a la interface de la bicapa lipídica a través de interacciones polares².

Este modelo se ha ido refinando (Figura 1.C), hoy se sabe que, si bien la membrana es una estructura “fluida”, esta fluidez no implica aleatoriedad, los lípidos se organizan lateralmente en el plano de la membrana en forma no uniforme y no aleatoria. Existen dominios enriquecidos en ciertos lípidos y proteínas^{3,4}.

La membrana celular tiene una alta densidad de proteínas transmembrana que perturban el empaquetamiento de los lípidos, obstaculizando la difusión lateral, interfiriendo con el orden de las cadenas carbonadas, y generando disparidad en el grosor de la bicapa^{4,5}.

Otra modificación del modelo surge al observar interacciones con el citoesqueleto y la matriz extracelular. El citoesqueleto provee puntos de unión a proteínas de la membrana limitando así su movimiento y dando lugar a la inmovilización de ciertas regiones de la membrana ^{6,7}.

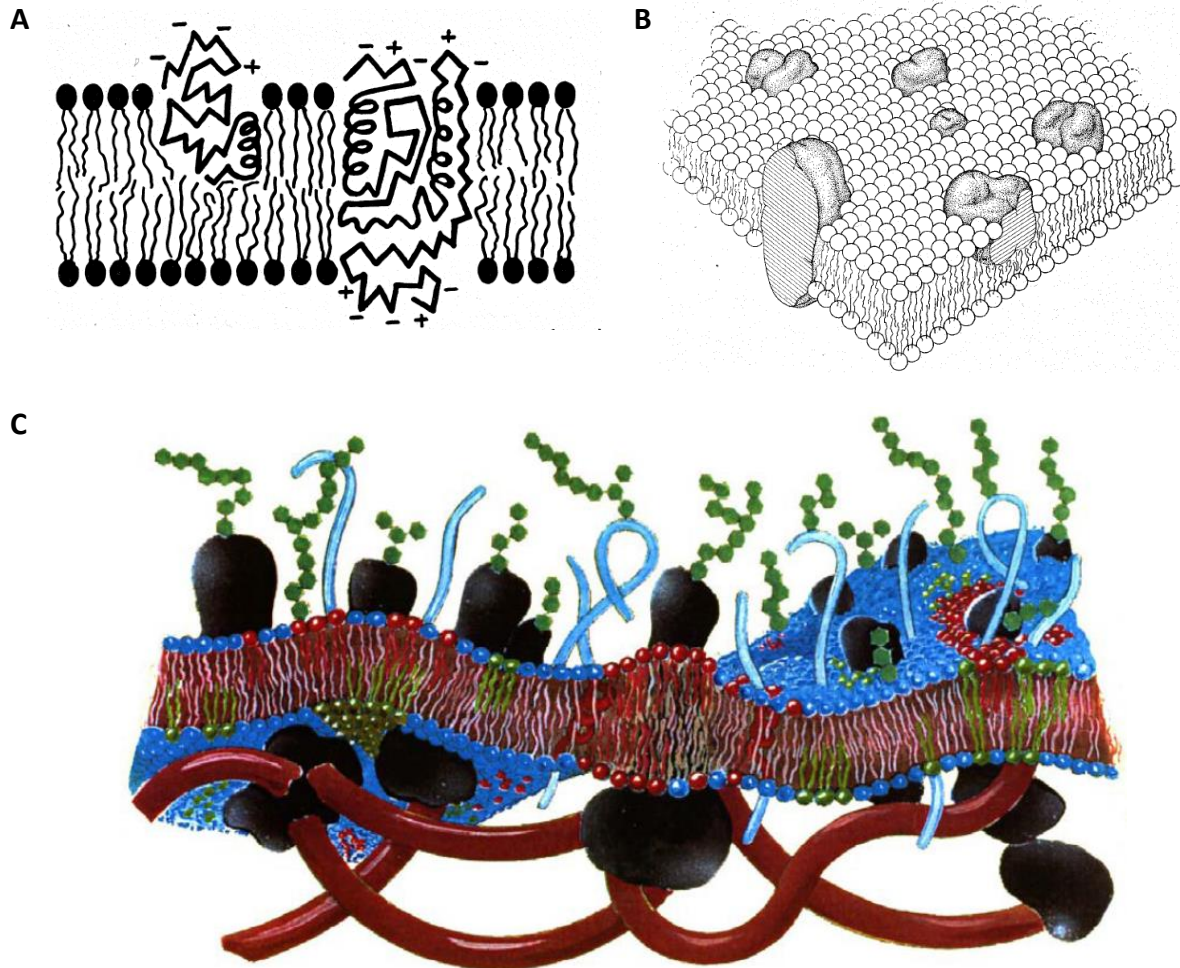


Figura 1. Evolución del modelo de membrana. **A.** Modelo de mosaico fluido propuesto por Singer y Nicolson en 1972, vista esquemática de sección transversal de membrana donde los círculos rellenos representan los grupos polares de las moléculas de fosfolípidos, que están en contacto con el agua, las líneas onduladas representan sus cadenas hidrocarbonadas y en líneas gruesas se representan las proteínas integrales. Las proteínas que sobresalen tienen en sus superficies residuos iónicos, mientras que los residuos no polares están incrustados en gran parte en la capa lipídica ². **B.** Representación esquemática tridimensional y transversal del modelo de mosaico fluido de membranas biológicas, donde los fosfolípidos se representan como esferas con colas y las proteínas integrales como objetos globulares sombreados incrustados ². **C.** Modelo actualizado de la membrana plasmática de una célula eucariota, donde se observa la membrana como una bicapa lipídica central intercalada entre el glicocálix extracelular (formado principalmente por polisacáridos, estructuras en color verde) y el citoesqueleto intracelular (red de proteínas poliméricas, representadas por tubos rojos). Intercaladas en la bicapa lipídica se muestran diversas proteínas integrales (representados en negro) y polipéptidos (tubos azules). La membrana está sujeta a oscilaciones y la bicapa lipídica muestra heterogeneidad lateral, formación de dominios lipídicos y variaciones de espesor cercanas a las proteínas integrales. Los diferentes componentes de la membrana no están dibujados a escala ⁸.

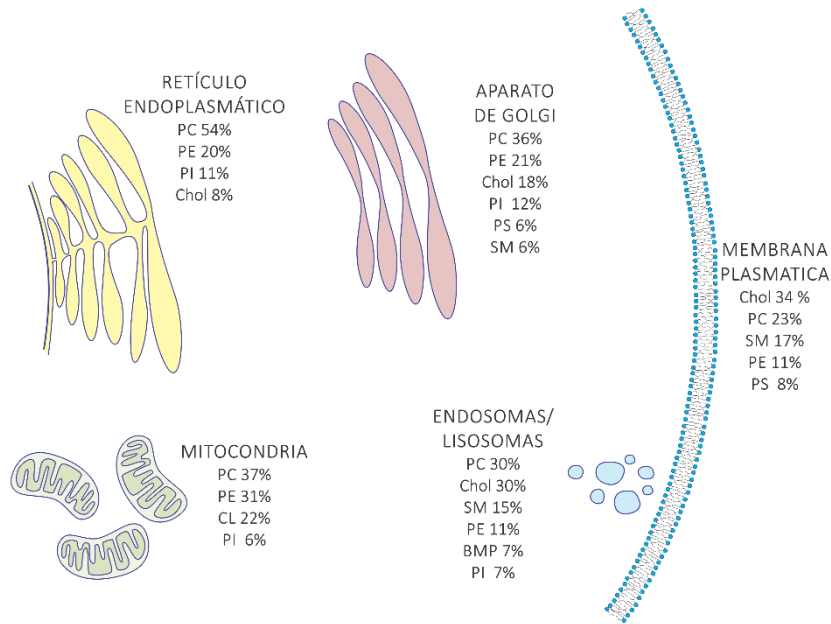
Los lípidos más abundantes en las células de mamíferos son la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE) y el colesterol (Chol), sin embargo, no todas las membranas tienen la misma composición, esta varía según el tipo celular y su ubicación subcelular (Figura 2.A).

Además, los lípidos en las membranas celulares se distribuyen de forma asimétrica (Figura 2.B), es decir las monocapas interna y externa que componen la bicapa lipídica no tienen la misma composición. A modo de ejemplo, en la monocapa externa de una membrana plasmática se encuentra una mayor proporción de esfingomielina (SM), PC y glicerofosfolípidos, mientras que en la monocapa interna se encuentra prácticamente la totalidad de los fosfolípidos cargados negativamente, la fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y PE⁹. La asimetría de los lípidos en las células se mantiene mediante flipasas y flopasas, enzimas que transportan lípidos a través de la bicapa, y por enzimas que sintetizan y degradan los lípidos en una u otra monocapa. La importancia de las flipasas está dada porque la exposición de fosfolípidos cargados negativamente al exterior es reconocida por macrófagos como una señal de células a ser fagocitadas y destruidas. La falta de flipasa en glóbulos rojos, por ejemplo, lleva a una mayor tasa de recambio¹⁰⁻¹². En ausencia de estas proteínas la velocidad de flip-flop de fosfolípidos es lenta (puede tardar días), en cambio, el colesterol, con su grupo de cabezas pequeño y débilmente polar, puede cruzar la bicapa lipídica en el orden de minutos o menos¹³.

En cuanto al contenido proteico de las membranas, este puede variar desde un 20% en el caso de las membranas de mielina neuronal hasta el 75% para la membrana interna de las mitocondrias¹⁴. Las proteínas son responsables de la mayoría de las funciones de las membranas particulares, por lo tanto, diferentes membranas también muestran diferentes composiciones de proteínas. En general, las membranas que son más activas metabólicamente tienen la mayor proporción de proteínas.

Las proteínas también están ubicadas asimétricamente en la membrana, siempre orientadas en la misma dirección. Algunas proteínas de la membrana plasmática están glicosiladas, y estas modificaciones se encuentran en la cara externa de la membrana. Estos carbohidratos en la superficie se utilizan en el reconocimiento, la comunicación y la adhesión célula-célula^{15, 16}.

A



B

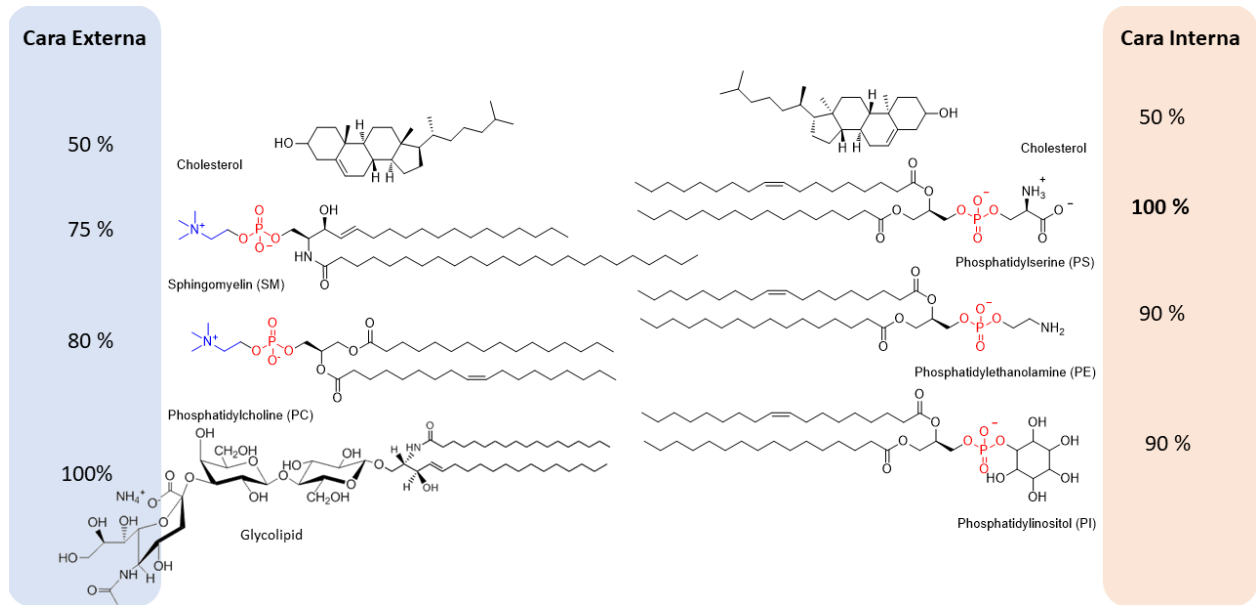


Figura 2. Composición lipídica de membranas biológicas. A. Esquematización de la composición lipídica en distintos organelos. Para cada organelo, los componentes lipídicos principales se enumeran según su contribución al contenido total de lípidos del organelo. Solo se muestran los lípidos que representan al menos el 5% de los lípidos totales para cada organelo. BMP: bis(monoacilglicerol)fosfato; Chol: colesterol; CL: cardiolipina; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; PS: fosfatidilserina; SM: esfingomiolina. Esquema no representado a escala, adaptado de ¹⁷. **B.** Asimetría de lípidos en la membrana de glóbulos rojos ¹⁸.

Si bien la función primordial de las membranas es la compartimentación de sustancias, estas deben permitir el pasaje de sustancias hacia un lado y otro de la membrana.

Los mecanismos para el transporte de moléculas pequeñas (e iones) a través de membranas se pueden clasificar en dos categorías: transporte pasivo y activo. El transporte pasivo es espontáneo, ocurre a favor de gradiente de concentración (o electroquímico). El transporte activo por el contrario ocurre en sentido opuesto al que ocurriría espontáneamente (en dirección opuesta al gradiente), y requiere una maquinaria reguladora que transporte las moléculas (con gasto de energía).

Dentro de los mecanismos de transporte pasivo se puede diferenciar entre difusión simple, difusión facilitada y ósmosis. Para el transporte activo se requiere de proteínas transportadoras que actúen como bombas contra el gradiente de concentración, además de una fuente de energía. Por otro lado, las macromoléculas o partículas grandes atraviesan las membranas mediante vesículas (endocitosis y exocitosis).

Las moléculas pequeñas sin carga son capaces de atravesar la membrana por difusión simple a través de los lípidos, la velocidad de transporte va a depender principalmente de su tamaño e hidrofobicidad. Para las moléculas polares, este mecanismo puede ser muy lento por lo que requieren proteínas de membrana para su transporte. La glucosa, por ejemplo, depende de la presencia de transportadores de membrana para ingresar a la célula ¹⁹. Los ácidos grasos, aunque contienen una gran cadena de acilo hidrófoba, son anfipáticos y también dependen de los transportadores en la membrana para ser internalizados ^{15, 20}.

Debido a la naturaleza apolar del interior de la membrana, una carga eléctrica enfrenta una barrera termodinámica muy grande que limita el pasaje de iones y especies iónicas a través de las membranas, y su transporte requiere de proteínas de transporte específicas ²¹. Por ejemplo, el CO₂ producto de la respiración mitocondrial puede atravesar las membranas por difusión simple, pero el bicarbonato, que es la principal forma de transportar CO₂ a los pulmones, necesita la proteína de membrana intercambiador de aniones 1 (AE1), también conocida como banda 3 de los eritrocitos ²².

Difusión simple a través de membranas lipídicas

Moléculas pequeñas sin carga pueden atravesar la membrana por difusión simple. La velocidad con la que estas moléculas atraviesan la membrana es proporcional a la diferencia de concentración entre ambos lados de la membrana, como se deriva de la primera ley de difusión de Fick, el flujo de moléculas por unidad de área J es:

$$J = \frac{D \Delta C}{d} \quad (1)$$

y tiene unidades de mol/s cm². D es el coeficiente de difusión en cm²/s, ΔC la diferencia de concentración entre las caras externa e interna de la membrana en mol/cm³ y d el espesor de la membrana en cm.

El coeficiente de permeabilidad (P_m) relaciona el flujo de moléculas a través de la membrana con la diferencia de concentración a ambos lados de la membrana (ecuación 2), tiene unidades de cm/s, y representa la velocidad con que una molécula se mueve a través de la membrana ¹⁴.

$$J = P_m \Delta C \quad (2)$$

$$P_m = \frac{D}{d} \quad (3)$$

Si se tiene en cuenta el área a través de la cual ocurre el flujo (\hat{A}), J se puede expresar como flujo neto de moléculas v_i , en mol/s:

$$v_i = P_m \hat{A} \Delta C \quad (4)$$

A su vez si se divide ambos términos de la ecuación por el volumen que encierra la membrana, se puede expresar la velocidad de ingreso de la molécula permeante en M/s como r_i :

$$r_i = \frac{P_m \hat{A} \Delta C}{V} \quad (5)$$

Y de esta forma queda expresada la permeabilidad como una constante de primer orden que depende de la relación área / volumen de la célula o liposoma en cuestión:

$$k_{\text{perm}} = \frac{P_m \hat{A}}{V} \quad (6)$$

Experimentos publicados por Overton en 1901 ya mostraron que la permeabilidad de una membrana biológica a este tipo de moléculas pequeñas sin carga, era proporcional a su solubilidad en un solvente orgánico, indicando que la permeabilidad dependía de un paso de incorporación de las moléculas a la región hidrofóbica de la membrana ^{23,24}. Esta observación fue reproducida muchas veces, y en la Figura 3 se muestran los resultados de Walter y Gutknecht ²⁵. Esta proporcionalidad dio lugar a la Ley de Overton: Cuanto más soluble es una molécula en solventes orgánicos, mayor permeabilidad.

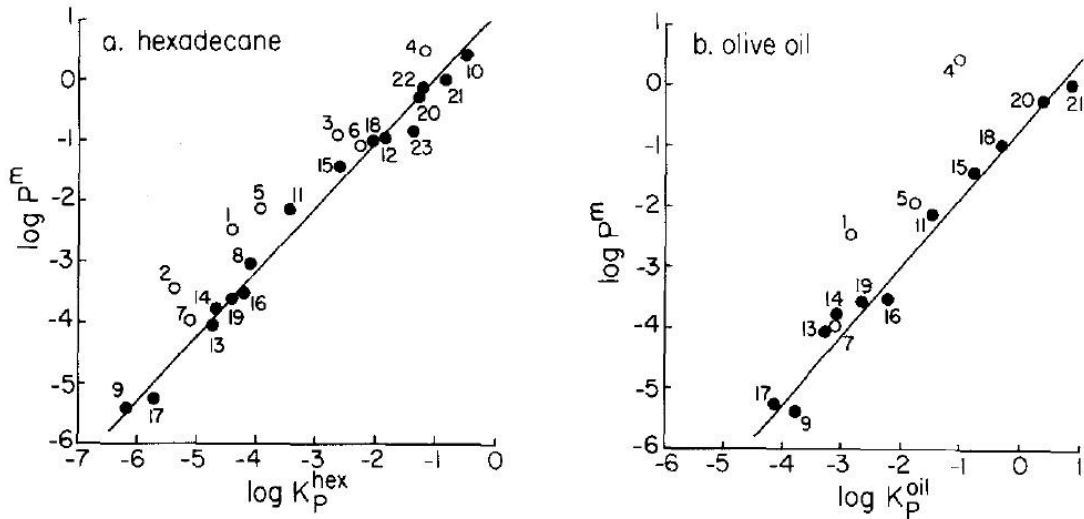


Figura 3. Proporcionalidad entre P_m y K_D° . Los valores de P_m fueron obtenidos en membranas planas de fosfatidilcolina de huevo, mientras que los valores de K_D° fueron obtenidos en hexadecano (izquierda) y aceite de oliva (derecha). Los números indican diferentes sustancias ensayadas, entre las que se destacan 1: Agua, 9: urea, 21: Acido hexanoico. Tomado de ²⁵

A su vez, de estas observaciones iniciales de Overton se desarrolló la teoría de la permeabilidad por solubilidad-difusión simple ^{26, 27}, que establece la relación entre el coeficiente de permeabilidad, el coeficiente de difusión de la molécula en la membrana (D_m), el coeficiente de reparto de la molécula entre la membrana y el agua (K_D°), y el ancho de la membrana (δ) (Figura 4).

Permeabilidad a través de los lípidos (P_m) depende de:

- Solubilidad en lípidos (K_D°)
- Difusión en lípidos (D_m)
- Ancho de la membrana ($\delta = 3-4 \text{ nm}$)

$$P_m = K_D^\circ \cdot D_m / \delta$$

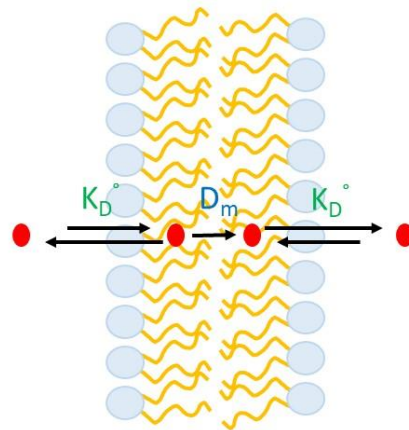
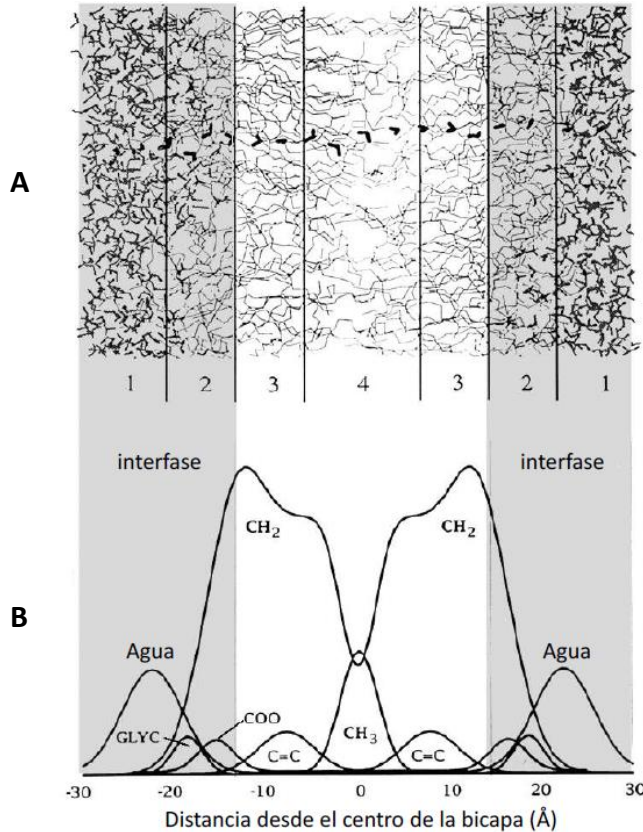


Figura 4. Permeabilidad por solubilidad-difusión simple. El modelo considera que se tiene que dar en primer lugar la disolución del soluto dentro de la membrana, luego la difusión a través de la membrana, y finalmente la salida con el pasaje del soluto a la fase acuosa en la otra cara de la membrana. Esto lleva a un modelo matemático sencillo, donde se relaciona el coeficiente de permeabilidad P_m , con el coeficiente de reparto K_D° , el coeficiente de difusión en la membrana D_m , y el ancho de la membrana. Este modelo es una simplificación del proceso real, pero captura los factores mecanísticos más importantes, y está respaldado por numerosos trabajos ^{25, 28}.

Esta relación es muy útil como primera aproximación al problema de la permeabilidad de membranas, pero varias deficiencias se hacen evidentes. Una de las más señaladas es que una bicapa lipídica, de fosfatidilcolina, por ejemplo, no es un medio homogéneo y presenta regiones con propiedades diferentes, que pueden afectar localmente la solubilidad y la difusión de la molécula. Por ejemplo, el centro de la bicapa es una región altamente hidrofóbica dominada por grupos alcano, mientras que la región de la interfase es altamente polar por la presencia de grupos fosfato y colina cargados (Figura 5).



Las diferencias de D_m y K_D° se pueden apreciar experimentalmente utilizando sondas a diferentes profundidades de la membrana, o teóricamente mediante simulaciones por dinámica molecular ²⁹⁻³¹. A partir de esos datos, el P_m se calcula:

$$P_m = \left(\int_{-d/2}^{d/2} \frac{1}{K(z)D(z)} dz \right)^{-1} \quad (7)$$

donde z denota la profundidad en la bicapa, $K(z)$ el reparto a esa profundidad, $D(z)$ la difusión, y d el ancho total de la membrana ²⁷.

Además de esta variación de $K(z)D(z)$ con la profundidad en la bicapa, el cambio de la composición de lípidos, o la temperatura también tendrá un efecto sobre el P_m . En un trabajo reciente utilizando fosfatidilcolina saturada se observó que para el oxígeno molecular, $K_D \cdot D_m$ variaba con la temperatura, pero más dramáticamente con el cambio de fase de la membrana del estado gel al estado líquido cristalino³², y este cambio se relacionaba principalmente con un cambio en K_D . O sea que una membrana en estado gel, donde los lípidos se encuentran altamente ordenados y empacados, y hay poco volumen libre, permite disolver mucho menos oxígeno que una membrana en estado líquido cristalino, fluido, donde los lípidos se encuentran desordenados y hay más volumen libre. Hay muchos otros trabajos que sugieren que las diferencias en el P_m observadas para una misma molécula en membranas de diferente composición se debe principalmente a las diferencias en el empaquetamiento de los lípidos y el volumen libre disponible para disolver la molécula^{33, 34}.

La barrera energética principal para la permeación de membranas lipídicas por moléculas no cargadas se encuentra en diferentes regiones de la membrana dependiendo del tipo de molécula. Utilizando cálculos de dinámica molecular, Cordeiro encontró que las moléculas apolares como el oxígeno encuentran una barrera mayor en la región de la interfase fosfolípido-agua, donde se encuentran las cabezas polares, mientras que el peróxido de hidrógeno, que es muy polar, encuentra una barrera mucho mayor a nivel del centro de la bicapa (Figura 6)³¹.

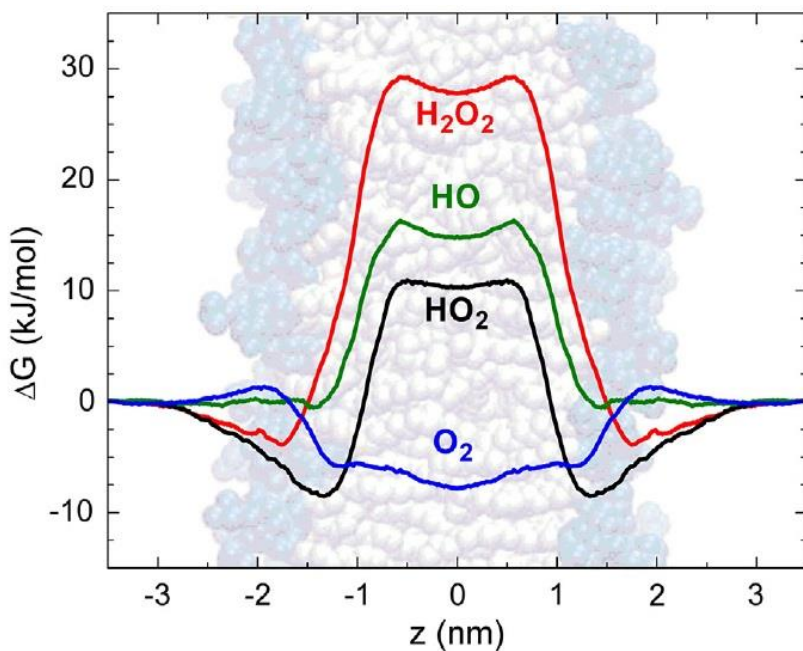


Figura 6. Perfil de energía de Gibbs (ΔG°) calculado para varias especies reactivas del oxígeno a diferentes profundidades de una bicapa de POPC. La energía de Gibbs negativa indica interacciones favorables con la membrana, mientras que la energía de Gibbs positiva indica interacciones desfavorables. Por lo tanto, se observa que el oxígeno interactúa menos favorablemente con la región de la interfase de la membrana, pero luego favorablemente con el centro de la misma. El H_2O_2 , en cambio, interactúa favorablemente con la interfase y desfavorablemente con el interior de la membrana. Tomado de³¹.

Membranas en la compartimentación de especies reactivas

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) incluyen una amplia gama de moléculas con diferentes propiedades fisicoquímicas. La mayoría de ROS y RNS derivan del oxígeno y del óxido nítrico (Figura 7) y tienen en común la capacidad de generar directa o indirectamente modificaciones oxidativas a biomoléculas.

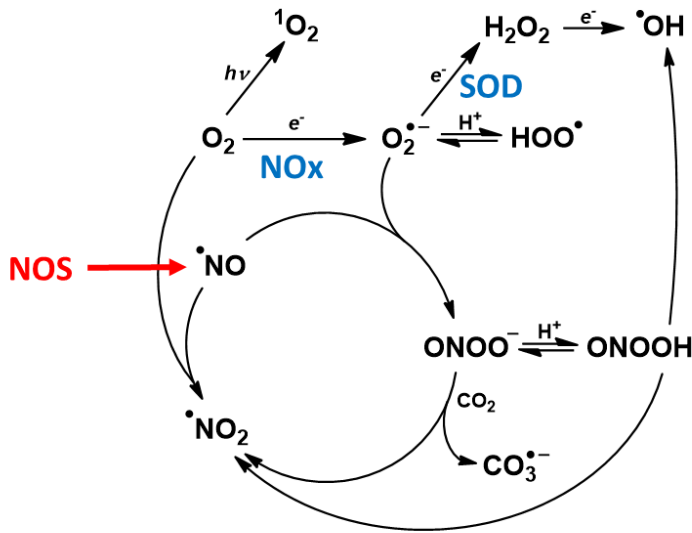


Figura 7. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

El oxígeno (O_2) y el óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) son los precursores de ROS y RNS. La fotosensibilización puede dar lugar a oxígeno singlete (1O_2) mientras que la reducción parcial de O_2 produce superóxido ($O_2^{\bullet -}$), que puede protonarse para dar el radical hidroperoxilo (HOO^{\bullet}) o reducirse aún más a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^{\bullet}). La reacción de $^{\bullet}NO$ con O_2 (autooxidación) genera dióxido de nitrógeno ($^{\bullet}NO_2$), mientras que la reacción con $O_2^{\bullet -}$ genera anión peroxinitrito ($ONOO^-$) que puede protonarse a ácido peroxinitroso ($ONOOH$) que luego puede homolizar y dar $^{\bullet}NO_2$ y HO^{\bullet} como productos (5-30% de rendimiento) o reaccionan con CO_2 y dan $^{\bullet}NO_2$ y radical carbonato ($CO_3^{\bullet -}$ 35% de rendimiento). Modificado de ²¹.

Muchas de estas especies reactivas son producidas en condiciones controladas por proteínas especializadas para realizar funciones fisiológicas, pero también pueden derivar de fuentes ambientales como smog, humo, xenobióticos y exposición a radiación ultravioleta.

Lograr una función fisiológica o ejercer un efecto tóxico dependerá en gran medida de la capacidad de las especies reactivas para atravesar las membranas celulares, por lo que se puede establecer una direccionalidad y compartimentación de la acción. Algunas de estas especies reactivas son capaces de atravesar membranas rápidamente por difusión simple, de modo que pueden difundir prácticamente sin obstáculos en un gran volumen de tejido. En este caso, las reacciones químicas más que las membranas serán responsables de disminuir su distancia de difusión. Sin embargo, otras moléculas reactivas encuentran barreras energéticas altas para atravesar las membranas, por lo que sus reacciones y acciones pueden compartimentarse más eficazmente (Figura 8) ²¹.

Además, las membranas celulares no son solo espectadoras del flujo de especies reactivas, sino que también son blancos de su reactividad. Los blancos más reactivos son los ácidos grasos poliinsaturados, cuya oxidación puede iniciar una reacción en cadena de peroxidación de lípidos, pero otros lípidos también pueden ser oxidados por especies reactivas específicas. La permeabilidad de las membranas a las diferentes especies reactivas también indica lo fácil que es para estas especies reactivas oxidar los lípidos y proteínas embebidas en una membrana.

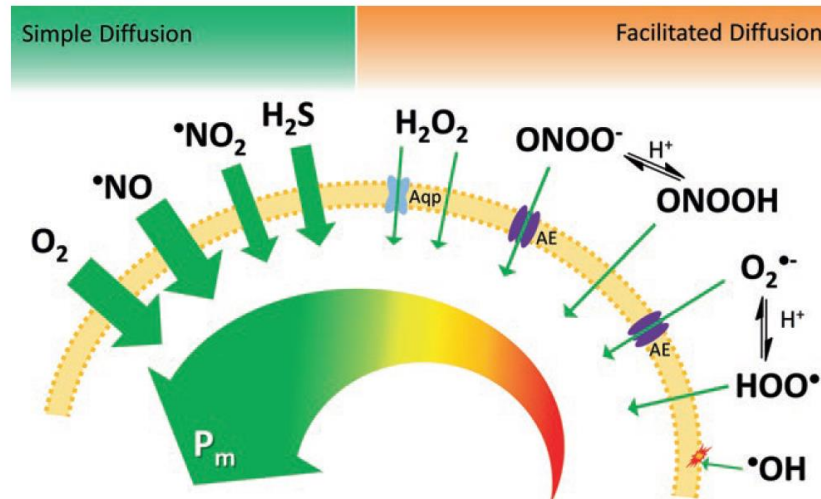


Figura 8. Permeabilidad de las membranas lipídicas a diferentes especies reactivas. El ancho de las flechas indica qué tan permeables son las membranas celulares a las diferentes moléculas. Se pueden diferenciar dos grupos en función de la permeabilidad de la membrana: 1) O_2 , $\cdot NO$, $\cdot NO_2$ y H_2S pueden atravesar las membranas lipídicas prácticamente sin obstáculos por difusión simple, 2) moléculas cuyas tasas de permeabilidad se ha observado que aumentan por la presencia de proteínas que facilitan su difusión a través de las membranas celulares: H_2O_2 (puede usar acuaporinas específicas, Aqp), $ONOO^-$ y $O_2^{\cdot -}$ (puede usar canales de proteína de intercambio aniónico, AE). La permeabilidad (P_m) a estas especies en su forma eléctricamente neutra a través de membranas de fosfolípidos puros es cinco órdenes de magnitud menor que la del O_2 . Se han observado adaptaciones celulares para disminuir la difusión simple por H_2O_2 , lo que indica que las membranas celulares podrían regular estrechamente el transporte de este grupo de moléculas reactivas. El radical hidroxilo se encuentra en una categoría diferente porque es tan reactivo que reacciona básicamente con cualquier componente cerca de la superficie de la membrana celular y por lo tanto no puede atravesarlo. Tomado de ²¹

Peróxido de hidrógeno: propiedades fisicoquímicas y efectos biológicos

La multifuncionalidad del H_2O_2 se debe a su química, los oxígenos del H_2O_2 tienen un número de oxidación intermedio de "-1", lo que explica las propiedades de reducción y oxidación.

El H_2O_2 posee un momento dipolar permanente de 2.26×10^{-18} esu, más alto que el del agua (1.85×10^{-18} esu) lo que sugiere una conformación cis sesgada (Figura 9) con los átomos de hidrógeno apuntando en la misma dirección relativa al enlace O-O y los pares de electrones solitarios orientados en la dirección

opuesta a los átomos de hidrógeno. Los pares de electrones solitarios no permiten la rotación libre alrededor del enlace O-O, dando como resultado un dipolo permanente. El H₂O₂ representa una de las moléculas quirales más pequeñas en la naturaleza y se produce como una mezcla racémica que contiene cantidades iguales de ambos enantiómeros ³⁵. Más allá de su reactividad, el H₂O₂ comparte muchas características físicas con agua (Tabla 1).

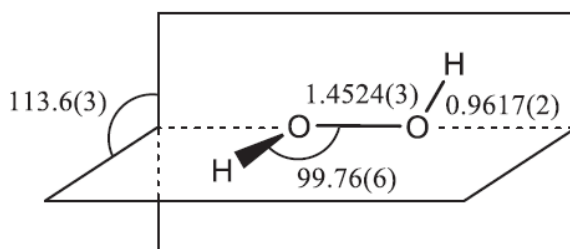


Figura 9. Geometría molecular del H₂O₂. Estructura de equilibrio semi-experimental del H₂O₂. Longitudes de enlace en Å y ángulos en grados. Obtenida de ³⁶.

Tabla 1. Propiedades físicas del peróxido de hidrógeno y el agua (25 °C, 1 atm)³⁵.

	H ₂ O ₂	H ₂ O
Densidad líquido 20 °C (g cm ⁻³)	1.450	0.998
Punto de fusión (°C)	-0.43	0
Punto de ebullición (°C)	150.2	100.0
Presión crítica (atm)	214	218.2
Temperatura crítica (°C)	457	374.2
Capacidad calorífica líquido (kJ kg ⁻¹ °C ⁻¹)	2.625	4.172
Constante dieléctrica	73.1	80.4
Índice de refracción	1.4067	1.3325
Momento dipolar (esu)	2.26 × 10 ⁻¹⁸	1.85 × 10 ⁻¹⁸

El H₂O₂ es un oxidante de dos electrones fuerte, con un potencial de reducción estándar (E'°) de 1.32 V a pH 7.0. Por tanto, es más oxidante que el ácido hipocloroso (OCl⁻/Cl⁻) o el peroxinitrito (ONOO⁻/NO₂⁻), cuyos valores equivalentes son 1.28 y 1.20 V, respectivamente. Sin embargo, a diferencia de estos, el H₂O₂ reacciona mal o no reacciona con la mayoría de las moléculas biológicas, incluidos los antioxidantes de bajo peso molecular. Esto se debe a que debe superarse una barrera de alta energía de activación para liberar su poder oxidante, en otras palabras, las reacciones del H₂O₂ son impulsadas cinéticamente en lugar de termodinámicamente.

El H_2O_2 es un oxidante de un electrón débil ($E'^{\circ} = 0.32 \text{ V}$). Sin embargo, el producto de reducción de un electrón, el radical hidroxilo, es uno de los oxidantes más fuertes conocidos ($E'^{\circ} = 2.31 \text{ V}$). Sus reacciones tienen una barrera de energía de activación muy baja y ocurren a velocidades cercanas a las controladas por difusión.

El H_2O_2 tiene un pK_a de 11,6, por lo que generalmente se encuentra sin carga a pH fisiológico. El anión (HOO^-) es un nucleófilo fuerte, pero sus reacciones están limitadas por el alto pK_a . Debido a la polarizabilidad del enlace O–O, el H_2O_2 también puede actuar como un electrófilo, las proteínas que facilitan la polarización mejoran su reactividad en muchos órdenes de magnitud. El enlace O–O también es relativamente débil y es susceptible de homólisis cuando el H_2O_2 se somete a calentamiento, radiólisis, fotólisis o metales redox. Esto da lugar al radical hidroxilo o, en algunos casos, a un estado de oxidación superior del metal. Estos productos secundarios son responsables de muchas de las fuertes acciones oxidantes (o desinfectantes) del H_2O_2 ³⁷.

El peróxido de hidrógeno es probablemente la especie reactiva del oxígeno más abundante *in vivo* ³⁸. Puede producirse exógenamente por exposición a una variedad de factores ambientales tóxicos, contaminantes y productos químicos (por ejemplo, hidrocarburos, hidrocarburos clorados, formaldehído y plaguicidas). Además se ha demostrado que campos electromagnéticos e irradiación ultravioleta inducen niveles aumentados de H_2O_2 en tejidos y fluidos corporales ³⁹.

De forma endógena el H_2O_2 se produce y consume mediante numerosos procesos enzimáticos y no enzimáticos (Figura 10). En los mamíferos, la fuga de electrones que se producen a nivel del transporte de electrones mitocondrial lleva a la generación de superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). La dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$, tanto espontánea como catalizada por la isoforma mitocondrial dependiente de manganeso de la superóxido dismutasa (Mn-SOD o SOD2) es una fuente mitocondrial de H_2O_2 . Las NADPH oxidasas (NOX) catalizan la oxidación de NADPH y la reducción de oxígeno. La mayoría de estos complejos multienzimáticos asociados a la membrana generan superóxido, que luego dismuta para dar H_2O_2 , o incluso algunos lo producen directamente ⁴⁰.

El H_2O_2 también se produce en la luz del retículo endoplasmático durante el plegamiento oxidativo de proteínas. Las flavoproteínas oxidasas ERO1 y QSOX catalizan la reducción de oxígeno a H_2O_2 , con la oxidación concomitante de residuos de cisteína a disulfuros. La mayor parte del H_2O_2 producido en estas reacciones es metabolizado por las enzimas metabolizadoras de peróxido, peroxirredoxina 4 y las glutatión peroxidasas, GPx7 y GPx8 que se localizan en el retículo endoplásmico ⁴⁰.

En los peroxisomas se produce H_2O_2 , debido a enzimas como acilCoA oxidasa, poliamina oxidasa y D-aminoácido oxidasa que reducen el oxígeno a H_2O_2 durante la oxidación de su sustrato. En este compartimiento subcelular, la catalasa es la enzima encargada de descomponer el H_2O_2 restringiendo su liberación. Dada la capacidad del H_2O_2 de atravesar las membranas biológicas, la catalasa peroxisomal tiene además el potencial de descomponer el H_2O_2 de otros compartimientos celulares y, por lo tanto, puede influir en el metabolismo del H_2O_2 de otros sitios ⁴⁰.

Por último el H_2O_2 también es producido por muchas oxidasas extraperoxisomales como la xantina oxidasa, glucosa oxidasa, aldehído oxidasa, amina oxidasa, triptófano dioxigenasa y 5-lipoxigenasa ³⁹.

Desde su descubrimiento en 1819, el H_2O_2 se conoce como un agente dañino para biomoléculas como el ADN, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos. Sin embargo, en las últimas décadas ha comenzado a desvelarse el papel del H_2O_2 como molécula de señalización. En procariotas, por ejemplo, se encontró que el factor de transcripción OxyR es sensible al H_2O_2 y su oxidación desencadena la expresión de proteínas antioxidantes y de defensa al estrés ⁴¹. En levaduras también se han encontrado factores de transcripción que son activados por el H_2O_2 , como el Yap1 en *Saccharomyces cerevisiae* ⁴¹. En células de mamíferos se observan respuestas al H_2O_2 , como la proliferación, el crecimiento, la migración, la apoptosis y la supervivencia celular ^{41 39, 42}, pero los mecanismos moleculares aún están siendo dilucidados. Una de las hipótesis que está cobrando más fuerza es la de “redox relay”, que implica un primer paso donde el H_2O_2 oxida una proteína altamente reactiva como una peroxirredoxina, y esta le transfiere los equivalentes de oxidación a una segunda proteína que traduce la señal ⁴³.

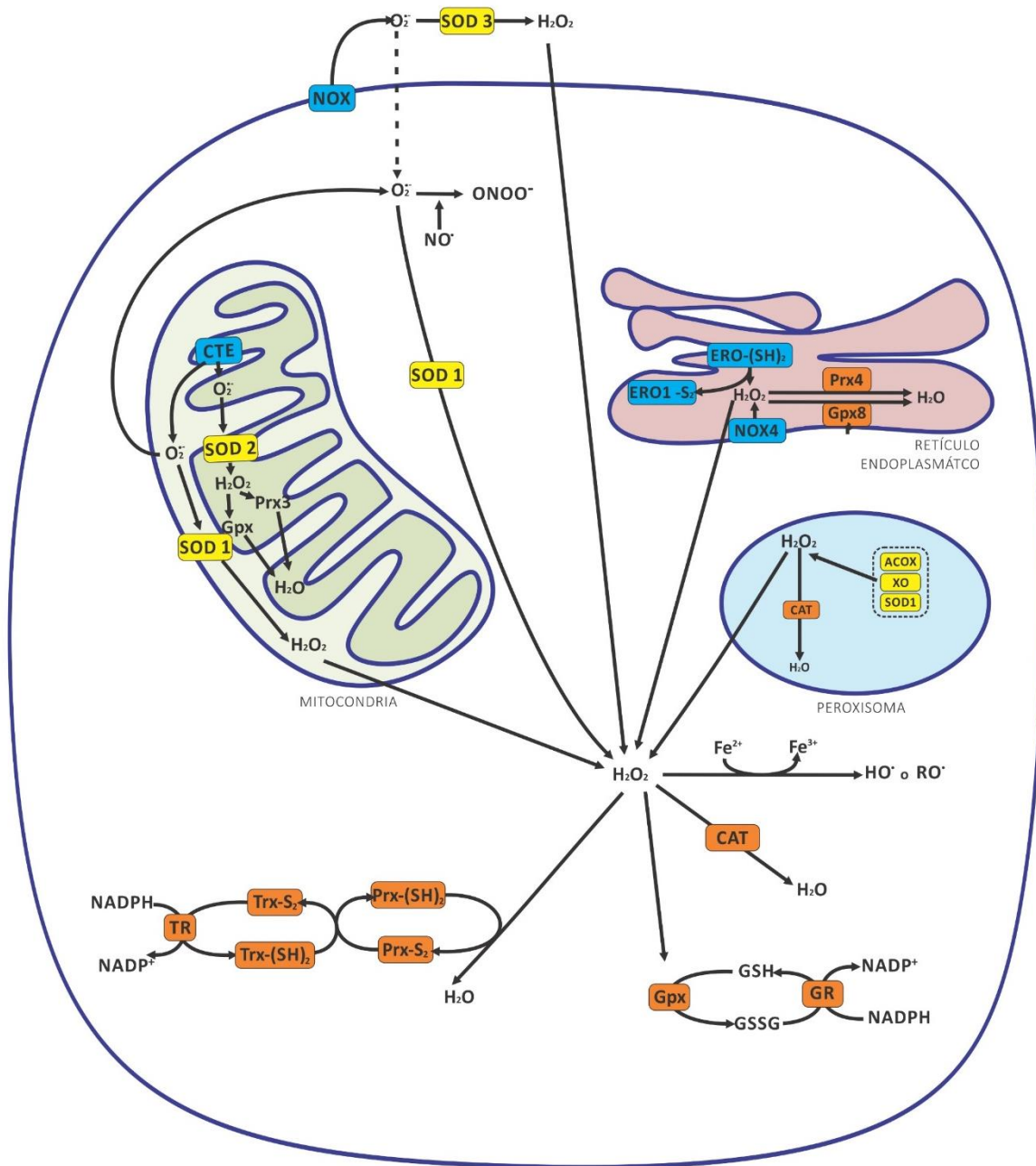


Figura 10. Fuentes y sumideros de H_2O_2 a nivel celular. Adaptado de ⁴⁴.

Permeabilidad de membrana al H_2O_2

La idea de una barrera de permeabilidad que imponga un límite a la entrada de peróxido de hidrógeno en la célula fue presentada en 1959 por Clayton⁴⁵ y en 1965 por Nicholls⁴⁶, mediante el estudio de la actividad catalasa en células intactas y lisadas de *Rhodospseudomonas spheroides* y eritrocitos de caballo, respectivamente.

Más tarde se reportó la presencia de gradientes a través de las membranas de líneas celulares de mamífero, bacterias y levaduras, lo que confirma que las membranas biológicas generalmente impiden la difusión libre de H₂O₂ ⁴⁷⁻⁴⁹. Llama la atención que hay muy pocos informes de permeabilidad de membranas puramente lipídicas al H₂O₂. Aunque se han observado cambios en las velocidades de difusión en función de la composición, la temperatura y la compresibilidad, no se han descrito coeficientes de permeabilidad para los liposomas ⁵⁰⁻⁵³. La mayoría de los coeficientes de permeabilidad al H₂O₂ reportados provienen de estudios con membranas celulares y se encuentran entre 3.6×10^{-4} y 120×10^{-4} cm s⁻¹, muy similares a los valores reportados para el agua (Tabla 2).

Tabla 2. Coeficiente de permeabilidad al H₂O₂ y al agua para diferentes membranas celulares, adaptado de ²¹.

Membrana	Permeante	T (°C)	P _m (cm s ⁻¹)	Referencia
Glóbulo rojo (caballo)	H ₂ O ₂	20	6×10^{-4}	46
Peroxisoma (hígado de rata)	H ₂ O ₂		3×10^{-3}	54
Glóbulo rojo (rata)	H ₂ O ₂		1.2×10^{-2}	50
Células T Jurkat	H ₂ O ₂	37	2×10^{-4}	47
<i>Chara corallina</i>	H ₂ O ₂		3.6×10^{-4}	55
<i>Escherichia coli</i>	H ₂ O ₂	37	1.6×10^{-3}	48
Células PC12	H ₂ O ₂		4×10^{-4}	56
Células HUVEC	H ₂ O ₂		1.6×10^{-3}	56
Células IMR-90	H ₂ O ₂		1.1×10^{-3}	56
Células HeLa	H ₂ O ₂		4.4×10^{-4}	57
Glóbulo rojo (humano)	H ₂ O	25	5×10^{-3}	58
Glóbulo rojo (rata)	H ₂ O	20	6.5×10^{-3}	59

El agua y el H₂O₂ tienen propiedades moleculares similares (Tabla 1), casi el mismo momento dipolar, constante dieléctrica, diámetro molecular y capacidad para formar enlaces de hidrógeno ⁶⁰. De hecho, se cree que el H₂O₂ pasa al interior de la célula de la misma forma que el agua, tanto por difusión simple como por difusión facilitada a través de acuaporinas específicas. El primer estudio que mostró que las acuaporinas facilitan la difusión de H₂O₂ fue realizado por Henzler y Steudle, en el modelo de célula vegetal *Chara corallina* ⁵⁵.

Las acuaporinas son proteínas tetraméricas, donde cada monómero actúa como un canal funcional compuesto por seis hélices que atraviesan la membrana conectadas por cinco bucles (A a E). Los bucles B

y E contienen la secuencia asparagina-prolina-alanina (NPA) altamente conservada y estos motivos se encuentran a la altura del centro de la bicapa, formando una vía hidrófoba estrecha. Un segundo filtro de selectividad lo proporciona la región aromática/arginina (ar/R), formada por cuatro aminoácidos, que actúa como barrera de exclusión de tamaño y genera el ambiente adecuado para el establecimiento de los enlaces de hidrógeno necesarios para transportar el sustrato ⁶⁰.

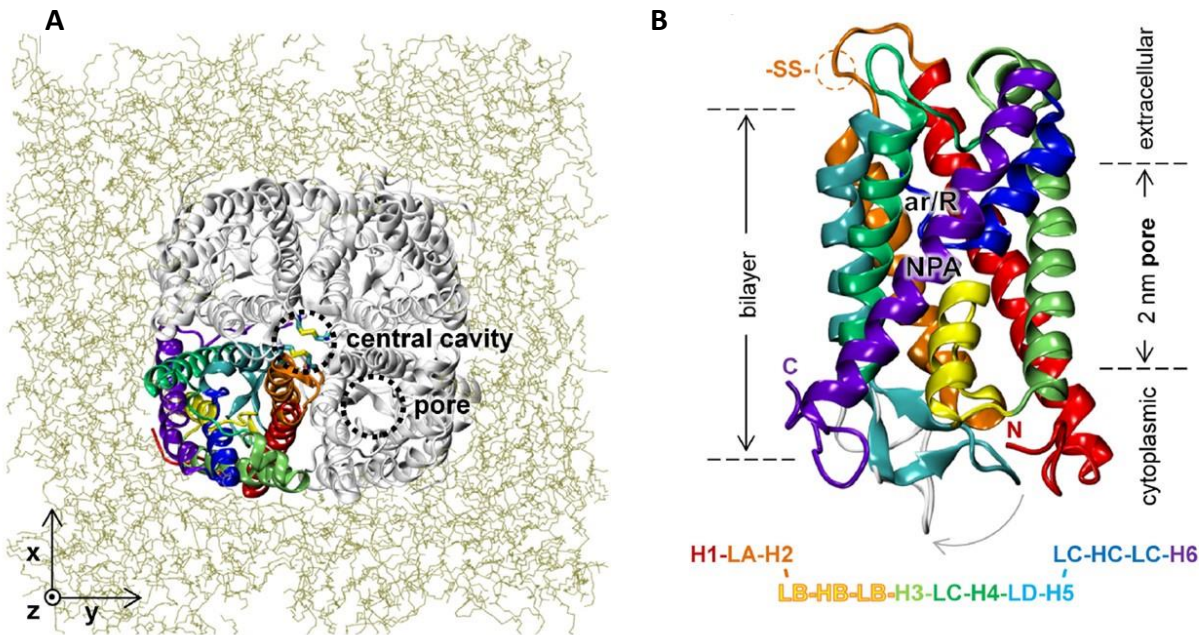


Figura 11. A. Vista superior del tetrámero (gris) incrustado en una bicapa de fosfolípidos (marrón), con uno de los monómeros resaltado en color. Uno de los poros y la cavidad central están indicados por círculos punteados. **B.** Estructura de un monómero de acuaporina, las α -hélices y los bucles están coloreados desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal de acuerdo con la leyenda. Se indican la región NPA altamente conservada y la región ar/R. Adaptado de ⁶¹

La importancia de las acuaporinas para facilitar la difusión de H_2O_2 fue establecida por Bienert et al., quienes utilizaron *Saccharomyces cerevisiae* para expresar diferentes acuaporinas. La sobreexpresión de acuaporina humana 8 (hAQP8) y TIP1; 1 y TIP1; 2 de *Arabidopsis thaliana* condujeron a una disminución del crecimiento y la supervivencia de las levaduras expuestas al H_2O_2 ⁶². Por el contrario, hAQP1, hAQP2, rAQP3, rAQP4, hAQP5, hAQP9 y otras acuaporinas de *Arabidopsis thaliana* no afectaron la supervivencia de las levaduras al exponerlas a H_2O_2 , lo que sugiere que estas isoformas no son permeables al H_2O_2 ^{60, 62}. Ensayos similares identificaron AQP1 de rata y muchas otras acuaporinas de plantas, incluida PIP2; 1 de *Arabidopsis thaliana*, como facilitadores de la difusión de H_2O_2 a través de la membrana ^{60, 63}. Se sugirió que las acuaporinas de tipo PIP2 son canales de H_2O_2 eficientes, y la principal regulación del paso de H_2O_2

viene dada por la región ar/R⁶⁴. La idea de que el H₂O₂ se transporta a través de la membrana celular por las acuaporinas también está respaldada por simulaciones computacionales, utilizando AQP1 bovina y PIP2; 1 de *Spinacia oleracia* como modelos⁶¹.

También se llevaron a cabo estudios en líneas celulares de mamíferos que mostraron evidencia adicional que confirmó el papel de hAQP8 en el transporte de H₂O₂. La acuaporina 3 humana también se propuso como un transportador con la característica de que puede sufrir cambios en sus niveles de expresión para modular la acumulación de H₂O₂ y así regular las cascadas de señalización celular⁶⁵⁻⁶⁷. Por otro lado, los estudios llevados a cabo en *S. cerevisiae* y eritrocitos sugieren que la acuaporina 1 humana es incapaz de transportar H₂O₂^{50, 62}. En estos experimentos se demuestra que la permeabilidad de las células al H₂O₂ no cambia en ausencia o presencia de compuestos mercuriales, que son inhibidores de acuaporina 1 bien conocidos. Esta selectividad potencial para diferentes acuaporinas sugiere que los perfiles de expresión de las acuaporinas podrían dictar la susceptibilidad de una célula o tejido en particular a la señalización externa de H₂O₂⁶⁵.

Recientemente se ha descrito una disminución de la capacidad de los glóbulos rojos para metabolizar el H₂O₂ añadido de forma exógena durante el almacenamiento para transfusión, que es independiente de la pérdida de tioles antioxidantes⁶⁸. Se propuso que la disminución del metabolismo del H₂O₂ está relacionada con cambios en la permeabilidad de la membrana al H₂O₂. Esa observación llevó al trabajo de posgrado de la Lic. Orrico, donde determinó el coeficiente de permeabilidad de la membrana de glóbulos rojos al H₂O₂, que será comparado más adelante.

En este trabajo nos propusimos estudiar el transporte del peróxido de hidrogeno a través de la porción lipídicas de las membranas. Comenzamos estudiando la solubilidad del H₂O₂ en solventes orgánicos como modelo simplificado de membrana, evaluando la barrera termodinámica que ofrecería la membrana al pasaje de H₂O₂. Muy pocos valores experimentales han sido reportados en este sentido, y ninguno de los que nos interesaban, octanol, aceite de oliva y hexadecano. Luego optimizamos la generación de liposomas con catalasa encapsulada para la determinación de los coeficientes de permeabilidad. Se estudiaron membranas de diferente composición, con cadenas hidrocarbonadas saturadas e insaturadas, con distinto contenido de colesterol a distintas temperaturas. Utilizamos lauridan para estudiar la fluidez de estas membranas, e intentar buscar una correlación entre el P_m y el estado de las membranas. Por último, determinamos el coeficiente de permeabilidad para liposomas compuestos por lípidos obtenidos de membranas de glóbulos rojos humanos, que fueron comparados con valores de permeabilidad en glóbulos rojos humanos intactos.

OBJETIVOS

Determinar el coeficiente de permeabilidad al peróxido de hidrógeno de membranas lipídicas e indagar en el mecanismo de permeación.

Objetivos específicos

- Determinar el reparto del peróxido de hidrógeno entre solventes orgánicos y agua, como estimación de la barrera termodinámica.
- Determinar los coeficientes de permeabilidad de membranas de diferente composición al peróxido de hidrógeno, utilizando liposomas conteniendo catalasa encapsulada.

MATERIALES y MÉTODOS

Equipamiento y reactivos

Todos los reactivos químicos utilizados fueron adquiridos en Sigma, Applichem y GE Healthcare, salvo los fosfolípidos que fueron adquiridos en Avanti Polar Lipids. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Uv-Vis Varian Cary 50 (Agilent, Estados Unidos).

Determinación del coeficiente de reparto de H₂O₂ entre agua y solventes orgánicos

El coeficiente de reparto (K_D°) se calculó como el cociente entre la concentración de H₂O₂ en el solvente orgánico y la concentración de H₂O₂ en agua, cuando las dos concentraciones están en equilibrio. Se partió de soluciones de agua pre equilibradas con solvente orgánico (w) y de solvente orgánico pre equilibradas con agua (os) durante 24 h para evitar artefactos a la hora de medir el reparto del H₂O₂⁶⁹. Se mezclaron soluciones pre equilibradas de agua con distintas concentraciones de H₂O₂, cuantificado a temperatura ambiente por absorbancia a 240 nm, $\epsilon = 39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ⁷⁰, con soluciones pre equilibradas de solvente orgánico, y se dejó equilibrar bajo agitación a 37 °C y a temperatura ambiente.

La solubilidad del H₂O₂ en solventes orgánicos es muy baja porque el H₂O₂ es naturalmente hidrofílico. Además, la mayoría de los métodos para la determinación de H₂O₂ se basan en agua. Por lo tanto, ideamos un método de doble reparto (Figura 12), que involucra un primer paso de equilibrio de H₂O₂ entre agua (w_1) y solvente orgánico (os_1), extracción cuidadosa de la fase orgánica para evitar llevar agua, y luego un segundo paso donde esta fase orgánica (os_2) se equilibró con agua nueva (w_2). Cada volumen se determinó con precisión. Tener en cuenta que el V_{os_2} era aproximadamente la mitad que el V_{os_1} para evitar la contaminación con agua w_1 . El equilibrado de una cantidad conocida de H₂O₂ se realizó a temperatura controlada en un baño de agua con mezclado frecuente durante 30 minutos. Luego se separaron las fases por centrifugación a 5000 g durante 5 minutos, se retiró una fracción del solvente orgánico (en la parte superior, os_2), se colocó en un nuevo tubo con agua (w_2), y se repitió el equilibrado. El H₂O₂ se cuantificó tanto en la fase acuosa inicial (w_1) como en la final (w_2). Para cada disolvente se utilizaron diferentes concentraciones iniciales de H₂O₂, determinadas empíricamente, para permitir la cuantificación.

Se utilizó el siguiente razonamiento para calcular el coeficiente de reparto de H₂O₂ entre la fase orgánica y el agua. Primero, el coeficiente de reparto (K_D°) es el mismo en ambos pasos, lo que cambia son las concentraciones en cada fase.

$$K_D^\circ = \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{os}_1}}{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{w}_1}} \quad (8)$$

$$K_D^\circ = \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{os}_2}}{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{w}_2}} \quad (9)$$

Debido a la conservación de la masa, el número total de moles en el segundo equilibrio (n_{T_2}) es:

$$n_{T_2} = [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{w}_2} V_{\text{w}_2} + [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{os}_2} V_{\text{os}_2} \quad (10)$$

que puede expresarse como:

$$n_{T_2} = [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{w}_2} (V_{\text{w}_2} + K_D^\circ V_{\text{os}_2}) \quad (11)$$

Con esta información podemos calcular la concentración en el solvente orgánico en el primer equilibrio:

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{os}_1} = n_{T_2} / V_{\text{os}_2} \quad (12)$$

De tal manera que podemos reemplazar en la ecuación 8 y reorganizar para obtener:

$$K_D^\circ = \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{w}_2} V_{\text{w}_2}}{([\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{w}_1} - [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{w}_2}) V_{\text{os}_2}} \quad (13)$$

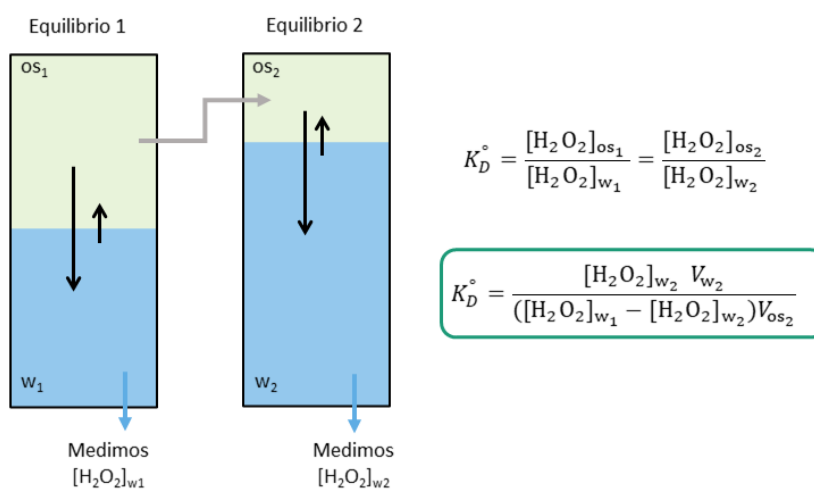


Figura 12. Esquema del sistema de doble reparto utilizado para calcular el coeficiente de reparto en de H_2O_2 entre solventes orgánicos y agua.

En el caso del 1-octanol se mezclaron 0.5 mL de 1-octanol y 0.5 mL de agua con 10 mM H_2O_2 (Figura 13), en el caso del Aceite de oliva se mezclaron 0.5 mL de aceite de oliva y 0.5 mL de agua con 200 mM H_2O_2 y en el caso de Hexadecano se mezclaron 1mL de hexadecano y 0.5 mL de agua con 2 M H_2O_2 . Estas concentraciones se determinaron empíricamente, para permitir medir H_2O_2 en w_2 .

Para cuantificar el H_2O_2 se tomaron alícuotas de las fases w_1 y w_2 , se las llevó a la dilución adecuada y se las incubó por un minuto en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 5, con 0.1 mM de ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico] (ABTS), en presencia de 0.05 U de enzima de peroxidasa de rábano (HRP)⁷¹. El radical catión $ABTS^{\bullet+}$ generado en la reacción se cuantificó midiendo absorbancia a 734 nm e interpolando con una curva de calibración hecha en paralelo para concentraciones conocidas de H_2O_2 . Las soluciones de H_2O_2 y ABTS se prepararon en el momento y cada experimento se realizó por triplicado. Para determinar la dependencia del reparto con la temperatura todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente y a 37 °C.

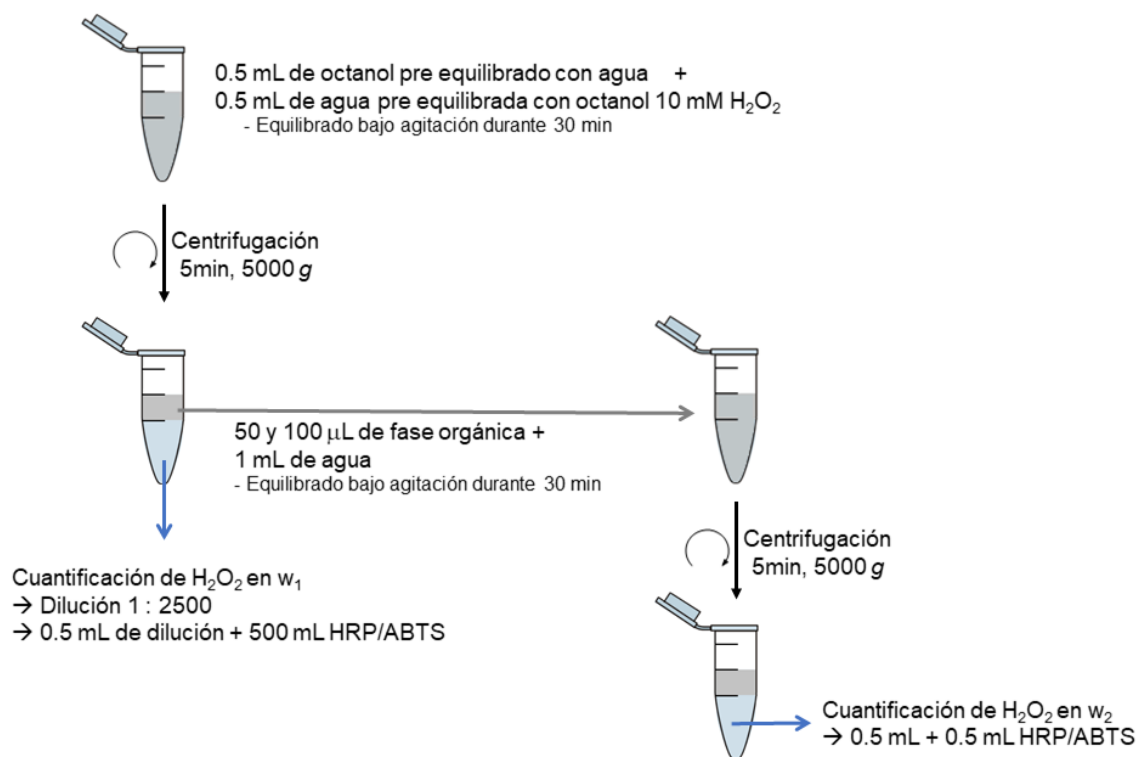


Figura 13. Esquema de experimento de determinación de reparto de H_2O_2 entre agua y 1-octanol.

Preparación y purificación de liposomas

El primer paso para la obtención de liposomas fue el secado de lípidos, para esto en un tubo de ensayo se colocaron mezclas de 1 a 10 mg de lípidos en cloroformo en la relación molar deseada, se evaporó el cloroformo gaseando con Ar o N₂, y girando el tubo de forma que se forme una película de lípidos en el fondo y las paredes del mismo. Una vez que estuvieron visiblemente secos se dejaron los tubos conectados a un sistema de vacío por 2 horas para eliminar trazas de solvente orgánico.

Tabla 3. Lípidos utilizados para la síntesis de liposomas.

	Abreviación	Masa molecular (g mol⁻¹)	T_m (°C)
Dimiristoilfosfatidilcolina	DMPC	677.95	24
Dioleoilfosfatidilcolina	DOPC	786.113	-17
Dipalmitoilfosfatidilglicerol	DPPG	744.952	41
Palmitoiloleoilfosfatidilglicerol	POPG	770.989	-2
Colesterol	Chol	386.65	

Las temperaturas de transición fueron obtenidas de ⁷².

En segundo lugar, se obtuvieron vesículas multilamelares (MLV) mediante rehidratación de los lípidos, agregando 1 mL de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7, o de catalasa de hígado bovino (Sigma) ~2 mg/mL en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7 previamente filtrada con filtro 0.22 μm y se dejó mezclando bajo agitación o vortexeando cada 10 minutos, por 30 minutos, a una temperatura de por lo menos 10 °C por encima de la temperatura de transición (T_m).

Para la obtención de liposomas unilamelares de diámetro uniforme se pre filtró esta suspensión de MLV con filtro de 0.22 μm de poro y se realizaron 19 pasajes por un mini-extrusor de alta presión (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) utilizando membranas de policarbonato de 200 nm de poro (Nucleopore track-etch, Whatman, USA) a una temperatura 10 °C por encima de la T_m .

Para la obtención de vesículas uniformes de 1 μm de diámetro la suspensión de MLV paso 19 veces por el mini-extrusor utilizando membranas de policarbonato de 1 μm de poro a una temperatura 10 °C por encima de la T_m .

Se probaron varias estrategias de encapsulación y separación de liposomas con catalasa que no funcionaron, incluyendo intentos de separar los liposomas con catalasa de la catalasa libre con intercambio iónico, que no se detallarán, pero que llevaron tiempo.

Finalmente, la mejor estrategia para separar los liposomas con catalasa de la catalasa libre fue la cromatografía de exclusión molecular. Para ello se utilizó una columna Superdex 200 (GE Healthcare) conectada a un HPLC Agilent Infinity 1260 cuaternario con detector de absorbancia de arreglo de diodos (1260 DAD VL) y fluorescencia (1260 FDL), con inyección manual. Se registró absorbancia a 210 nm donde además de absorber los enlaces peptídicos y enlaces de las cadenas laterales de algunos aminoácidos se da la mayor dispersión de luz por los liposomas, a 280 nm donde absorben los residuos aromáticos de las proteínas, y a 400 nm donde absorbe la banda de Soret de la catalasa y emisión de fluorescencia a 350 nm excitando la muestra a 280 nm. Además, se registraron espectros de absorbancia 200 a 700 nm. Se utilizó fosfato de sodio 50 mM pH 7 como fase móvil, a un flujo de 0.45 mL/min. De esta manera se obtuvieron liposomas con catalasa encapsulada, sin catalasa libre.

Determinación del radio hidrodinámico

Las medidas de radio hidrodinámico, fueron realizadas empleando un equipo de dispersión de luz dinámica de ángulo fijo (DLS, Brookhaven, USA), que funciona con una fuente de luz láser a 659 nm de longitud de onda, con un ángulo fijo de medida a 90°. Se utilizaron diluciones adecuadas de liposomas purificados en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7 previamente filtrado. Por cada muestra se realizaron 6 medidas de 5 minutos cada una, a 25 °C, y la función de correlación se analizó con un algoritmo de distribución de tamaño de tipo continuo.

Determinación del coeficiente de permeabilidad

El cálculo del coeficiente de permeabilidad se basa en el principio de latencia enzimática ^{46, 47}, que establece que si una enzima está encapsulada por una membrana y la membrana no es completamente permeable, entonces se formará un gradiente de concentraciones a través de la membrana y se observará una diferencia en la velocidad de descomposición del H₂O₂.

El coeficiente de permeabilidad (P_m) de las membranas de los liposomas se determinó mediante el método de retardo enzimático a partir de ⁴⁷,

$$P_m = \frac{k_3 R}{\frac{\bar{A}}{\bar{V}}(1 - R)} \quad (14)$$

donde k_3 es la constante de pseudo-primer orden para el consumo de H_2O_2 (10 mM) por la catalasa en el interior del liposoma, obtenida a partir de la velocidad de consumo de H_2O_2 por la catalasa en la solución con la que se prepararon los liposomas y asumiendo que la concentración de catalasa en los liposomas es la misma que la determinada en la solución de hidratación.

R es la relación entre las pendientes resultantes de graficar las velocidades iniciales de consumo de peróxido en función del volumen de liposomas, en preparados de liposomas enteros y lisados. A es el área y V el volumen del liposoma. La derivación de esta ecuación se presenta más adelante junto con los resultados de permeabilidad.

Para el ensayo, los liposomas se lisaron mediante 5 pasajes de una alícuota de los liposomas purificados diluida al décimo por el mini extrusor utilizando una membrana de poro de 30 nm.

Las medidas de consumo de H_2O_2 por la catalasa se llevaron a cabo en espectrofotómetro o utilizando un equipo de flujo detenido SX20 Stopped Flow Spectrometer (Applied Photophysics, Surrey, Reino Unido), donde el consumo de H_2O_2 se siguió por absorbancia a 240 nm.

Se mezclaron distintas concentraciones de liposomas, enteros y lisados con 10 mM de H_2O_2 y se midió por 1 minuto siempre y cuando el consumo no superara el 10 % del H_2O_2 inicial. Las determinaciones se realizaron a 25 y 37 °C por duplicado, triplicado, o mayor número de repeticiones.

Determinación de la energía de activación

La energía de activación del proceso de permeación para membranas compuestas por DMPC:DPPG:Chol (4:1:5) se determinó según la ecuación de Arrhenius,

$$P_m = Ae^{-\frac{Ea}{RT}} \quad (15)$$

donde Ea es la energía de activación, R la constante universal de los gases, T la temperatura absoluta y P_m el coeficiente de permeabilidad determinado como se detalla en el apartado anterior⁷³ para un rango de temperaturas de entre 20 y 42 °C.

Fluidez de la membrana

Se incubaron 1 mL de una dilución 1/10 de liposomas preparados sin catalasa (~1.6 mM) con 1 mL de lauridan 2 μ M durante 1 hora, a 27 °C protegido de la luz. El lauridan se preparó 1 mM en etanol, se alicuotó y almacenó a -20 °C. Al momento de usar se llevó a 2 μ M en buffer, inyectando 10 μ L de la solución inicial

en 5 mL de buffer bajo agitación vigorosa. Todas las soluciones se almacenaron protegidas de la luz. Para la determinación de la polarización generalizada, se registraron espectros de emisión de lauridan entre 400 y 600 nm excitando la muestra a 360 nm en un Fluorómetro Chronos FD (ISS, USA) con lámpara de Xenón y monocromadores con un ancho de rendija de 4 nm. La temperatura se controló mediante portacubetas equipado con Peltier. El procesamiento matemático de los resultados se detalla en Resultados.

Extracción de lípidos de glóbulos rojos

La sangre se obtuvo de donantes sanos de sexo masculino menores de 45 años que asistieron a la Cátedra y Departamento de Hemoterapia y Medicina Transfusional del Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina. Los concentrados de glóbulos rojos se obtuvieron mediante centrifugación de las bolsas usando una centrífuga Roto Silenta 63RS (Hettich, Alemania) a 2.200 rpm a 20° C para eliminar el plasma y las plaquetas, conservándose el preparado a 4° C en bolsas de transfusión conteniendo solución salina-adenina-glucosa (SAGM). El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital y a los donantes se les solicitó la firma de un consentimiento informado. Antes de proceder a remover las muestras de la bolsa el contenido se homogenizó con movimientos suaves, y se repartieron ~240 mL de sangre a 16 tubos falcons de 50 mL.

Lavado de GR. Se centrifugó a 800 g x 4 minutos en centrífuga sigma 2-16KL (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Alemania), se descartó el sobrenadante, se agregaron varios volúmenes de PBS isotónico (315 mOsm) se homogenizó con movimientos suaves y se volvió a centrifugar a 800 g por 4 minutos descartando el sobrenadante.

Lisado de GR y purificación de fantasmas. A estos pellets se les agregó ~5 volúmenes de PBS hipotónico (20 mOsm), se pasó el contenido de los 16 tubos a 3 tubos de centrífuga de 500 mL aproximadamente y se los centrifugó a 14000 g, a 4 °C, por 25 minutos en centrífuga Beckman J2-21 (Beckman, USA), se descartó el sobrenadante y se repitió tres veces este proceso, dos veces resuspendiendo los pellets con agua ultrafiltrada milli Q (Millipore) y por último resuspendiendo los pellets en PBS 20 mOsm. Finalmente, se descartó el sobrenadante, y se alicuotaron los pellets en 2 tubos de 50 mL que se almacenaron a -80 °C.

Extracción de lípidos. Se descongeló uno de los tubos de fantasmas, se resuspendió en PBS y se centrifugó a 12000 g, a 4 °C por 20 minutos. Se colocaron 3.2 gramos de pellet en un Erlenmeyer, se le agregaron 30 mL de metanol y se agitó por 30 s, a esa mezcla se le agregó 60 mL de cloroformo y se agitó por 1 minuto,

con ayuda de un embudo se pasó la mezcla por papel de filtro. A la solución filtrada se le agregó 23.3 mL de solución de KCl 0.88 % fría, se agitó bien y se repartió el contenido en 3 tubos de 50 mL para centrifuga, se centrifugó a 1000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Se descartó la fase acuosa de los 3 tubos, y con pipeta de vidrio teniendo cuidado de no arrastrar fase acuosa se pasó la fase orgánica a un balón de vidrio previamente pesado. El balón se rotavaporó en condiciones suaves a 37 °C y una vez evaporado todo el contenido líquido se volvió a pesar el balón para determinar la masa de lípidos. Finalmente, se le agregó 1 mL de cloroformo y se tapó con doble parafilm, a continuación, se hizo girar el balón para disolver los lípidos depositados en las paredes, finalmente se almacenó la solución a -20 °C en un vial de vidrio.

Re purificación de fantasmas. Se descongeló 1 tubo de fantasmas y se lo mantuvo en frío, se homogenizó y se repartió el contenido en 6 tubos de 50 mL, se le agregó PBS isoosmótico con 0.5 mM DTPA, se homogenizó y centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se agregó PBS 20 m Osm 0.5 mM DTPA, se volvió a homogeneizar y centrifugar a 12000 g por 25 minutos a 4 °C. Se volvió a lavar con PBS varias veces hasta que el sobrenadante se vio limpio y el pellet blanquecino.



Figura 14. Purificación de fantasmas de GR y extracción de lípidos. Se muestran dos purificaciones de lípidos. En la primera (arriba) no se pudo eliminar completamente la hemoglobina, que se evidencia en el papel de filtro. Esos lípidos se descartaron. En la segunda purificación se invirtió más tiempo en eliminar la hemoglobina de los fantasmas de eritrocitos (panel inferior izquierdo), lo que resultó en una purificación exitosa de los lípidos de GR.

RESULTADOS

Coeficiente de reparto del H₂O₂ entre agua y solventes orgánicos

Como ya vimos en la introducción las membranas lipídicas no se comportan como un bloque homogéneo. Debido a la estructura ordenada que adoptan los fosfolípidos que forman parte de la bicapa, a medida que un soluto que atraviesa la membrana avanza en sentido del eje transversal, se va a encontrar con distintos entornos. Esto implica que, tanto la difusión como la solubilidad van a variar de un punto a otro de la membrana ²⁷.

En este trabajo como primera aproximación a la solubilidad del H₂O₂ en la membrana lipídica, usamos solventes orgánicos que se han usado muchas veces antes para representar la membrana, a saber, 1-octanol, aceite de oliva y hexadecano^{25, 28}. Estos disolventes difieren en polaridad como lo demuestran las diferentes constantes dieléctricas (Tabla 4), y se puede considerar que representan diferentes regiones de la membrana. Usando lípidos etiquetados con sondas de spin, Marsh calculó que la constante dieléctrica en el centro de la bicapa es cercana a 2, y esta región se extiende hasta la mitad de la región hidrocarbonada, para luego aumentar hasta 4 ⁷⁴. Simulaciones de dinámica molecular indican que la constante dieléctrica en el centro de la bicapa sería 1, incrementando hasta 4 al acercarse a la zona adyacente a los grupos carbonilo, e incrementándose a valores mayores que el agua en la región polar de la interfase dominada por los grupos fosfato y colina ^{75, 76}. Por lo tanto, el hexadecano representaría la región del medio de la bicapa, el 1-octanol la más cercana a los grupos carbonilo, y el aceite de oliva la región intermedia.

Para determinar la solubilidad del H₂O₂ en los distintos solventes orgánicos utilizamos un método de doble reparto esquematizado en la Figura 12 de materiales y métodos. El cambio de energía libre de transferencia del H₂O₂ desde la fase acuosa a la orgánica para los tres solventes se calculó a partir de:

$$\Delta G_{w \rightarrow os}^{\circ} = -R T \ln(K_D^{\circ}) \quad (16)$$

donde R es la constante universal de los gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) y T es la temperatura absoluta en K. El valor de $\Delta G_{w \rightarrow os}^{\circ}$ es un indicativo de la espontaneidad del proceso de transferencia del soluto desde el agua hasta el medio orgánico.

Tabla 4. Constante dieléctrica (ϵ) de distintos disolventes, coeficientes de reparto (K_D°) de H_2O_2 entre agua y disolvente orgánico y energía de Gibbs de transferencia ($\Delta G_{w \rightarrow os}^\circ$) a 25 °C.

	ϵ	K_D°	$1 / K_D^\circ$	$\Delta G_{w \rightarrow os}^\circ$ (kJ/mol)
Hexadecano	2.05	$(8.2 \pm 0.6) \times 10^{-6}$	$(122 \pm 8) \times 10^3$	29.0 ± 0.1
Aceite de oliva	3.07	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^3$	16.8 ± 0.2
1-Octanol	10.3	$(6.6 \pm 0.4) \times 10^{-2}$	15 ± 1	6.7 ± 0.1
H ₂ O	78.4			

Las constantes dieléctricas a 20 °C fueron obtenidas de ^{77,78}.

Como era de esperar, la solubilidad en disolventes orgánicos fue significativamente menor que en agua. La solubilidad en 1-octanol, un solvente utilizado a menudo como representativo de las membranas lipídicas, fue 15 veces menor que en agua, en aceite de oliva fue 1000 veces menor que en agua, mientras que en hexadecano fue 122000 veces menor que en agua (Tabla 4). En todos los casos la energía de Gibbs es positiva, indicando que la transferencia desde el agua al solvente orgánico es termodinámicamente desfavorable.

Mediante el grafico de van't Hoff (ecuación 17) construido a partir de los datos de K_D° a distintas temperaturas ($\ln(K_D^\circ)$ vs. $1/T$) se calculó el cambio entálpico estándar $\Delta H_{w \rightarrow os}^\circ$ y el cambio entrópico estándar de transferencia $\Delta S_{w \rightarrow os}^\circ$ (Tabla 5) asumiendo que estas propiedades no cambian con la temperatura en el rango estudiado.

$$\ln(K_D^\circ) = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (17)$$

Para identificar el efecto dominante en la transferencia, es decir, cambios de energía o cambios en la organización molecular, se calculó mediante las ecuaciones 18 y 19 ⁷⁹ la contribución relativa de la entalpía, % ζ_H y entropía, % ζ_{TS} a la energía libre de transferencia.

$$\% \zeta_H = 100 \frac{|\Delta H_{w \rightarrow os}^\circ|}{|\Delta H_{w \rightarrow os}^\circ| + |T \Delta S_{w \rightarrow os}^\circ|} \quad (18)$$

$$\% \zeta_{TS} = 100 \frac{|T\Delta S_{w \rightarrow os}^{\circ}|}{|\Delta H_{w \rightarrow os}^{\circ}| + |T\Delta S_{w \rightarrow os}^{\circ}|} \quad (19)$$

Tabla 5. Energía de Gibbs, entalpía y entropía para la transferencia de H₂O₂ desde el agua a los distintos solventes orgánicos. Contribución relativa de la entalpía y a entropía.

	$\Delta G_{w \rightarrow os}^{\circ}$ (kJ/mol)	$\Delta H_{w \rightarrow os}^{\circ}$ (kJ/mol)	$\Delta S_{w \rightarrow os}^{\circ}$ (J/mol K)	% ζ_H	% ζ_{TS}
Hexadecano/H ₂ O	29.0	26.4	-8.7	91.1	8.9
Aceite de oliva/H ₂ O	16.8	80.7	216.4	55.6	44.4
1-Octanol/H ₂ O	6.7	5.9	-2.6	88.3	11.7

El término entálpico domina sobre el entrópico, y esto probablemente se deba a que los enlaces de hidrógeno que forma el H₂O₂ con el agua, se pierden al pasar al solvente orgánico.

En el caso del octanol y el hexadecano se observan valores bajos y negativos de entropía, está pérdida de entropía posiblemente se debe a que la transferencia del peróxido desde la fase acuosa a la orgánica le quita libertad a las moléculas de solvente orgánico que rodean a las moléculas de peróxido.

En función de las constantes dieléctricas, podemos proponer que la solubilidad en la región central de la bicapa estaría representada por la solubilidad en hexadecano, y la solubilidad en la región intermedia D por la solubilidad del 1-octanol, y modelar el perfil de solubilidad esperado a través de la membrana, así como la energía libre de solvatación asociada a dicha posición (Figura 15).

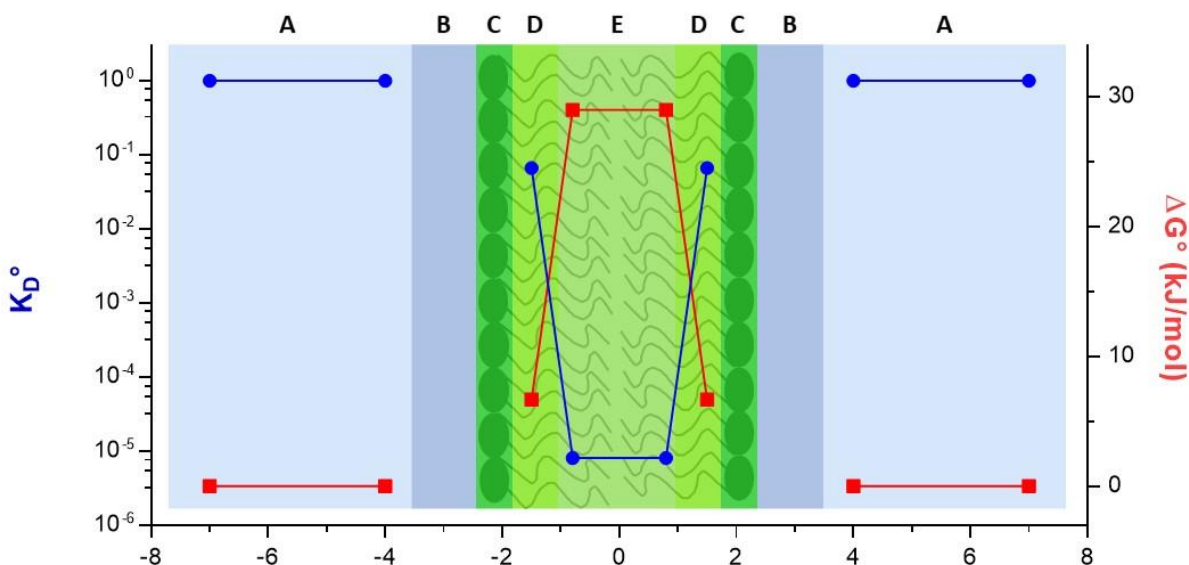


Figura 15. Modelo del perfil de solubilidad y Energía de Gibbs de transferencia del H_2O_2 desde la fase acuosa a 25°C . Se representan diferentes regiones. A: capa de agua libre, B: capa de moléculas de agua que interactúan con la membrana, C: región de las cabezas polares de los fosfolípidos, D: región de los acilos cercanos a los carbonilos y E: región central de la bicapa. K_D en las distintas regiones está representado por el reparto de H_2O_2 entre agua y octanol (D), agua y hexadecano (E) y agua y una fase acuosa hipotética (A).

Se puede apreciar una gran barrera de energía de Gibbs en el centro de la bicapa, sugerida por la baja solubilidad en hexadecano. Este resultado sugiere que la permeabilidad de las bicapas lipídicas al H_2O_2 será baja.

Aunque hay varias simulaciones de dinámica molecular sobre la distribución de energía libre de H_2O_2 a través de la bicapa (Figura 6)³¹, estas no tenían referencia experimental, porque hasta este informe no había valores reportados de solubilidad de H_2O_2 en solventes orgánicos en la literatura.

El valor de ΔG° es comparable con el valor de energía libre de activación para la permeación de H_2O_2 a través de una bicapa de DOPC obtenido mediante simulaciones de dinámica molecular que se estimó en $33 \pm 4 \text{ kJ/mol}$ ³¹. Y por el obtenido experimentalmente en liposomas de PC, 36.8 kJ/mol ⁵⁰.

Permeabilidad

Para estudiar la permeabilidad al H_2O_2 de la porción lipídica de la membrana se recurrió al uso de liposomas, microvesículas esféricas que consisten en una o múltiples bicapas lipídicas que encierran un compartimento acuoso. Fueron descubiertas en los años 60⁸⁰ y desde entonces se han empleado principalmente como modelos para estudiar propiedades de las membranas y como transportadores de drogas⁸¹, ya que se les pueden cargar moléculas hidrofílicas en su interior acuoso o lipofílicas en su membrana.

Se suelen clasificar en función de su tamaño y grado de lamellaridad (Figura 16). Su estabilidad va a depender entre otras cosas de la composición lipídica y el tamaño.

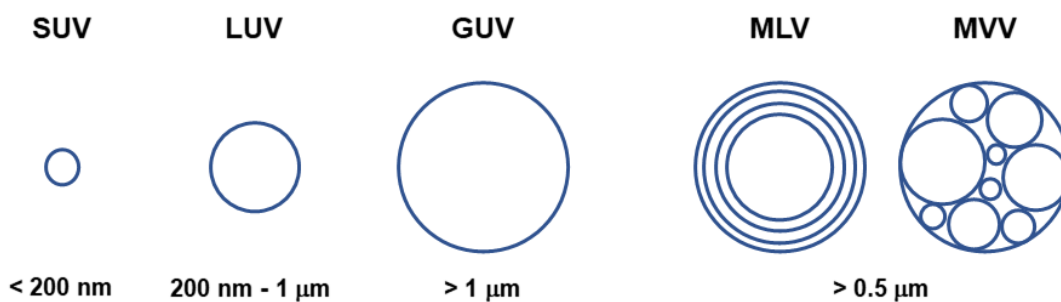


Figura 16. Clasificación de liposomas según tamaño y grado de lamellaridad. Los liposomas unilamelares se clasifican en pequeños, grandes y gigantes, SUV, LUV y GUV respectivamente. Cuando están compuestos por mayor número de bicapas se clasifican en multilamelares (MLV) los que constan de varias capas concéntricas y multivesiculares (MVV) los compuestos por varias vesículas pequeñas atrapadas en otras más grandes. Las siglas provienen de su clasificación en inglés: SUV: small unilamellar vesicle; LUV: large unilamellar vesicle; GUV: giant unilamellar vesicle; MLV: multilamellar vesicle; MVV: multivesicular vesicle. Adaptado de^{82, 83}.

Al igual que las membranas biológicas la fluidez de estas vesículas va a depender de su composición y de la temperatura. En función de la temperatura, los lípidos de membrana pueden encontrarse en dos estados o fases diferentes: fase sólido-ordenada (también llamada fase gel o L_β), donde las cadenas hidrocarbonadas están más rígidas y mejor empaquetadas, o fase líquido-desordenada (también llamada L_α), donde las cadenas hidrocarbonadas presentan mayor movilidad. La temperatura requerida para inducir un cambio en el estado físico de los lípidos desde la fase gel a la fase fluida se denomina temperatura de transición de fase (T_m) (Figura 17). La T_m aumenta con la longitud de la cadena hidrocarbonada, y disminuye con el incremento en el grado de insaturación de las cadenas de los lípidos

⁸⁴. En el caso de bicapas constituidas por un solo tipo de lípidos la T_m está bien definida, en cambio, en el caso de las membranas biológicas o bicapas compuestas por mezclas lipídicas más complejas la transición de un estado a otro se va a producir en un intervalo de temperaturas.

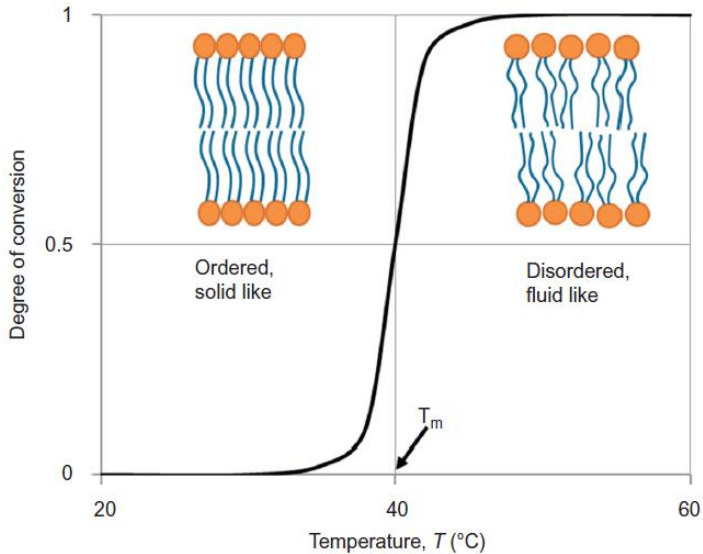


Figura 17. Transición de fase en las bicapas lipídicas. El diagrama representa la transición entre las fases sólido-ordenada (izquierda) y líquido-desordenado (derecha) de una bicapa. Alrededor de la temperatura de transición de fase, T_m , ambas fases coexisten. Tomado de ⁸⁵.

Preparación y caracterización de liposomas

Para poder determinar la permeabilidad al H_2O_2 en liposomas fue necesario poner a punto un método de preparación y purificación de liposomas adecuado. Luego de varios ensayos donde se varió la composición lipídica, el diámetro de los liposomas, la solución de hidratación y el método de purificación; se logró sintetizar mediante extrusión liposomas unilamelares de 0.2 μm de diámetro con catalasa encapsulada.

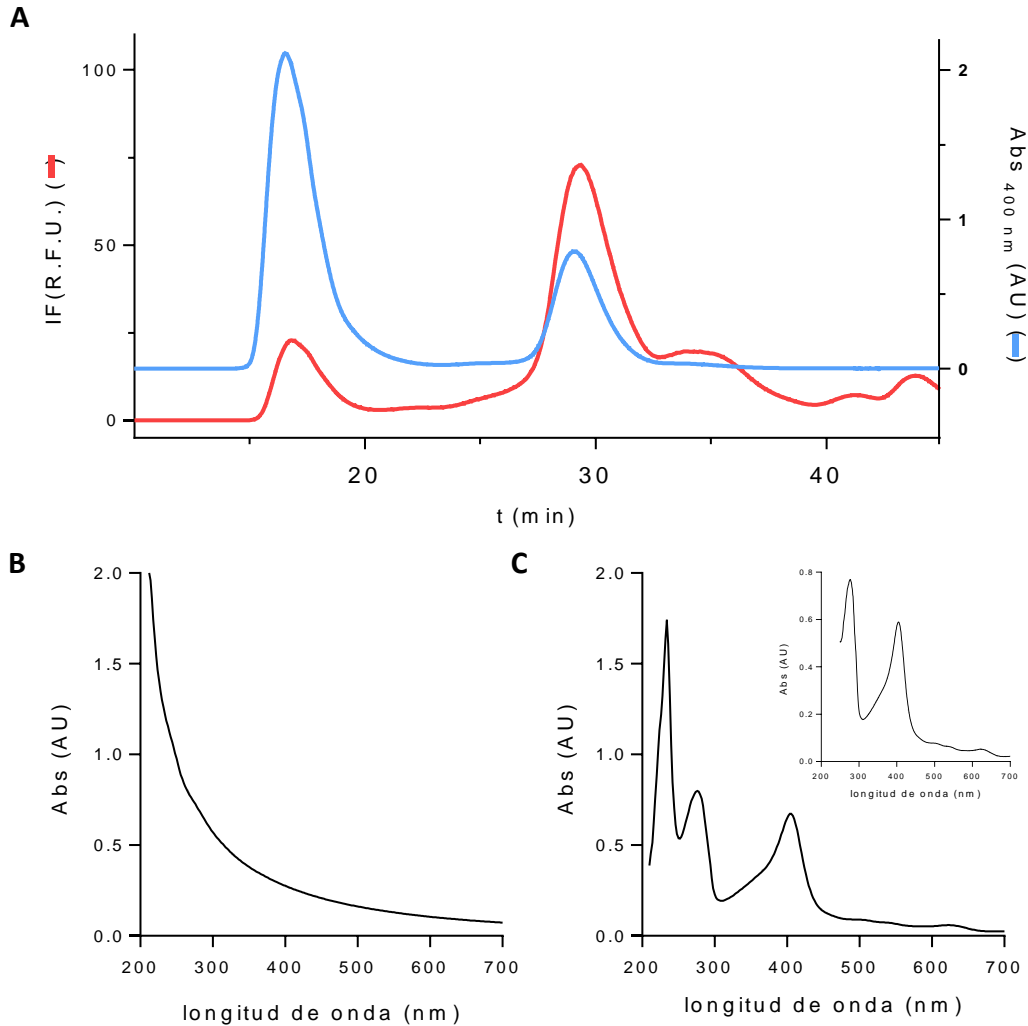


Figura 18. Cromatograma de purificación de liposomas DMPC:DPPG:Chol (4:1:5) mediante cromatografía de exclusión molecular **(A)** espectros de absorción de los principales picos a $t = 17$ min **(B)** y $t = 29$ min, con espectro de catalasa inserto **(C)**.

En el cromatograma de la purificación (Figura 18) se puede ver que utilizando la columna de exclusión molecular Superdex 200 30/10 GL los liposomas salen en el frente, alrededor de los 17 minutos, mientras que la catalasa libre en solución queda retenida por la columna, eluyendo alrededor de los 29 minutos. Los liposomas se colectaron para su posterior caracterización y uso en la determinación de la permeabilidad. La presencia de catalasa en los liposomas no se evidencia directamente por la absorbancia, pero sí por la fluorescencia de la proteína (Figura 18). Más adelante también se hará evidente su presencia por la actividad enzimática con el H_2O_2 .

Como parte de la caracterización de los liposomas se les determinó el radio hidrodinámico mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). Esta técnica consiste en iluminar una muestra con haz de luz, el

movimiento de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz se disperse con diferentes intensidades. Del análisis de estas fluctuaciones de intensidad con el tiempo se obtiene la velocidad del movimiento browniano que va a estar dada por el coeficiente de difusión traslacional.

Si en una solución partículas esféricas se mueven de forma aleatoria, se aplica la ecuación de Stokes-Einstein

$$D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta R_H} \quad (20)$$

donde D es el coeficiente de difusión traslacional, k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, η la viscosidad y R_H el radio hidrodinámico.

De esta forma a partir de determinar la velocidad de difusión de las partículas en una muestra y conociendo la temperatura y la viscosidad de la misma se puede calcular el tamaño. El diámetro hidrodinámico efectivo promedio para liposomas de DMPC:DPPG (9:1) fue de 191 ± 27 nm y para liposomas de DOPC:POPG:Chol (6.5:1:2.5) fue de 207 ± 41 nm con un índice de polidispersión medio de 0.09 ± 0.01 y de 0.06 ± 0.01 respectivamente. Los valores de polidispersión obtenidos, por debajo de 0.1 indican una distribución de tamaños homogénea de las partículas en las muestras, consistente con lo esperado al preparar los liposomas por extrusión ⁸⁶.

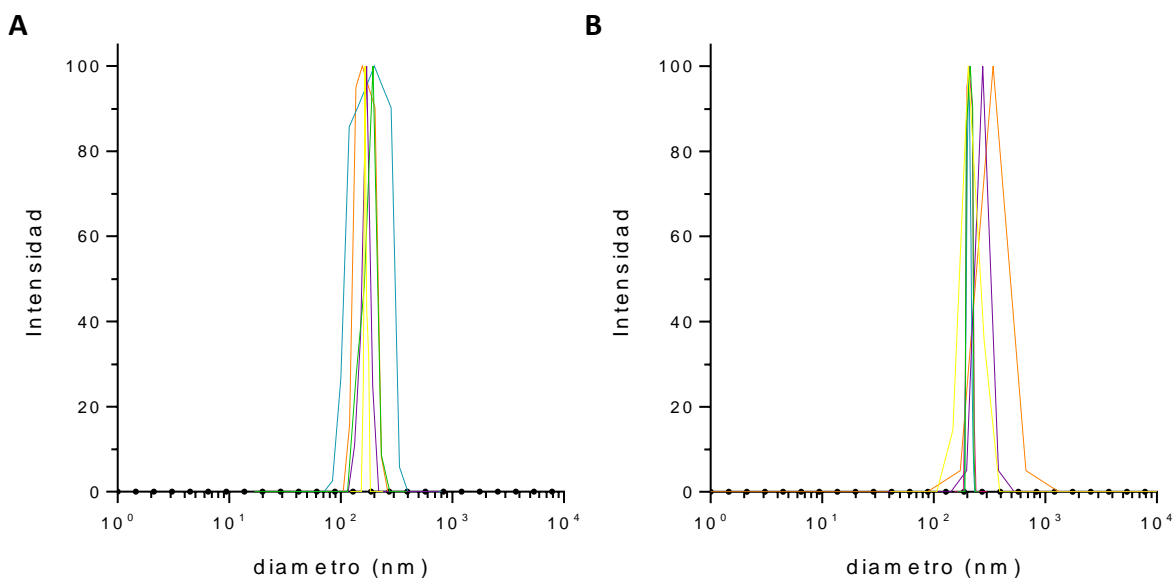
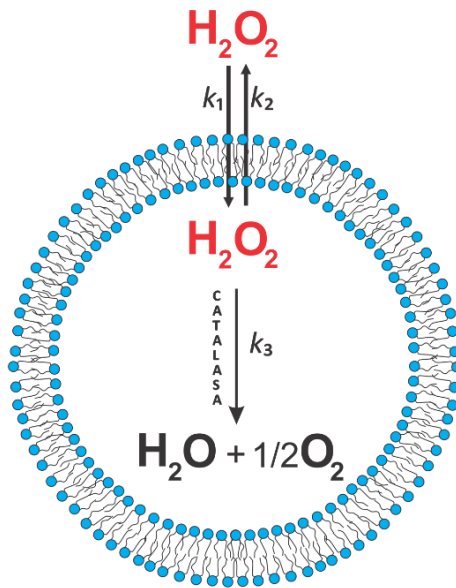


Figura 19. Análisis multimodal de distribución de tamaños de liposomas por DLS. El radio hidrodinámico se determinó mediante dispersión de luz para: **A.** Liposomas compuestos por DMPC:DPPG (9:1). **B.** Liposomas compuestos por DOPC:POPG:Chol (6.5:1:2.5)

Determinación de la permeabilidad al H₂O₂

Para la determinación del coeficiente de permeabilidad se utilizó el método de latencia enzimática⁴⁷. Este método se basa en que si la membrana constituye una barrera de permeabilidad que limita la difusión del substrato hacia la enzima, entonces la velocidad de consumo de H₂O₂ por la catalasa contenida en los liposomas tiene que ser menor que la de la catalasa libre en solución. Si no hay otro factor que limite la velocidad, la permeabilidad se puede calcular conociendo la relación entre ambas velocidades (Figura 20). Este método tiene la ventaja que no asume que la velocidad de permeación del H₂O₂ a través de la membrana es mucho menor que la velocidad de consumo por la catalasa, sino que asume que son del mismo orden y se toma en cuenta.



$$v_1 = k_1[H_2O_2]_{out}$$

$$v_2 = k_2[H_2O_2]_{in}$$

$$v_3 = k_3[H_2O_2]_{in}$$

$$k_1 = k_2 = k_{perm} = P_m \frac{A}{V}$$

En condiciones de estado estacionario:

$$v_1 = v_2 + v_3$$

$$k_{perm}[H_2O_2]_{out} = k_{perm}[H_2O_2]_{in} + k_3[H_2O_2]_{in}$$

$$[H_2O_2]_{out} = \frac{(k_{perm} + k_3)}{k_{perm}} [H_2O_2]_{in}$$

$$R = \frac{k_{perm}}{(k_{perm} + k_3)} = \frac{[H_2O_2]_{in}}{[H_2O_2]_{out}}$$

$$k_{perm} = \frac{k_3 R}{(1 - R)}$$

$$P_m = \frac{k_3 R}{\frac{A}{V}(1 - R)}$$

Figura 20. Determinación del coeficiente de permeabilidad, P_m para el H₂O₂. En condiciones de estado estacionario, si el consumo de H₂O₂ dentro del liposoma (k_3) no es despreciable, la concentración de H₂O₂ dentro del liposoma ($[H_2O_2]_{in}$) será inferior a la concentración fuera ($[H_2O_2]_{out}$). La magnitud del gradiente (R) depende del valor relativo de la velocidad de consumo intracelular (k_3) comparado con la velocidad de difusión a través de la membrana (k_{perm}), y viene dada por $k_{perm}/(k_{perm} + k_3)$. P_m , coeficiente de permeabilidad para H₂O₂; A/V , relación entre el área y el volumen del liposoma. Adaptada de ⁴⁷.

El gradiente entre la concentración de H_2O_2 dentro ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{in}}$) y fuera ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{out}}$) del liposoma, R , es independiente de la concentración de H_2O_2 y se puede obtener de la relación de la velocidad de consumo de H_2O_2 entre liposomas intactos y lisados ⁴⁶. Para obtener R , se midió la velocidad de consumo de H_2O_2 por catalasa en liposomas intactos y en liposomas lisados y se calcula la razón entre las pendientes del gráfico de velocidades iniciales en función del volumen de liposomas. De esta manera se controla la linealidad de la respuesta y se disminuye el error en la determinación de R .

Para cada experimento se calculó k_3 determinando la actividad de la catalasa utilizada para la síntesis de los liposomas por absorbancia a 240 nm, y controlando la concentración por absorbancia a 276 nm ($E_{276\text{nm}}^{1\%} = 36.5 \text{ g}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) ⁸⁷. La constante k_3 es la constante de pseudo-primer orden de la catalasa dentro de los liposomas ($k_3 = k[\text{cat}]$). Se asumió que la concentración y actividad de la catalasa dentro de los liposomas no cambió respecto a la que se utilizó para formarlos.

Para el lisado de las vesículas se ensayaron distintas técnicas, choque osmótico con ciclos de congelado/descongelado, utilización de detergentes y pasaje sucesivo por una membrana con poros de 30 nm (Figura 21).

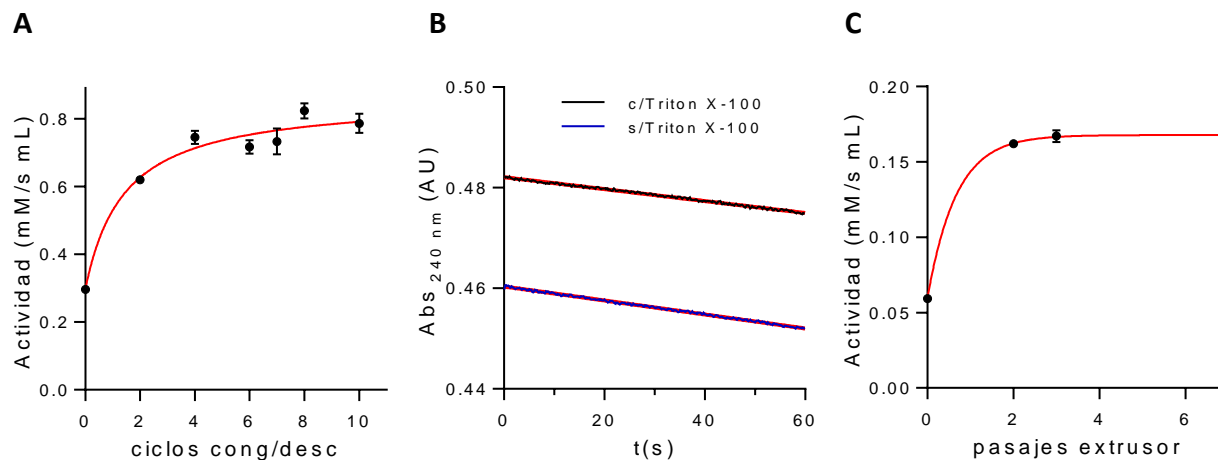


Figura 21. Optimización del lisado de liposomas. A. Lisis por choque osmótico mediante ciclos de congelado a -20 °C / descongelado 35 °C. B. Lisis con detergente Triton X-100 al 5 %. C. Lisis mecánica mediante sucesivos pasajes por membrana con poros de 30 nm.

La lisis osmótica se ensayó diluyendo diez veces los liposomas purificados en agua, seguido de ciclos de 20 minutos de congelando de la muestra a -20 °C en freezer y descongelando en baño de agua a 35 °C. Para evaluar la eficiencia de este método se graficó actividad catalasa en función de los ciclos de congelado/descongelado (Figura 21.A) y se ajustó a una hipérbola según la ecuación:

$$y = \frac{(A_{max} - y_0)x}{k + x} + y_0 \quad (21)$$

A partir de esta ecuación se calcularon los ciclos necesarios para obtener un 95 % de la actividad máxima, el resultado arrojó que se precisan 20 ciclos de congelado/descongelado, lo que en las condiciones experimentales que estábamos usando, nos hubiera llevado más de 6 horas. Por otro lado, con este método se corría el riesgo de ir perdiendo actividad catalasa en cada ciclo. Por estos motivos se decidió ensayar otras formas de lisar los liposomas.

En segundo lugar se probó lisar con tritón X-100 un tensoactivo no iónico al 1 y 5 % (Figura 21.B), método reportado para la lisis celular ⁴⁷, pero no se obtuvieron los resultados esperados. La velocidad de consumo de peróxido por los liposomas no aumentó al tratarlos con tritón X-100.

Por último, se probó lisar los liposomas mecánicamente mediante sucesivos pasajes por el extrusor con una membrana de 30 nm de diámetro (Figura 21.C). Se graficó actividad catalasa en función de los pasajes y se ajustó a una función exponencial. A partir del segundo pasaje tenemos más del 95 % de la actividad máxima y a partir del tercero un 99 % sin aparente pérdida de actividad debida a los sucesivos pasajes, por lo que para estar seguros se usó como método de lisado 5 pasajes sucesivos por el extrusor.

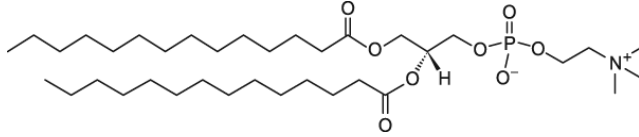
Una vez que el método de síntesis, purificación y lisado de los liposomas estuvo puesto a punto nos dispusimos a determinar los valores de permeabilidad.

Efecto de la temperatura y colesterol en liposomas de DMPC:DPPG

Comenzamos estudiando la permeabilidad en liposomas formados por fosfolípidos de cadenas hidrocarbonadas saturadas que favorecen un empaquetamiento más ordenado de los lípidos en la membrana que los fosfolípidos con cadenas hidrocarbonadas insaturadas, utilizamos DMPC y DPPG (Figura 22) en relación molar 9:1. Los lípidos con carga (PG) se incluyeron porque favorecen la estabilidad de los liposomas, evitando que se fusionen ⁸⁶.

14:0 PC (DMPC)

$T_m: 24\text{ }^\circ\text{C}$



16:0 PG (DPPG)

$T_m: 41\text{ }^\circ\text{C}$

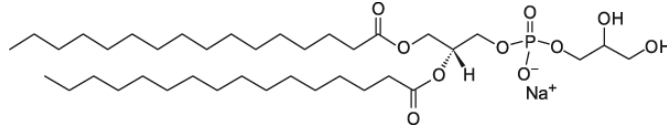


Figura 22. Estructura de los fosfolípidos saturados utilizados para la síntesis de liposomas.

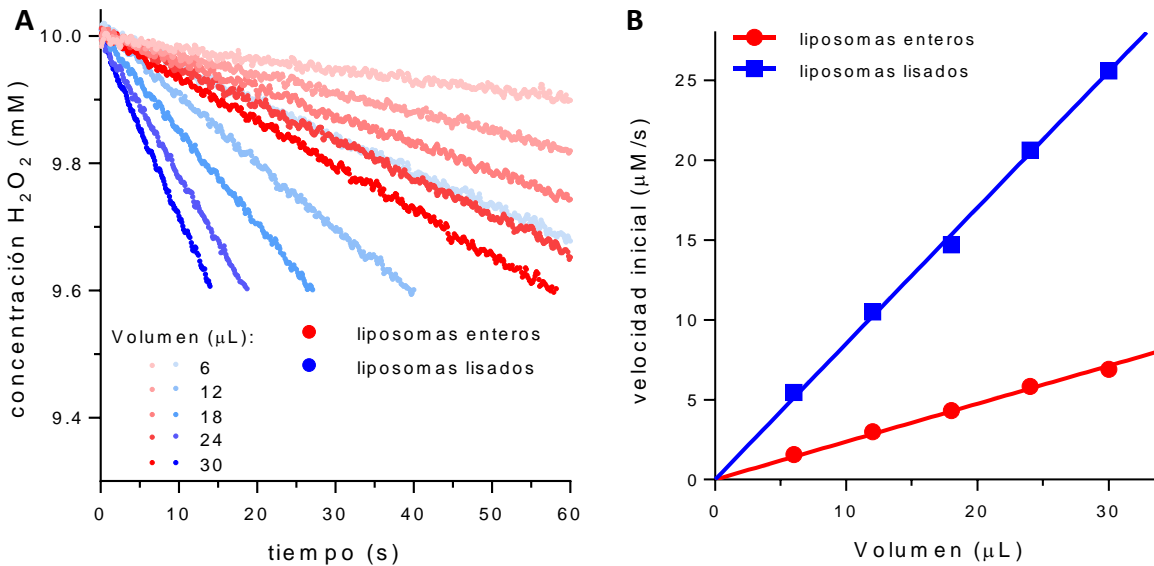


Figura 23. Determinación de P_m en liposomas de DMPC: DPPG: Chol (4: 1: 5). **A.** Velocidad de consumo de H_2O_2 (10 mM) a 25°C en liposomas de enteros (rojo) y lisados (azul) determinados por absorbancia a 240 nm medidos en flujo detenido. **B.** Comparación de la velocidad de consumo de H_2O_2 por liposomas enteros y lisados. Las velocidades iniciales se determinaron cinco veces por cada volumen de liposomas, obteniéndose una dispersión de los datos más pequeña que los puntos del gráfico.

En la Figura 23.A se muestra a modo de ejemplo la determinación de velocidad inicial de consumo de H_2O_2 en liposomas enteros y lisados. Se puede apreciar que la velocidad inicial de consumo de H_2O_2 por la catalasa es mayor cuando ésta se encuentra libre debido a la lisis de los liposomas, evidenciando el papel de la membrana como barrera para el pasaje del H_2O_2 . A partir de estas velocidades iniciales se construye el gráfico secundario en la Figura 23.B, y la relación entre las pendientes es R . Para cada experimento se determina k_3 , mediante la determinación de la actividad de la solución de catalasa empleada. Con esos dos valores, y el diámetro de los liposomas, se calcula el P_m , utilizando la ecuación 14, también mostrada en la Figura 20.

Para evaluar el efecto de la temperatura se repitió el experimento a 37 °C (Figura 24.A). Los resultados mostraron que en los liposomas de DMPC:DPPG (9:1) la permeabilidad pareció disminuir al aumentar la temperatura, a priori esto parece contradictorio, ya que la fluidez de la membrana aumenta con la temperatura y uno esperaría que la permeabilidad aumentara cuando la membrana se encuentra en un estado más fluido. Una posible explicación podría ser que se intentó medir el P_m demasiado cerca de la T_m . Estos liposomas están compuestos en un 90 % por DMPC, cuya temperatura de transición de fase gel a líquido-desordenado es de 24 °C. Existen varios reportes que muestran que el P_m para otros compuestos aumenta a la temperatura de transición, probablemente por la coexistencia de fases en la membrana y mayores defectos de empaquetamiento de los lípidos, que permiten el pasaje de los compuestos ⁸⁸. La gran variación que se obtuvo para los valores experimentales del P_m a 25°C apoya esta hipótesis (Figura 24).

A continuación, se estudió como afecta a la permeabilidad el agregado de colesterol a los liposomas. Se ensayaron liposomas de DMPC con 10% de DPPG y 25 o 50% de colesterol. En ambos casos a 25 °C la permeabilidad aumentó con respecto a los liposomas sin colesterol, la diferencia entre los liposomas con 25 % y 50% colesterol no fueron significativas (Figura 24.B).

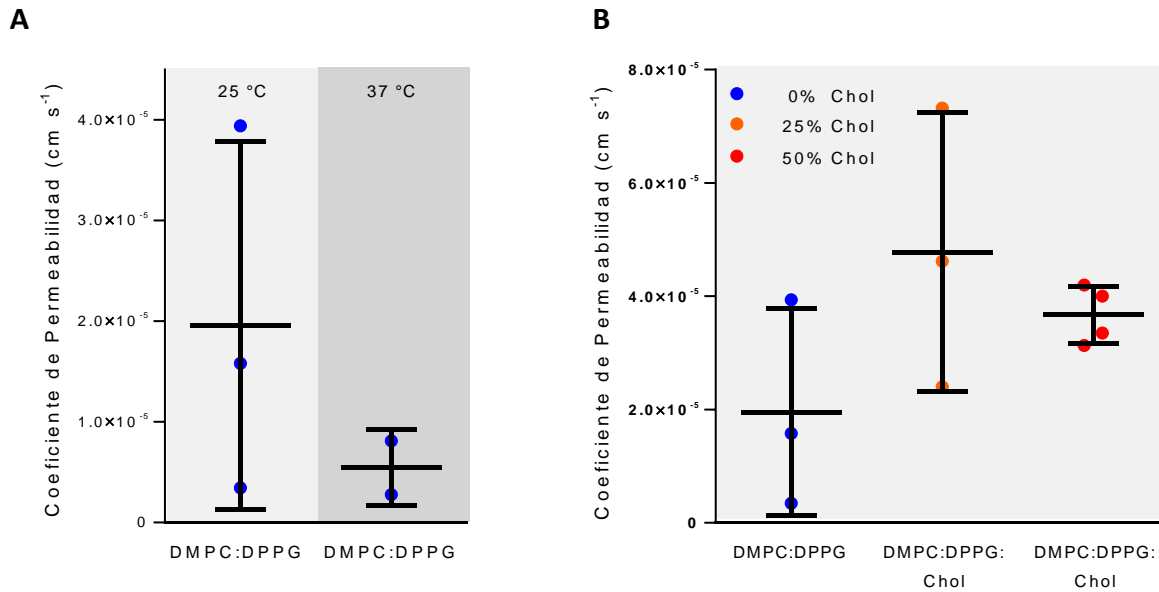


Figura 24. Efecto de la temperatura y colesterol en P_m al H_2O_2 en membranas DMPC:DPPG. **A.** Liposomas compuestos por DMPC:DPPG (9:1) a 25 °C y a 37 °C. **b)** liposomas compuestos por DMPC:DPPG (9:1) (azul), DMPC:DPPG:Chol (6.5:1:2.5) (anaranjado), y DMPC:DPPG:Chol (4:1:5) (rojo) a 25 °C. **B.** Todas las medidas se realizaron en liposomas de 200 nm de diámetro.

Efecto de la temperatura y colesterol en liposomas de DOPC:POPG

A continuación, se estudió la permeabilidad en liposomas de fosfolípidos con insaturaciones en sus cadenas hidrocarbonadas, a priori esperábamos que el empaquetamiento de estas membranas fuera más desordenado, aumentando su fluidez y permeabilidad. Para estos liposomas se utilizó DOPC y POPG (Figura 25) en relación molar 9:1.

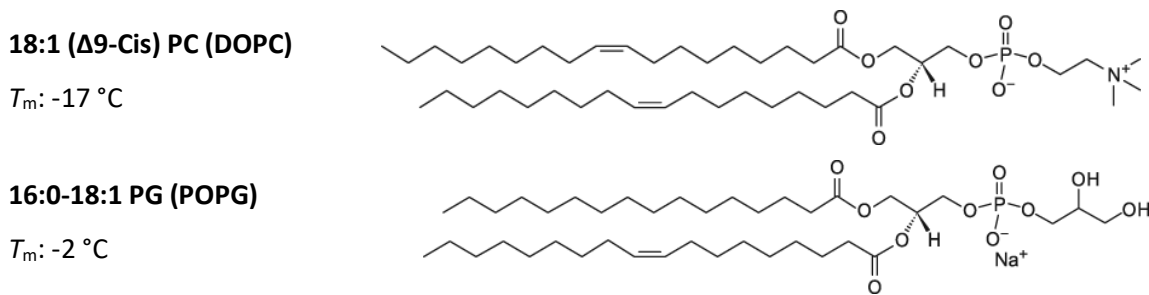


Figura 25. Estructura de los fosfolípidos insaturados utilizados para la síntesis de liposomas.

Observando la gráfica de concentración de H_2O_2 en función del tiempo (Figura 26.A) se observó que las velocidades de consumo de H_2O_2 por la catalasa en liposomas enteros y lisados no se diferencia tanto como en los casos anteriores. Esto se refleja en un aumento del R (valor más cercano a 1) (Figura 26.B), y un aumento en el valor de la permeabilidad calculada para los liposomas de cadenas hidrocarbonadas insaturadas, con respecto a los liposomas del apartado anterior.

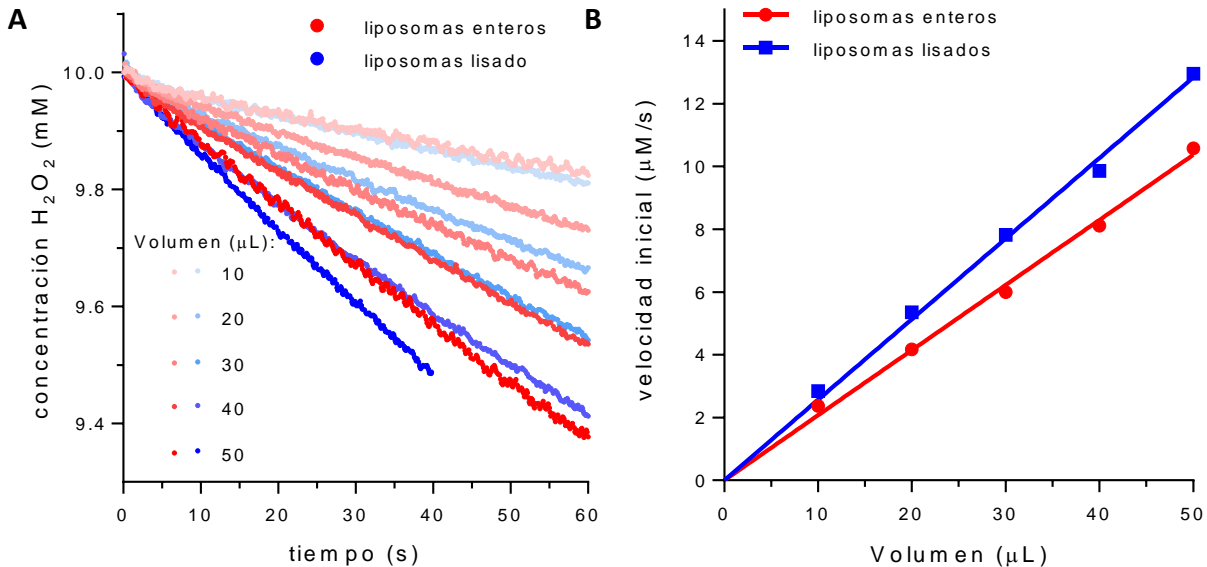


Figura 26. Velocidad de consumo de H_2O_2 (10 mM) a 25°C en liposomas de DOPC: POPG: Chol (4: 1: 5) enteros (rojo) y lisados (azul) determinados por absorbancia a 240 nm medidos en flujo detenido **(A)**. Comparación de la velocidad de consumo de H_2O_2 por liposomas enteros y lisados **(B)**.

El experimento se realizó a 25 y 37 °C y en este caso como era de esperar la permeabilidad aumenta al aumentar la temperatura (Figura 27.A).

También se examinó el efecto del colesterol en estas membranas compuestas por fosfolípidos de cadenas hidrocarbonadas insaturadas. Se vio que al agregar 50 % de colesterol la permeabilidad aumenta alrededor de 10 veces. Debido a este aumento de permeabilidad, el gradiente de H₂O₂ en los liposomas disminuye y las pendientes de la gráfica velocidad inicial en función del tiempo se aproximan impidiendo la determinación de la permeabilidad en estas condiciones. El máximo P_m que se puede determinar con este método es de alrededor de $1.5 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$

Para aumentar el límite superior de permeabilidad posible de determinar se probó con aumentar la concentración de catalasa en los liposomas, de 3.7 μM a 7.4 μM, De esta manera se buscaba aumentar k_3 , y bajar la concentración de H₂O₂ dentro del liposoma, logrando bajar R . Esto funcionó para los liposomas de DOPC:POPG (9:1), pero para los liposomas de DOPC:POPG:Chol (4:1:5) seguía siendo insuficiente.

Para poder determinar la permeabilidad de estos liposomas finalmente se nos ocurrió sintetizar liposomas de 1 μm de diámetro con el doble de catalasa encapsulada, 7.4 μM. Analizando la ecuación de permeabilidad, encontramos que el término “área/volumen” del liposoma, puede ser considerado equivalente a $3/r$, donde r es el radio del liposoma. Sustituyendo en la ecuación 14 se obtiene la relación:

$$R = \frac{3 P_m}{k_3 r + 1} \quad (22)$$

Donde se puede observar que, a igual P_m , si r aumenta, R va a disminuir, lo que nos permite medir mayores valores de P_m . Con estos cambios, el rango de determinación de P_m aumenta hasta $1.4 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$.

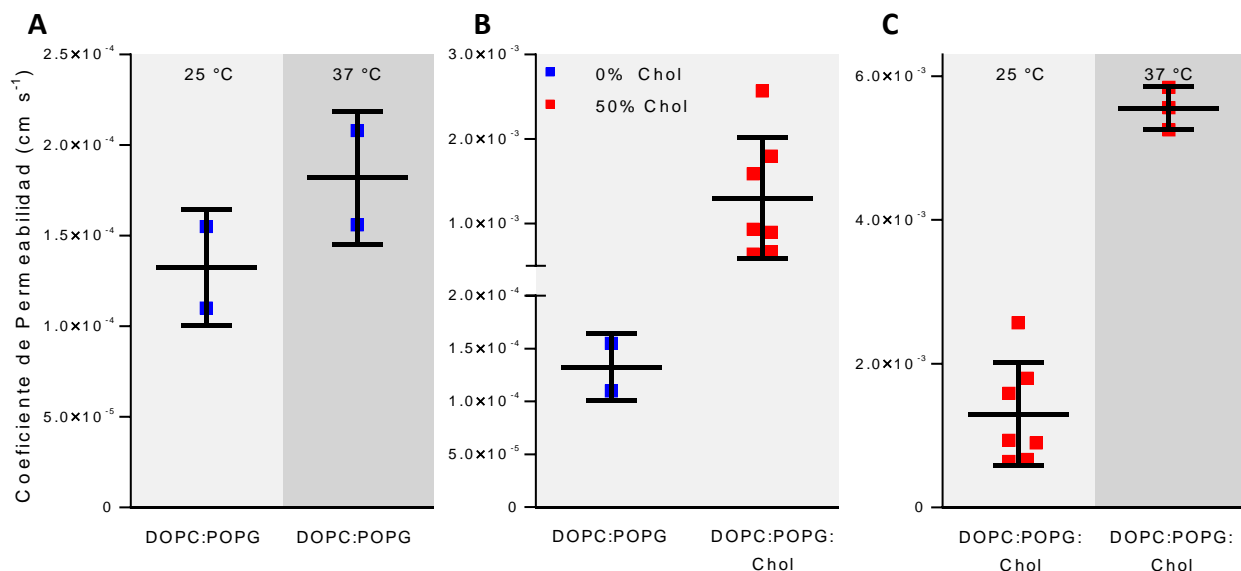


Figura 27. Efecto de la temperatura y colesterol en P_m al H_2O_2 en membranas DOPC:POPG. **A.** Liposomas de 200 nm de diámetro compuestos por DOPC:POPG (9:1) a 25 °C y a 37 °C. **B.** Liposomas compuestos por DOPC:POPG (9:1) (azul), y DOPC:POPG:Chol (4:1:5) (rojo) de 200 nm y 1 μ m de diámetro a 25 °C. **C.** Liposomas compuestos por DOPC:POPG:Chol (4:1:5) de 200 nm y 1 μ m de diámetro a 25 °C y liposomas compuestos por DOPC:POPG:Chol (4:1:5) de 1 μ m de diámetro a 37 °C.

Estos resultados fueron muy interesantes, pero también inesperados. Cuando las membranas se encuentran en una fase fluida, como en los liposomas DOPC:POPG (9:1) el colesterol aumenta la rigidez disminuyendo la fluidez de la membrana, lo que se esperaba que resultara en la disminución de la permeabilidad. Por otro lado, cuando las bicapas se encuentran en un estado más ordenado, como en los liposomas de DMPC:DPPG (9:1), el agregado de una molécula rígida como el colesterol genera desorden en el empaquetamiento de los fosfolípidos haciendo la membrana más fluida, y podría ser más permeable. De acuerdo a lo observado por otros autores sobre el efecto del colesterol en la membrana y la permeabilidad al agua⁸⁹, o incluso la permeabilidad al oxígeno⁹⁰, se esperaba que el agregado de colesterol resultara en una menor permeabilidad. Ante la posibilidad de que la fluidez de las membranas no fuera la esperada, por efectos imprevistos de la composición lipídica, decidimos profundizar en el estudio del estado físico de las membranas.

Energía de activación de la permeabilidad

A partir de los datos de permeabilidad a distintas temperaturas se determinó la energía de activación del proceso de permeación para liposomas de DMPC:DPPG:Chol (4:1:5) debido a que fueron los más reproducibles de los liposomas DMPC, obteniéndose un valor de $(1.3 \pm 0.2) \times 10^2$ kJ/mol. Para las

membranas de DOPC:POPG (9:1) y DOPC:POPG:Chol (4:1:5) que se cuentan con menos valores experimentales y mayor dispersión de datos de E_a los resultados se expresan como media y rango (Figura 28).

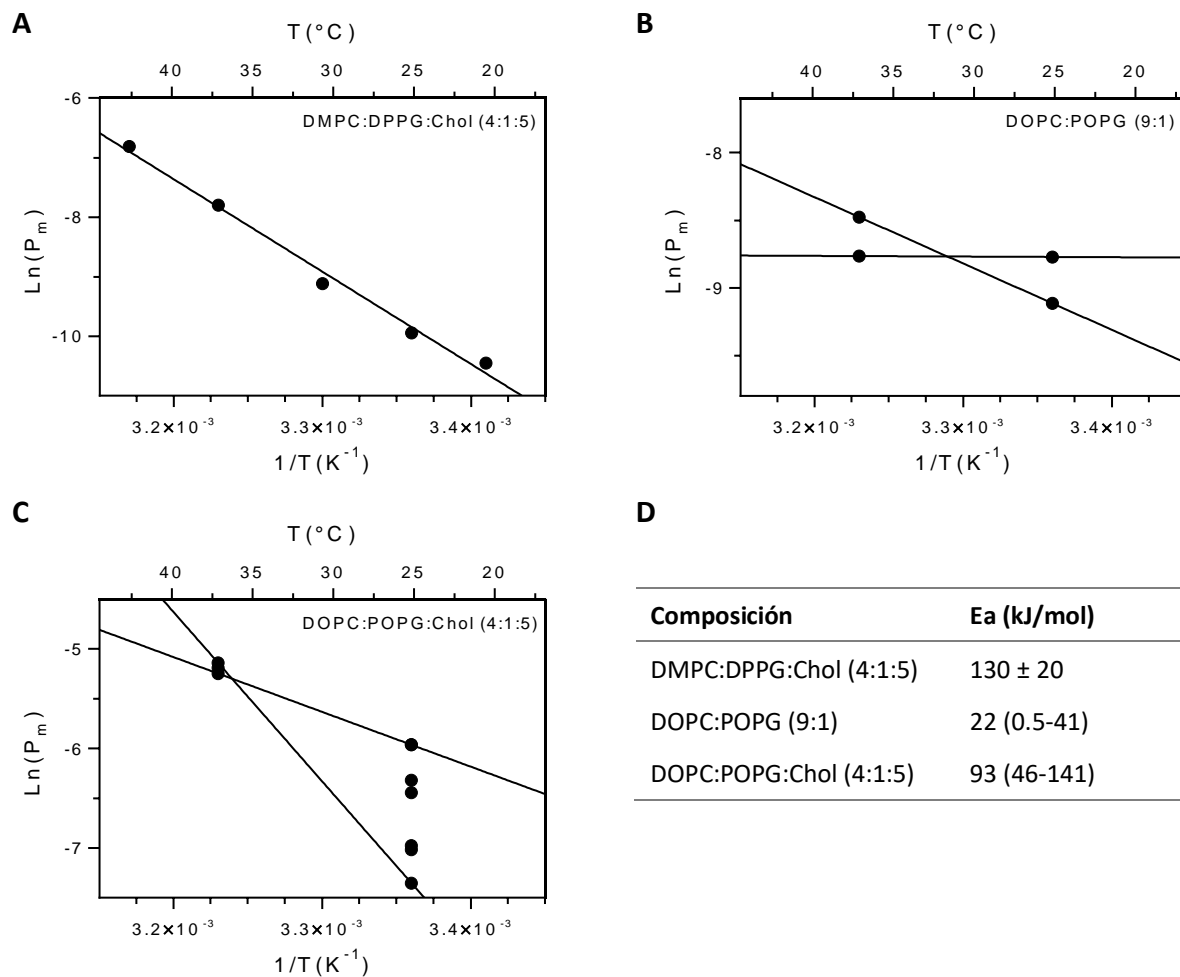


Figura 28. Determinación de E_a para liposomas de DMPC:DPPG:Chol (4:1:5) **(A)**. Estimación de E_a máxima y mínima para liposomas compuestos por DOPC:POPG (9:1) **(B)** y DOPC:POPG:Chol (4:1:5) **(C)**. Valores de E_a obtenidos para los distintos liposomas **(D)**.

Fluidez de membrana

Para intentar explicar la variación de la permeabilidad con la composición lipídica, el contenido de colesterol y la temperatura se hizo un estudio de la fluidez de membrana de los distintos liposomas sintetizados. Para estos experimentos se utilizó 6-lauroil, 1-2-dimetilamino naftaleno (laurdan) un compuesto fluorescente sensible a la polaridad del ambiente sintetizada en 1979 por Gregorio Weber⁹¹. Este compuesto, se intercala en la membrana y nos brinda información del grado de empaquetamiento y la rigidez de la membrana⁹² (Figura 29).

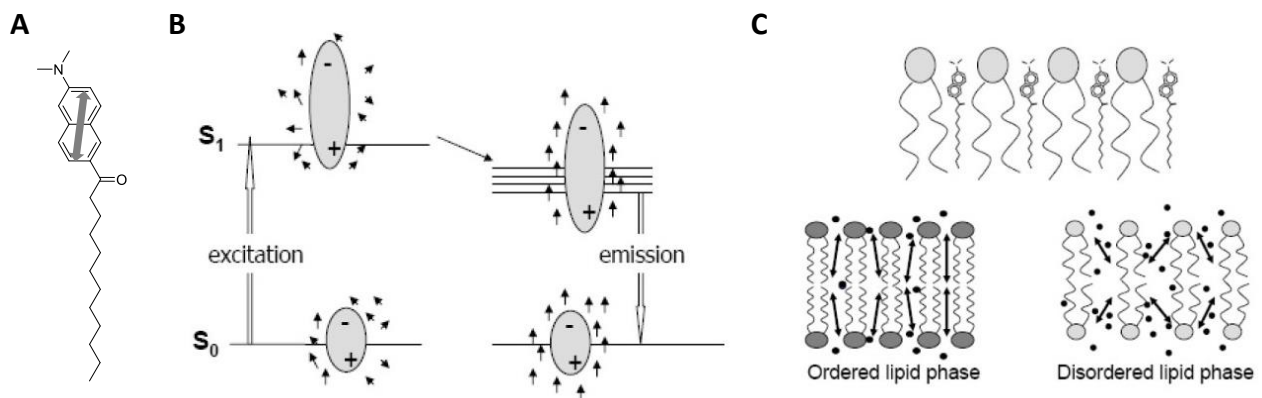


Figura 29. Laurdan. **A.** Momento dipolar de la molécula de laurdan (flecha gris) creado por la separación de carga parcial entre el 2-dimetilamino y el carbonilo. **B.** Diagrama que muestra los cambios en el momento dipolar de laurdan (en gris) después de la excitación del estado fundamental (S_0) a S_1 y su posterior relajación. **C.** La porción naftaleno de la molécula de laurdan se localiza en la membrana al nivel del glicerol de los fosfolípidos. La reorganización de algunas moléculas de agua (puntos negros) localizadas alrededor del dipolo laurdan (flechas) será responsable del corrimiento espectral observado en las diferentes fases. Adaptado de⁹²

Cuando los lípidos de la membrana están en una fase de gel, la emisión máxima de laurdan está centrada en 440 nm y cuando están en fase fluida la emisión máxima se centra en 490 nm. Para cuantificar como varía la fluidez con la temperatura utilizamos la polarización generalizada (GP) (Figura 30).⁹³

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (23)$$

I_{440} e I_{490} son las intensidades de emisión a 440 nm y 490 nm respectivamente, excitando la sonda entre 340 y 360 nm. Una mayor GP indicaría una membrana más rígida, mientras que una GP menor, una más fluida.

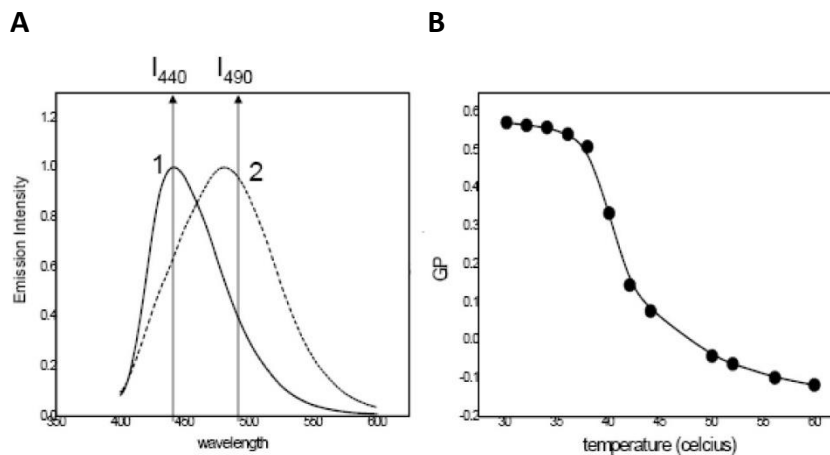


Figura 30. Medidas de GP . A. Espectros de emisión de laurdan en liposomas unilamelares compuestos por DPPC a 35°C (1) y 50°C (2). B. Efecto de la temperatura sobre GP para liposomas de DPPC, con $T_m = 41$ °C. Tomado de ⁹².

Fluidez en liposomas de DMPC:DPPG

Se hipotetizó que el inesperado decremento de la permeabilidad al aumentar la temperatura en los liposomas de DMPC:DPPG (9:1) de 25 a 37 °C podría deberse a que la medida de permeabilidad se realizó muy cerca de la temperatura de transición del componente principal DMPC, región en la cual se observan anomalías. A su vez el DPPG y el colesterol podría tener algún efecto en el estado de la membrana. Por ello, se evaluó el cambio de GP con la temperatura para liposomas de DMPC puros, de DMPC:DPPG (9:1) y DMPC:DPPG:Chol (4:1:5) (Figura 31).

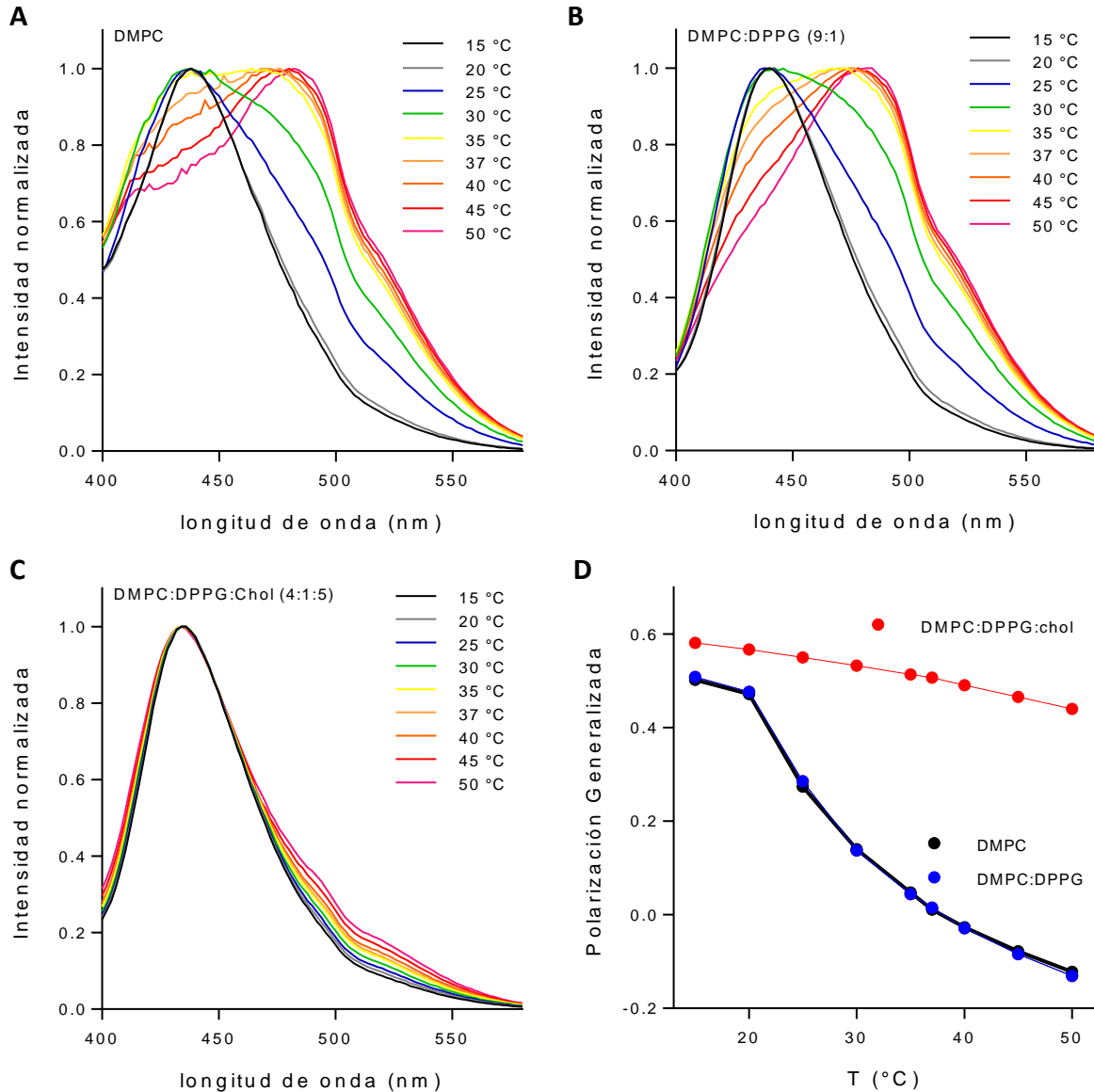


Figura 31. Espectros normalizados de emisión de laudan en liposomas de 100% DMPC (**A**); DMPC:DPPG (9:1) (**B**) y DMPC:DPPG:Chol (4:1:5) (**C**) a diferentes temperaturas excitando a 360 nm. Variación de la polarización generalizada de laudan con la temperatura para membranas de DMPC, DMPC:DPPG (9:1) y DMPC:DPPG:Chol (4:1:5) (**D**).

Observando los espectros de las Figuras 31. A y B y el gráfico de *GP* vs. temperatura (Figura 31.D) se vio que el estado de fluidez de la membrana DMPC:DPPG (9:1) fue muy similar al de la membrana de 100 % DMPC, con mayor pendiente de cambio de *GP* entre los 20 y los 30 °C, lo que nos indica que en este rango de temperaturas se está dando la transición de fase, donde pequeñas variaciones en la temperatura generan cambios importantes en la fluidez de la membrana. Esto concuerda con la alta variabilidad del valor de permeabilidad determinado para estos liposomas a 25 °C.

En el espectro de emisión de lauridan de la membrana compuesta por 50 % de colesterol (Figura 31.C) se observa que el máximo a 440 nm prácticamente no se desplaza al aumentar la temperatura, lo que se refleja en un valor de GP que varía poco con la temperatura. Esto sugiere que en este caso el colesterol amortigua la desorganización de la membrana al aumentar la temperatura. Con esta proporción de colesterol (50%), las bicapas forman un estado conocido como líquido-ordenado, que tiene propiedades de fases gel y fluidas. Lo más notable es la pérdida de la temperatura de transición, que ocurre porque el colesterol fluidiza la fase gel, y ordena la fase fluida (Figura 31).

Fluidez en liposomas de DOPC:POPG

En el caso de los liposomas de DOPC:POPG se observa un aumento de GP cuando se agrega colesterol, sugiriendo que se encuentra en un estado menos fluido, que coincide con lo esperado. En este caso el colesterol se espera que ordene la fase fluida (Figura 32). Por lo tanto, los resultados de fluidez obtenidos con lauridan coinciden con lo esperado de acuerdo a la literatura.

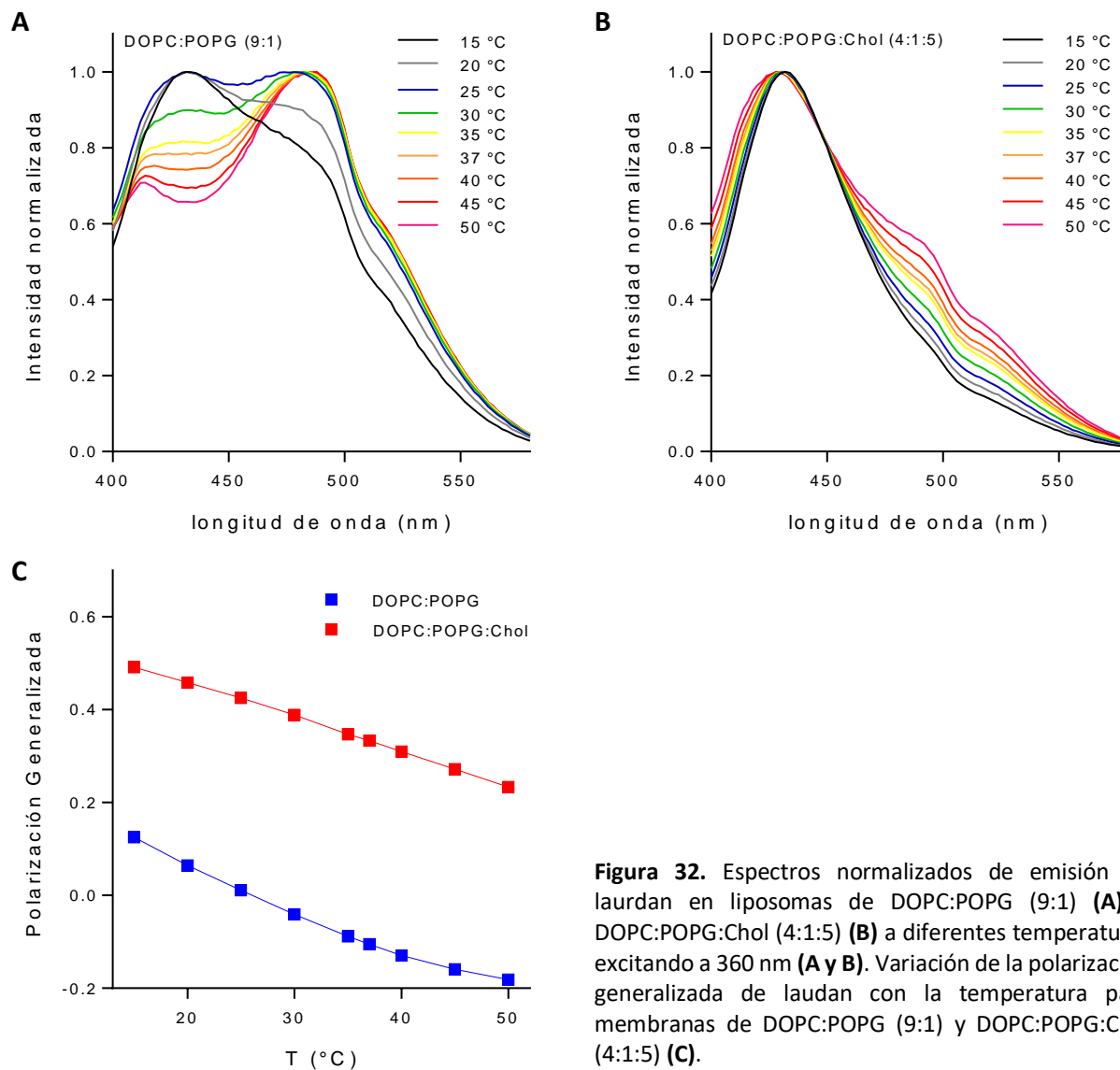


Figura 32. Espectros normalizados de emisión de laurdan en liposomas de DOPC:POPG (9:1) **(A)** y DOPC:POPG:Chol (4:1:5) **(B)** a diferentes temperaturas excitando a 360 nm **(A y B)**. Variación de la polarización generalizada de laurdan con la temperatura para membranas de DOPC:POPG (9:1) y DOPC:POPG:Chol (4:1:5) **(C)**.

El laurdan discrimina el orden lateral de la membrana en base a su estado de hidratación, que está correlacionado con el grado de compactación de la membrana. En las figuras 31 y 32 se puede apreciar el corrimiento espectral que sufre esta sonda cuando está en membranas de fase gel o fluida.

Sin embargo, si en las membranas hay una coexistencia de fase gel/fluida la posición espectral es un promedio, y este abordaje no nos permite establecer si la membrana es homogénea o existen dominios con diferente composición lipídica. Para estos casos sería deseable realizar medidas de tiempo de vida media de fluorescencia del laurdan.

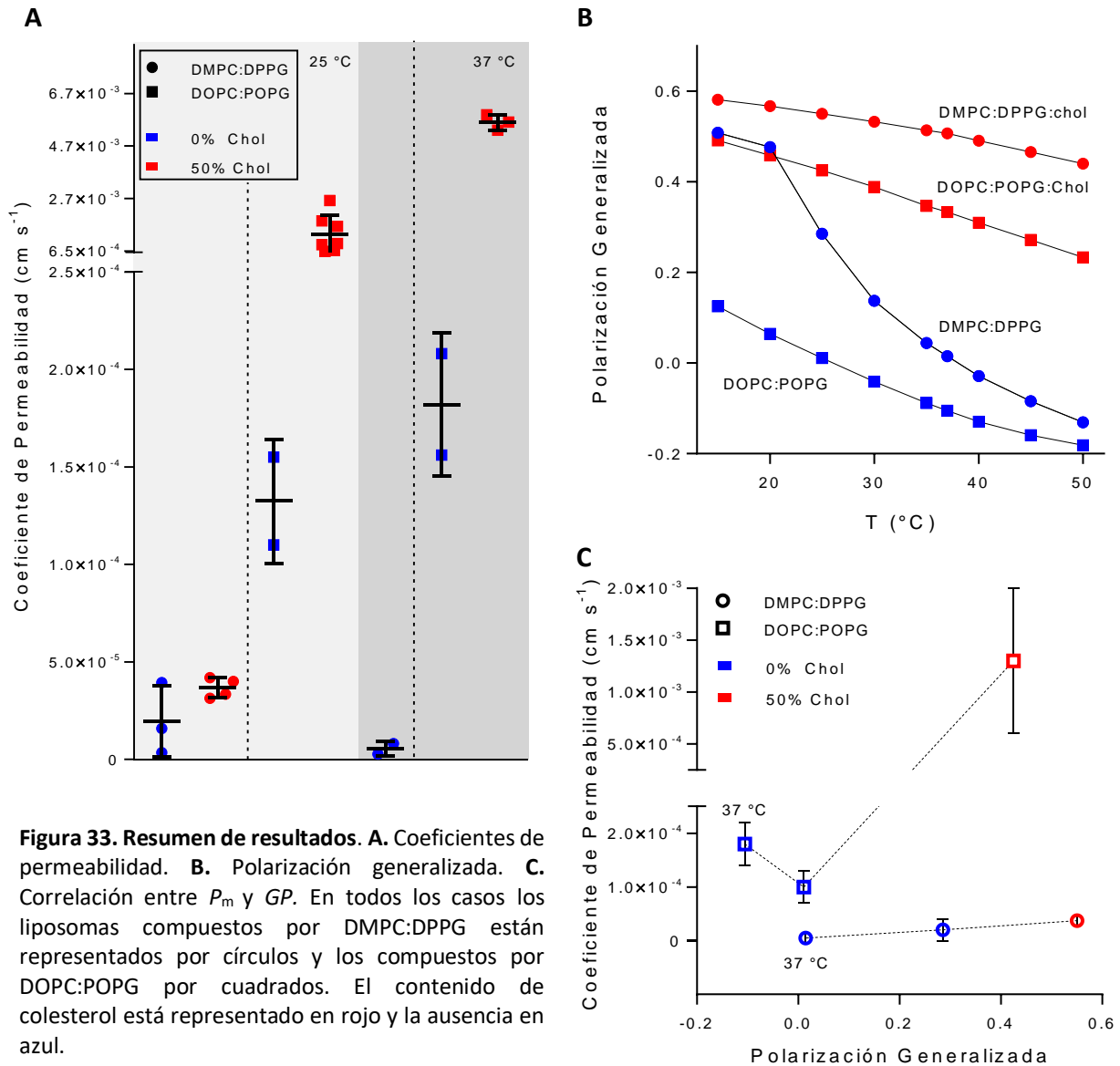


Figura 33. Resumen de resultados. **A.** Coeficientes de permeabilidad. **B.** Polarización generalizada. **C.** Correlación entre P_m y GP . En todos los casos los liposomas compuestos por DMPC:DPPG están representados por círculos y los compuestos por DOPC:POPG por cuadrados. El contenido de colesterol está representado en rojo y la ausencia en azul.

En conclusión, no encontramos correlación entre P_m y GP , lo que nos plantea varios dilemas. Por un lado, se observa una diferencia clara en los valores de P_m que se relacionan más con el grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas que con la presencia de colesterol. Esto se ha observado para otros solutos, en particular para el agua ⁸⁹, y se ha asociado con el aumento en el “área libre”, los defectos en el empaquetamiento de los lípidos que permitirían un fácil ingreso al interior de la bicapa ⁸⁹. También con anterioridad se han relacionado con aumento del volumen libre con las insaturaciones, por el mayor desorden en la membrana y un mayor número de defectos de empaquetamiento en la bicapa, que crea bolsillos vacíos, que no están ocupados por ningún átomo, y podrían transportar solutos ^{32, 94}. Sin embargo, el efecto del colesterol va en contra de lo esperado en este marco. En membranas fluidas el

colesterol tiene un efecto ordenador y de aumentar el empaquetamiento, disminuyendo el volumen libre^{95, 96}, y sin embargo se vio un aumento de P_m con el colesterol. Este aumento podría indicar que existe algún tipo de interacción entre H_2O_2 y el colesterol, que resulta en el aumento de P_m .

Tabla 6. Valores de coeficiente de permeabilidad y polarización generalizada a 25 y 37 °C.

Composición lipídica	T (°C)	P_m (cm s ⁻¹)	GP
DMPC:DPPG (9:1)	25	$(2 \pm 2) \times 10^{-5}$	0.29
DMPC:DPPG:Chol (4:1:5)	25	$(3.7 \pm 0.5) \times 10^{-5}$	0.55
DOPC:POPG (9:1)	25	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	0.01
DOPC:POPG:Chol (4:1:5)	25	$(1.3 \pm 0.7) \times 10^{-3}$	0.04
DMPC:DPPG (9:1)	37	$(5 \pm 4) \times 10^{-6}$	0.01
DOPC:POPG (9:1)	37	$(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-4}$	-0.11
DOPC:POPG:Chol (4:1:5)	37	$(5.5 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	0.33

Liposomas símil glóbulo rojo

En paralelo a este trabajo se está estudiando la permeabilidad de membranas de glóbulos rojos humanos al H_2O_2 . La membrana de glóbulos rojos está compuesta por lípidos, proteínas, con y sin glicosilaciones. Tiene varios canales proteicos que podrían permitir el pasaje del H_2O_2 , pero se ha estudiado sorprendentemente poco sobre la interacción del H_2O_2 con membranas de glóbulos rojos humanos. Para este trabajo, nos interesaba estimar la permeabilidad del peróxido de hidrogeno a través de la porción lipídica de la membrana de glóbulos rojo.

Para ello extrajimos los lípidos de glóbulos rojos humanos como se detalla en materiales y métodos, y preparamos liposomas con catalasa encapsulada. La primera evaluación se realizó con liposomas preparados por extrusión con filtro de 200 nm. El diámetro hidrodinámico efectivo promedio determinado por DLS de estos liposomas fue de 178 ± 96 nm con un índice de polidispersión medio de 0.14 ± 0.01 (Figura 34).

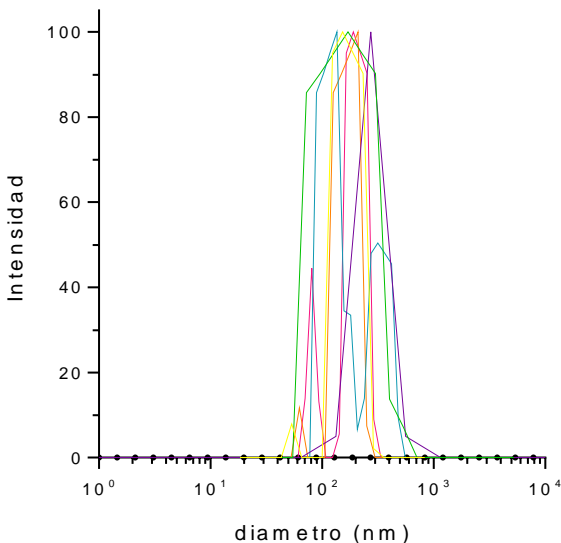


Figura 34. Análisis multimodal de distribución de tamaños de los liposomas de lípidos de glóbulos rojos, por DLS.

Estos liposomas tuvieron actividad catalasa, pero no se pudo determinar la permeabilidad, posiblemente porque ésta sea mayor a la que se puede determinar con liposomas de estas características. Luego de optimizar el sistema para determinación de P_m mayores, como se discutió más arriba, se prepararon liposomas de $1 \mu m$ de diámetro con más catalasa encapsulada, y entonces se pudo determinar la permeabilidad (Figura 35).

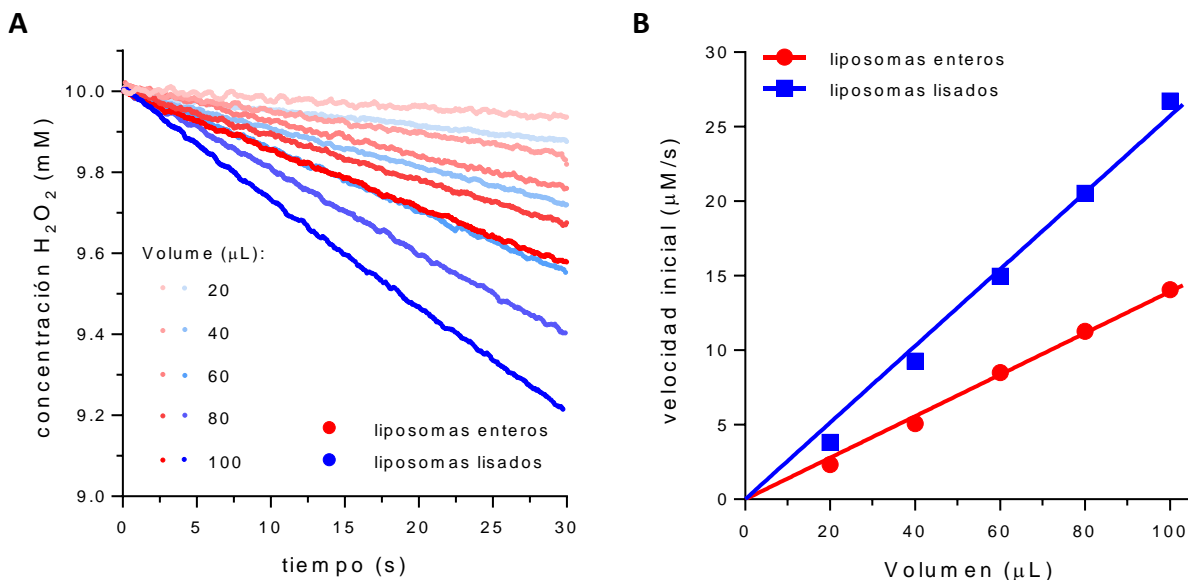


Figura 35. Velocidad de consumo de H_2O_2 (10 mM) a $25^\circ C$ en liposomas de lípidos purificados de membrana de GR enteros (rojo) y lisados (azul) determinados por absorbancia a 240 nm medidos en flujo detenido (**A**). Comparación de la velocidad de consumo de H_2O_2 por liposomas enteros y lisados (**B**). En este caso se prepararon liposomas de $1 \mu m$ de diámetro, conteniendo $7.4 \mu M$ de catalasa. Se determinó un valor de $P_m = 1.2 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$.

Los valores de P_m para la membrana construida con lípidos extraídos de GR humanos son similares a los obtenidos con liposomas de DOPC:POPG:Chol (4:1:5) (Figura 36) y mayores que los obtenidos en membranas de glóbulos rojos humanos intactos. Para liposomas GR a $37^\circ C$, $P_m = (5 \pm 2) \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$, mientras que para glóbulos rojos intactos $P_m = (1.6 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ (datos obtenidos por Florencia Orrico en el mismo laboratorio). A $25^\circ C$, $P_m = (1.4 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ para liposomas GR y $(9.6 \pm 2) \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ para glóbulos rojos intactos. Esto sugiere que el glóbulo rojo no necesitaría de canales proteicos para el transporte de H_2O_2 .

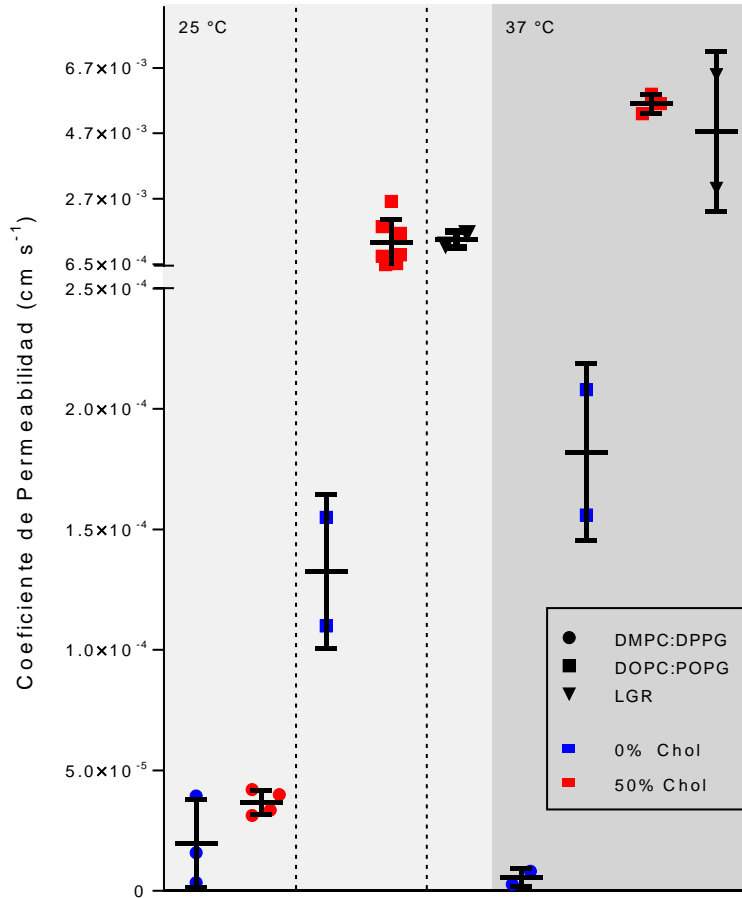


Figura 36. Comparación de P_m obtenidos de liposomas de GR (LGR) con liposomas compuestos por lípidos controlados a 25 y 37 $^{\circ}\text{C}$.

Con los datos obtenidos a 25 $^{\circ}\text{C}$, se estimó la energía de activación de permeación de estas membranas (Figura 37).

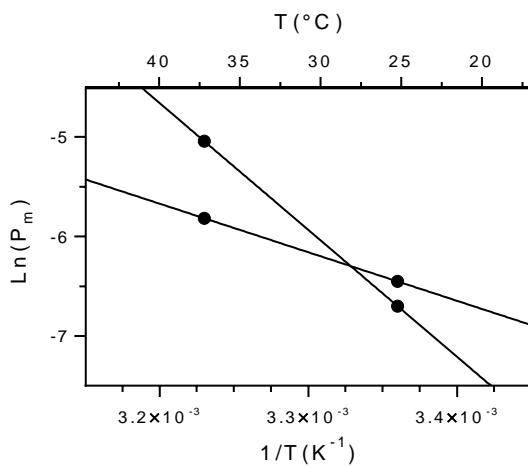


Figura 37. Estimación de E_a para liposomas compuestos por lípidos extraídos de membranas de glóbulos rojos, $E_a = 73$ (41-106) kJ/mol .

Para la energía de activación del proceso de permeación para liposomas de GR se estimó un valor de entre 41 y 106 kJ/mol , con una media de 73 kJ/mol . Este valor es mayor al obtenido en el laboratorio para

glóbulos rojos humanos (32.4 kJ/mol). Este valor de energía de activación mayor para los liposomas sugiere que existen canales proteicos que facilitan la difusión del H_2O_2 dentro del glóbulo rojo. Sin embargo, otras explicaciones también pueden ser posibles. La membrana construida con los lípidos derivados de los GR presenta varias diferencias respecto a la membrana original. Las diferencias principales son la ausencia de proteínas de membrana, la ausencia de la asimetría presente en la membrana del glóbulo rojo ⁹⁷, y del citoesqueleto, que le da la curvatura característica a la membrana. Todos estos componentes afectan el empaquetamiento de los lípidos en la membrana del glóbulo rojo y podría hacer que la fracción lipídica fuese más permeable al H_2O_2 , sin involucrar a proteínas de membrana.

DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo general fue estudiar la permeabilidad de membranas de composición de lípidos conocida al peróxido de hidrógeno y tratar de entender los factores que afectan la misma. Estos estudios se enmarcan en un interés generalizado en la literatura en las diferentes propiedades del H_2O_2 , especialmente en señalización. Si bien se ha determinado la permeabilidad de numerosas membranas celulares al H_2O_2 (Tabla 2), y se ha identificado que ciertas acuaporinas facilitan su pasaje a través de la membrana (ver Introducción), no hay estudios que cuantifiquen la permeabilidad de membranas puramente lipídicas al H_2O_2 .

Como se sabe que las moléculas pequeñas no cargadas atraviesan la membrana por un mecanismo que involucra la disolución en la fase lipídica y luego la difusión por la misma, para redisolverse en la fase acuosa en la otra cara de la membrana, en primer lugar, se estudió la solubilidad del H_2O_2 en diferentes solventes orgánicos. La solubilidad del H_2O_2 en hexadecano, que presenta propiedades similares a las del centro de la bicapa lipídica, fue 122000 veces menor que en agua. Este valor está de acuerdo con lo esperado para una molécula hidrofílica como lo es el H_2O_2 , e indica un reparto altamente desfavorable en la región hidrofóbica de la bicapa lipídica. Para comparar, moléculas levemente hidrofóbicas como el oxígeno y el óxido nítrico son en promedio 10 veces más solubles en solventes orgánicos que en agua, y 4 veces más solubles en membranas fluidas que en agua ²¹. La baja solubilidad del H_2O_2 indica que las membranas lipídicas presentarán una alta barrera termodinámica a la permeación. El valor calculado de energía de Gibbs por el reparto hexadecano/agua del H_2O_2 es de 29.0 kJ/mol, que coincide con valores de energía de Gibbs calculados por dinámica molecular en el centro de una bicapa de DOPC, 33 kJ/mol³¹.

Para construir el perfil de solubilidad de H_2O_2 en la bicapa (Figura 15) no se tuvo en cuenta el resultado obtenido para el reparto entre agua y aceite de oliva, ya que este no resultó en un buen modelo para representar la bicapa. Los valores de entalpía y entropía para el proceso de transferencia del H_2O_2 desde la fase acuosa no concuerdan con lo esperado. Esto podría deberse a la presencia de polifenoles en el medio ya que no se realizó un lavado previo para eliminarlos. Para obtener valores de solubilidad que representen mejor esta región de la bicapa se propone a futuro determinar el reparto entre agua y un solvente con constante dieléctrica similar pero que no sea capaz de reaccionar con el peróxido o derivados como la vaselina líquida.

La permeabilidad de las membranas ensayadas al H_2O_2 osciló entre 5×10^{-6} a $5 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$, dependiendo de la composición (Tabla 7). Estos valores están en el mismo rango que los determinados para membranas celulares, $2 \times 10^{-4} - 1.2 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ (Tabla 2), sugiriendo que la difusión simple sería un mecanismo importante de permeación de membranas celulares. En las membranas que se ensayaron aquí, el factor determinante, fue la presencia de insaturaciones en las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. A futuro sería interesante estudiar la permeabilidad en liposomas con ácidos grasos poli insaturados. Las membranas con fosfolípidos de ácidos grasos saturados DMPC:DPPG (9:1) dieron los valores más bajos de P_m , $2 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ (tabla 7), mientras que las membranas con fosfolípidos de ácidos grasos insaturados DOPC:POPG 9:1 dieron valores de P_m $1.3 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ a 25°C (Tabla 7). Este incremento de 6.5 veces se puede relacionar con el mayor desorden en las membranas de DOPC:POPG, que disminuye el empaquetamiento de los lípidos y aumenta el volumen libre y área libre de la membrana⁸⁹, que incrementa la solubilidad y difusión de moléculas en la fase hidrofóbica de la membrana. Los valores de P_m de agua para membranas de DOPC reportados por Mathai y colaboradores fueron de $1.6 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ ⁸⁹, que es 12.3 veces mayor que el encontrado para el H_2O_2 en este trabajo en membranas similares. En comparación, la permeabilidad de membranas de POPC al oxígeno, que tiene prácticamente el mismo tamaño que el H_2O_2 , pero es ligeramente liposoluble, se estimó en 157 cm s^{-1} , 1.2 millones de veces mayor que la permeabilidad al H_2O_2 en membranas de DOPC:POPG 9:1.

Tabla 7. Valores de permeabilidad de membranas al H_2O_2 .

Composición lipídica	P_m (cm s^{-1})	P_m (cm s^{-1})
	25°C	37°C
DMPC:DPPG (9:1)	$(2 \pm 2) \times 10^{-5}$	$(5 \pm 4) \times 10^{-6}$
DMPC:DPPG:Chol (6.5:1:2.5)	$(5 \pm 2) \times 10^{-5}$	
DMPC:DPPG:Chol (4:1:5)	$(3.7 \pm 0.5) \times 10^{-5}$	
DOPC:POPG (9:1)	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	$(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-4}$
DOPC:POPG:Chol (4:1:5)	$(1.3 \pm 0.7) \times 10^{-3}$	$(5.5 \pm 0.5) \times 10^{-3}$
Símil glóbulo rojo	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	$(5 \pm 2) \times 10^{-3}$
Glóbulo rojo humano (Orrico y colaboradores)	$(9.6 \pm 2) \times 10^{-4}$	$(1.6 \pm 0.3) \times 10^{-3}$

Se esperaba que el agregado de colesterol resultara en un aumento de la rigidez de membrana, aumentando el empaquetamiento de los lípidos, y disminuyendo la solubilidad, difusión del H_2O_2 , por lo tanto, disminuyendo la permeabilidad de las membranas al H_2O_2 . El aumento en la rigidez de las

membranas se verificó utilizando la sonda sensible al empaquetamiento laurdan (Figura 33), pero la permeabilidad aumentó con el agregado de colesterol en vez de disminuir como esperábamos. En los liposomas de DMPC:DPPG (9:1) y DMPC:DPPG:Chol (4:1:5) a 25 °C, el P_m fue $(2 \pm 2) \times 10^{-5}$ y $(3.7 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ cm s⁻¹, respectivamente. En los liposomas de DOPC:POPG (9:1) y DOPC:POPG:Chol (4:1:5) a 25 °C, el P_m fue $(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-4}$ y $(1.3 \pm 0.7) \times 10^{-3}$, respectivamente, y a 37 °C, el P_m fue $(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-4}$ y $(5.5 \pm 0.5) \times 10^{-3}$, respectivamente. Una posible explicación es que en las condiciones ensayadas se estuvieran formando micro dominios, por lo cual el estado de fluidez de la membrana no sería homogéneo en toda su extensión. Con los experimentos que hicimos de laurdan no es posible detectar esto, porque vemos en un promedio de estos posibles estados en la membrana, pero otros ensayos estudiando la vida media de fluorescencia del laurdan en estos liposomas podría llegar a evidenciarlos.

Para determinar el P_m en membranas de DOPC:POPG:Chol (4:1:5) fue necesario utilizar liposomas más grandes, durante bastante tiempo nos rehusamos a usar liposomas de 1 μm de diámetro por no ser completamente unilamelares. De hecho, se estima que el 80 % son unilamelares, y la mayoría del 20% restantes envuelven un segundo liposoma más pequeño. De todas maneras, estimamos que el error introducido por este factor es menor al que se obtuvo experimentalmente. Además, de no incrementar el tamaño de los liposomas, no hubiésemos podido determinar la permeabilidad de las membranas de DOPC:POPG:Chol, que resultaron altamente permeables al H₂O₂.

Cuando se ensayaron los liposomas construidos con lípidos derivados de glóbulos rojos humanos se encontró una alta permeabilidad al H₂O₂, tanto a 25 como a 37 °C, $P_m = (1.4 \pm 0.2) \times 10^{-3}$ y $(5 \pm 2) \times 10^{-3}$ cm s⁻¹, respectivamente. Estos valores son mayores que los obtenidos para glóbulos rojos intactos en condiciones similares por la Lic. Orrico en el mismo laboratorio, $P_m = (9.6 \pm 2) \times 10^{-4}$ y $(1.6 \pm 0.3) \times 10^{-3}$ cm s⁻¹ a 25 y 37 °C, respectivamente. Ello sugiere que el H₂O₂ podría entrar a los glóbulos rojos por difusión simple, sin la necesidad de canales proteicos. El valor preliminar de la energía de activación de la permeación del H₂O₂ a través de estas membranas (74 kJ/mol) es mayor que en glóbulos rojos intactos (34 kJ/mol, Orrico y colaboradores). Esta diferencia podría indicar que la membrana de glóbulos rojos intactos tiene canales proteicos que permiten el pasaje de H₂O₂. Para estar seguros, necesitamos hacer más medidas de P_m a diferentes temperaturas para obtener valores de E_a más precisos. Además, otros factores podrían explicar esta diferencia, incluyendo la asimetría de la distribución de lípidos en la membrana de glóbulos rojos intactos y la curvatura mantenida por proteínas intrínsecas y el citoesqueleto. Estos factores se pierden al construir los liposomas.

De la optimización del método de medida de la permeabilidad encontramos que se puede usar liposomas grandes de 1 μm de diámetro determinar la permeabilidad de las membranas de altamente permeables al H_2O_2 . Los experimentos a futuro se harán con liposomas de estas dimensiones. Ahora se cuenta con experiencia y una plataforma experimental que nos permitirá determinar rápidamente la permeabilidad de membranas al H_2O_2 en un rango amplio, de 2×10^{-5} a $5 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$.

CONCLUSIONES

Se determinó la solubilidad del H_2O_2 en 1-octanol, aceite de oliva y hexadecano. La solubilidad en 1-octanol, fue 15 veces menor que en agua, en aceite de oliva fue 1000 veces menor que en agua, mientras que en hexadecano fue 122000 veces menor que en agua. Esos resultados sugieren que la mayor barrera de energía para la permeación de la membrana por el H_2O_2 se ubicará en la región media de la bicapa.

Se determinó por primera vez el coeficiente de permeabilidad de bicapas puramente lipídicas al H_2O_2 . Se ensayaron membranas de liposomas compuestas por DMPC:DPPG, y por DOPC:POPG con y sin colesterol. Las membranas compuestas por fosfolípidos con cadenas saturadas presentan los valores más bajos de permeabilidad. mientras que las membranas con monoinsaturaciones resultaron ser las más permeables al H_2O_2 . No fue posible encontrar una correlación clara entre la fluidez de la membrana (como reflejo del valor de GP) y el valor de P_m al variar las composiciones de las membranas, sospechamos que la presencia de micro dominios con distinto valor de permeabilidad al peróxido puede estar atrás de esta falta de correlación. Además, se determinó el P_m para membranas compuestas por lípidos extraídos de fantasmas de glóbulos rojos.

Los valores observados para la permeabilidad de membranas de diferente composición al H_2O_2 sugieren que la difusión simple sería uno de los mecanismos más importantes de transporte a través de las membranas celulares.

REFERENCIAS

- [1] Gennis, R. B. (1989) *Biomembranes: molecular structure and function*, Springer Science & Business Media.
- [2] Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 175, 720-731.
- [3] Mouritsen, O. G., and Bagatolli, L. A. (2016) Social Lipids, In *LIFE-AS A MATTER OF FAT*, pp 125-142, Springer.
- [4] Goñi, F. M. (2014) The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model, *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes* 1838, 1467-1476.
- [5] Engelman, D. M. (2005) Membranes are more mosaic than fluid, Nature Publishing Group.
- [6] Sackmann, E. (1995) Biological membranes architecture and function, *Structure and Dynamics of Membranes* 1, 1-63.
- [7] Kusumi, A., and Sako, Y. (1996) Cell surface organization by the membrane skeleton, *Current opinion in cell biology* 8, 566-574.
- [8] Bagatolli, L., and Mouritsen, O. G. (2014) *Vida ¿Una cuestión de grasas?: Una perspectiva desde la biofísica de membranas*, Yachay.
- [9] Mouritsen, O. G., and Bagatolli, L. A. (2016) Head and tail, In *LIFE-AS A MATTER OF FAT*, pp 19-30, Springer.
- [10] Andersen, J. P., Vestergaard, A. L., Mikkelsen, S. A., Mogensen, L. S., Chalal, M., and Molday, R. S. (2016) P4-ATPases as phospholipid flippases—structure, function, and enigmas, *Frontiers in physiology* 7, 275.
- [11] Yabas, M., Coupland, L. A., Cromer, D., Winterberg, M., Teoh, N. C., D'Rozario, J., Kirk, K., Bröer, S., Parish, C. R., and Enders, A. (2014) Mice deficient in the putative phospholipid flippase ATP11C exhibit altered erythrocyte shape, anemia, and reduced erythrocyte life span, *Journal of Biological Chemistry* 289, 19531-19537.
- [12] Arashiki, N., Takakuwa, Y., Mohandas, N., Hale, J., Yoshida, K., Ogura, H., Utsugisawa, T., Ohga, S., Miyano, S., and Ogawa, S. (2016) ATP11C is a major flippase in human erythrocytes and its defect causes congenital hemolytic anemia, *Haematologica* 101, 559-565.
- [13] Epan, R. M., and Ruysschaert, J.-M. (2017) The biophysics of cell membranes, *Springer series in biophysics* 19, 875-882.
- [14] Stein, W. (1986) *Transport and diffusion across cell membranes*, Elsevier.
- [15] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., and Keith Roberts, P. W. (2018) *Molecular biology of the cell*.
- [16] Mouritsen, O. G., and Bagatolli, L. A. (2016) Life from molecules, In *LIFE-AS A MATTER OF FAT*, pp 3-17, Springer.
- [17] Casares, D., Escribá, P. V., and Rosselló, C. A. (2019) Membrane lipid composition: effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues, *International journal of molecular sciences* 20, 2167.
- [18] Yawata, Y. (2006) *Cell membrane: the red blood cell as a model*, John Wiley & Sons.
- [19] Deng, D., Xu, C., Sun, P., Wu, J., Yan, C., Hu, M., and Yan, N. (2014) Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1, *Nature* 510, 121-125.
- [20] Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2005) *Lehninger principles of biochemistry*, Macmillan.

- [21] Möller, M. N., Cuevasanta, E., Orrico, F., Lopez, A. C., Thomson, L., and Denicola, A. (2019) Diffusion and transport of reactive species across cell membranes, In *Bioactive Lipids in Health and Disease*, pp 3-19, Springer.
- [22] Reithmeier, R. A., Casey, J. R., Kalli, A. C., Sansom, M. S., Alguel, Y., and Iwata, S. (2016) Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context, *Biochimica et biophysica acta* 1858, 1507-1532.
- [23] Overton, C. E. (1901) *Studien über die Narkose: zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie*, G. Fischer.
- [24] Missner, A., and Pohl, P. (2009) 110 years of the Meyer–Overton rule: predicting membrane permeability of gases and other small compounds, *ChemPhysChem* 10, 1405-1414.
- [25] Walter, A., and Gutknecht, J. (1986) Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes, *The Journal of membrane biology* 90, 207-217.
- [26] Zwolinski, B. J., Eyring, H., and Reese, C. E. (1949) Diffusion and Membrane Permeability, *The Journal of physical chemistry* 53, 1426-1453.
- [27] Diamond, J. M., and Katz, Y. (1974) Interpretation of nonelectrolyte partition coefficients between dimyristoyl lecithin and water, *The Journal of membrane biology* 17, 121-154.
- [28] Finkelstein, A. (1976) Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes, *The Journal of general physiology* 68, 127-135.
- [29] Subczynski, W. K., Hyde, J. S., and Kusumi, A. (1989) Oxygen permeability of phosphatidylcholine-cholesterol membranes, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 4474-4478.
- [30] Marrink, S. J., and Berendsen, H. J. (1996) Permeation process of small molecules across lipid membranes studied by molecular dynamics simulations, *The Journal of Physical Chemistry* 100, 16729-16738.
- [31] Cordeiro, R. M. (2014) Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: distribution, mobility and permeation, *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes* 1838, 438-444.
- [32] Möller, M. N., Li, Q., Chinnaraj, M., Cheung, H. C., Lancaster Jr, J. R., and Denicola, A. (2016) Solubility and diffusion of oxygen in phospholipid membranes, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1858, 2923-2930.
- [33] Subczynski, W. K., Hyde, J. S., and Kusumi, A. (1991) Effect of alkyl chain unsaturation and cholesterol intercalation on oxygen transport in membranes: a pulse ESR spin labeling study, *Biochemistry* 30, 8578-8590.
- [34] Xiang, T.-X., and Anderson, B. D. (1998) Influence of chain ordering on the selectivity of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes for permeant size and shape, *Biophysical journal* 75, 2658-2671.
- [35] Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., and Jahn, T. P. (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide, *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes* 1758, 994-1003.
- [36] Baraban, J. H., Changala, P. B., and Stanton, J. F. (2018) The equilibrium structure of hydrogen peroxide, *Journal of Molecular Spectroscopy* 343, 92-95.
- [37] Winterbourn, C. C. (2013) The biological chemistry of hydrogen peroxide, In *Methods in enzymology*, pp 3-25, Elsevier.
- [38] Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiological reviews* 59, 527-605.
- [39] Korkina, L., Scordo, M. G., Deeva, I., Cesareo, E., and De Luca, C. (2009) The chemical defensive system in the pathobiology of idiopathic environment-associated diseases, *Current drug metabolism* 10, 914-931.
- [40] Winterbourn, C. C. (2018) Biological production, detection, and fate of hydrogen peroxide, *Antioxidants & Redox Signaling*.

- [41] Stone, J. R., and Yang, S. (2006) Hydrogen peroxide: a signaling messenger, *Antioxidants & redox signaling* 8, 243-270.
- [42] Breton-Romero, R., and Lamas, S. (2014) Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells, *Redox biology* 2, 529-534.
- [43] Talwar, D., Messens, J., and Dick, T. P. (2020) A role for annexin A2 in scaffolding the peroxiredoxin 2-STAT3 redox relay complex, *Nature communications* 11, 1-11.
- [44] Hempel, N., and Trebak, M. (2017) Crosstalk between calcium and reactive oxygen species signaling in cancer, *Cell calcium* 63, 70-96.
- [45] Clayton, R. K. (1959) Permeability barriers and the assay of catalase in intact cells, *Biochimica et biophysica acta* 36, 35-39.
- [46] Nicholls, P. (1965) Activity of catalase in the red cell, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation* 99, 286-297.
- [47] Antunes, F., and Cadenas, E. (2000) Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes, *FEBS letters* 475, 121-126.
- [48] Seaver, L. C., and Imlay, J. A. (2001) Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*, *Journal of bacteriology* 183, 7182-7189.
- [49] Branco, M. R., Marinho, H. S., Cyrne, L., and Antunes, F. (2004) Decrease of H₂O₂ plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*, *The Journal of biological chemistry* 279, 6501-6506.
- [50] Mathai, J. C., and Sitaramam, V. (1994) Stretch sensitivity of transmembrane mobility of hydrogen peroxide through voids in the bilayer. Role of cardiolipin, *The Journal of biological chemistry* 269, 17784-17793.
- [51] Sitaramam, V., Mathai, J. C., Rao, N. M., and Block, L. H. (1989) Hydrogen peroxide permeation across liposomal membranes: a novel method to assess structural flaws in liposomes, *Molecular and cellular biochemistry* 91, 91-97.
- [52] Abuin, E., Lissi, E., and Ahumada, M. (2012) Diffusion of hydrogen peroxide across DPPC large unilamellar liposomes, *Chemistry and physics of lipids* 165, 656-661.
- [53] Mathai, J. C., and Sitaramam, V. (1994) Stretch sensitivity of transmembrane mobility of hydrogen peroxide through voids in the bilayer. Role of cardiolipin, *Journal of Biological Chemistry* 269, 17784-17793.
- [54] De Duve, C. (1965) The separation and characterization of subcellular particles, *Harvey lectures* 59, 49.
- [55] Henzler, T., and Steudle, E. (2000) Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels, *Journal of experimental botany* 51, 2053-2066.
- [56] Makino, N., Sasaki, K., Hashida, K., and Sakakura, Y. (2004) A metabolic model describing the H₂O₂ elimination by mammalian cells including H₂O₂ permeation through cytoplasmic and peroxisomal membranes: comparison with experimental data, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1673, 149-159.
- [57] Lim, J. B., Langford, T. F., Huang, B. K., Deen, W. M., and Sikes, H. D. (2016) A reaction-diffusion model of cytosolic hydrogen peroxide, *Free Radical Biology and Medicine* 90, 85-90.
- [58] Benga, G., Pop, V. I., Popescu, O., and Borza, V. (1990) The basal permeability to water of human red blood cells evaluated by a nuclear magnetic resonance technique, *Bioscience Reports* 10, 31-36.
- [59] Benga, G., Matei, H., Borza, T., Porutiu, D., and Lupse, C. (1993) Comparative nuclear magnetic resonance studies on water diffusional permeability of red blood cells from mice and rats, *Comparative Biochemistry and Physiology* 104, 491-495.
- [60] Bienert, G. P., and Chaumont, F. (2014) Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide, *Biochimica et biophysica acta* 1840, 1596-1604.

- [61] Cordeiro, R. M. (2015) Molecular dynamics simulations of the transport of reactive oxygen species by mammalian and plant aquaporins, *Biochimica et biophysica acta* 1850, 1786-1794.
- [62] Bienert, G. P., Møller, A. L., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., and Jahn, T. P. (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes, *The Journal of biological chemistry* 282, 1183-1192.
- [63] Almasalmeh, A., Krenc, D., Wu, B., and Beitz, E. (2014) Structural determinants of the hydrogen peroxide permeability of aquaporins, *The FEBS journal* 281, 647-656.
- [64] Dynowski, M., Schaaf, G., Loque, D., Moran, O., and Ludewig, U. (2008) Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂, *The Biochemical journal* 414, 53-61.
- [65] Miller, E. W., Dickinson, B. C., and Chang, C. J. (2010) Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15681-15686.
- [66] Hara-Chikuma, M., Satooka, H., Watanabe, S., Honda, T., Miyachi, Y., Watanabe, T., and Verkman, A. S. (2015) Aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide transport is required for NF- κ B signalling in keratinocytes and development of psoriasis, *Nature communications* 6, 7454.
- [67] Vieceli Dalla Sega, F., Zambonin, L., Fiorentini, D., Rizzo, B., Caliceti, C., Landi, L., Hrelia, S., and Prata, C. (2014) Specific aquaporins facilitate Nox-produced hydrogen peroxide transport through plasma membrane in leukaemia cells, *Biochimica et biophysica acta* 1843, 806-814.
- [68] Amen, F., Machin, A., Touriño, C., Rodríguez, I., Denicola, A., and Thomson, L. (2017) N-acetylcysteine improves the quality of red blood cells stored for transfusion, *Archives of biochemistry and biophysics* 621, 31-37.
- [69] Kristl, A., and Vesnaver, G. (1995) Thermodynamic investigation of the effect of octanol–water mutual miscibility on the partitioning and solubility of some guanine derivatives, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 91, 995-998.
- [70] Nelson, D. P., and Kiesow, L. A. (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV), *Analytical biochemistry* 49, 474-478.
- [71] Cai, H., Liu, X., Zou, J., Xiao, J., Yuan, B., Li, F., and Cheng, Q. C. (2018) Multi-wavelength spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water with peroxidase-catalyzed oxidation of ABTS, *Chemosphere* 193, 833-839.
- [72] Silvius, J. R. (1982) Thermotropic phase transitions of pure lipids in model membranes and their modifications by membrane proteins, *Lipid-protein interactions* 2, 239-281.
- [73] Papahadjopoulos, D., Nir, S., and Ohki, S. (1972) Permeability properties of phospholipid membranes: effect of cholesterol and temperature, *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes* 266, 561-583.
- [74] Marsh, D. (2002) Membrane water-penetration profiles from spin labels, *European Biophysics Journal* 31, 559-562.
- [75] Nymeyer, H., and Zhou, H.-X. (2008) A method to determine dielectric constants in nonhomogeneous systems: application to biological membranes, *Biophysical journal* 94, 1185-1193.
- [76] Stern, H. A., and Feller, S. E. (2003) Calculation of the dielectric permittivity profile for a nonuniform system: application to a lipid bilayer simulation, *The Journal of chemical physics* 118, 3401-3412.
- [77] Lide, D. R. (2004) *CRC handbook of chemistry and physics*, Vol. 85, CRC press.
- [78] Ushie, P., Osang, J., Ojar, J., Ohakwere-eze, M., and Alozie, S. (2014) Investigation of the efficiency of olive oil as dielectric material and its economic value on the environment using its dielectric properties, *International Journal of Advance Research* 2.
- [79] Lozano, H. R., and Martínez, F. (2006) Thermodynamics of partitioning and solvation of ketoprofen in some organic solvent: buffer and liposome systems, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 42, 601-613.

- [80] Bangham, A. D., Standish, M. M., and Watkins, J. C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *Journal of molecular biology* 13, 238-252.
- [81] Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., Fessi, H., and Biotechnology. (2012) Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art, *Journal of colloid Science* 1, 147-168.
- [82] Barba, A. A., Bochicchio, S., Dalmoro, A., and Lamberti, G. J. P. (2019) Lipid delivery systems for nucleic-acid-based-drugs: From production to clinical applications, 11, 360.
- [83] Grimaldi, N., Andrade, F., Segovia, N., Ferrer-Tasies, L., Sala, S., Veciana, J., and Ventosa, N. (2016) Lipid-based nanovesicles for nanomedicine, *Chemical Society Reviews* 45, 6520-6545.
- [84] Mouritsen, O. G., and Bagatolli, L. A. (2016) The More We Are Together, In *LIFE-AS A MATTER OF FAT*, pp 95-110, Springer.
- [85] Stein, W. (2012) *The movement of molecules across cell membranes*, Vol. 6, Elsevier.
- [86] Torchilin, P. V., Torchilin, V., Torchilin, V., and Weissig, V. (2003) *Liposomes: a practical approach*, Oxford University Press.
- [87] Fasman, G. D. (1976) *CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. II, Proteins, 3rd ed., CRC press.
- [88] Mouritsen, O. G. (2005) Lively Lipids Provide for Function, *Life—As a Matter of Fat: The Emerging Science of Lipidomics*, 129-136.
- [89] Mathai, J. C., Tristram-Nagle, S., Nagle, J. F., and Zeidel, M. L. (2008) Structural determinants of water permeability through the lipid membrane, *The Journal of general physiology* 131, 69-76.
- [90] Subczynski, W. K., Hyde, J. S., and Kusumi, A. (1989) Oxygen permeability of phosphatidylcholine--cholesterol membranes, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 4474-4478.
- [91] Weber, G., and Farris, F. J. (1979) Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene, *Biochemistry* 18, 3075-3078.
- [92] Sánchez, S. A., Tricerri, M., Gunther, G., and Gratton, E. (2007) Laurdan generalized polarization: from cuvette to microscope, *Modern Research Educational Topics in Microscopy* 2, 1007-1014.
- [93] Parasassi, T., De Stasio, G., d'Ubaldo, A., and Gratton, E. (1990) Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence, *Biophysical journal* 57, 1179-1186.
- [94] Träuble, H. (1971) The movement of molecules across lipid membranes: A molecular theory, *J Membr Biol* 4, 193-208.
- [95] Falck, E., Patra, M., Karttunen, M., Hyvönen, M. T., and Vattulainen, I. (2004) Lessons of slicing membranes: interplay of packing, free area, and lateral diffusion in phospholipid/cholesterol bilayers, *Biophysical journal* 87, 1076-1091.
- [96] Falck, E., Patra, M., Karttunen, M., Hyvönen, M. T., and Vattulainen, I. (2004) Impact of cholesterol on voids in phospholipid membranes, *The Journal of chemical physics* 121, 12676-12689.
- [97] Lorent, J. H., Levental, K. R., Ganesan, L., Rivera-Longsworth, G., Sezgin, E., Doktorova, M., Lyman, E., and Levental, I. (2020) Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape, *Nature chemical biology* 16, 644-652.