



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA,
SEDE MEDELLÍN
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE FÍSICA**

**PERMEABILIZACIÓN POTENCIAL-DEPENDIENTE DE
MEMBRANAS LIPÍDICAS ARTIFICIALES CON PÉPTIDOS
POLICATIÓNICOS**

José Alexander Álvarez Bustamante

Tesis presentada como requisito para optar el título de Doctor en Ciencias – Física

Director:

Viktor Lemeshko, DSc en Biofísica; PhD en Bioquímica

Grupo de Biofísica – Escuela de Física

2017

A mi hija Ana María.

Agradecimientos

Quiero agradecer a varias personas que estuvieron conmigo durante esta dura etapa de formación académica.

Agradezco a mis padres José Álvarez y Gabriela Bustamante y a mis hermanos Frank, Jonathan y Dídier por el infinito apoyo que siempre me han dado.

Agradezco a mi querida esposa Milena Orozco, por su compañía, paciencia y amor.

Agradezco a la familia Cárdenas Gómez por acogerme gratamente durante el inicio de esta etapa de mi vida.

Agradezco a Diego Ortiz, Marlon Fulla, Juan Luis Palacio, Sally Valbuena y a Estefanía Orrego, por su buena compañía.

Agradezco al profesor Dairo Rendón por su apoyo y sus valiosos consejos.

Agradezco al profesor Viktor Lemeshko por enseñarme que desde en un país del “tercer mundo” se puede hacer ciencia de calidad.

También agradezco a Colciencias (Colombia) (código del proyecto 5201-545-31565) y a la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo económico en esta tesis.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN GENERAL	1
Abreviaturas y símbolos	2
Palabras Clave	2
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Péptidos policatiónicos y su actividad biológica	5
2.2 Membranas lipídicas artificiales como modelos de membrana para la investigación de la actividad ionofórica de los péptidos policatiónicos	7
2.2.1 Bicapa lipídica plana (BLP)	10
2.2.2 Liposomas	11
2.3 Generación de potencial eléctrico transmembranal en liposomas	12
2.4 Potencial eléctrico superficial	13
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo general	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. MÉTODO Y APARATO PARA LA PERFORACIÓN ELÉCTRICA DE LÁMINAS DE TEFLÓN PARA EXPERIMENTOS CON BICAPA LIPÍDICA PLANA	16
4.1 Resumen	16
4.2 Introducción	17
4.3 Materiales y métodos	18
4.3.1 Construcción de un sistema de perforación eléctrica	18
4.3.2 Perforación eléctrica de láminas orgánicas	21
4.4 Resultados	21
4.5 Discusión	31

5. PERMEABILIZACIÓN IÓNICA DE LA BICAPA LIPÍDICA PLANA CON PÉPTIDOS POLICATIÓNICOS, MODULADA CON POTENCIAL TRANSMEMBRANAL Y POTENCIAL SUPERFICIAL	34
5.1 Resumen	34
5.2 Introducción	34
5.3 Materiales y métodos	36
5.3.1 Reactivos	36
5.3.2 Instalación de una estación de trabajo para experimentos con bicapa lipídica plana	36
5.3.3 Preparación de soluciones lipídicas para experimentos con bicapa lipídica plana	42
5.3.4 Formación de la bicapa lipídica plana	43
5.3.5 Evaluación de la actividad permeabilizadora potencial-dependiente de los péptidos policationicos	44
5.4 Resultados	44
5.5 Discusión	48
6. MODELOS COMPUTACIONALES PARA MONITOREAR EL POTENCIAL TRANSMEMBRANAL DE VESÍCULAS LIPÍDICAS CON SONDAS DE FLUORESCENCIA: CASO DiSC₃(5)	51
6.1 Resumen	51
6.2 Introducción	52
6.3 Metodología	54
6.3.1 Algunas características de la suspensión de liposomas y descripción general de los modelos	54
6.3.2 Modelo que considera los cambios del potencial superficial de membrana (modelo A)	56
6.3.3 Modelo que considera los cambios de potencial superficial de la membrana y la dimerización de la sonda en los medios acuosos (modelo B)	60
6.3.4 Modelo que considera los cambios del potencial superficial de membrana y la dimerización de la sonda en la fase-membrana (modelo C)	61

6.3.5 Modelo que considera los cambios de potencial superficial de membrana y la dimerización de la sonda en las fases acuosas y en la membrana (modelo D)	62
6.4 Resultados	63
6.5 Discusión	75

7. PERMEABILIZACIÓN DE LIPOSOMAS CON PÉPTIDOS

POLICATIÓNICOS EN FUNCIÓN DEL POTENCIAL

TRANSMEMBRANAL Y DEL POTENCIAL SUPERFICIAL 83

7.1 Resumen	83
-----------------------	----

7.2 Introducción	83
----------------------------	----

7.3 Materiales y métodos	85
------------------------------------	----

7.3.1 Reactivos	85
---------------------------	----

7.3.2 Preparación de liposomas LUV	85
--	----

7.3.3 Generación de potencial transmembranal en liposomas LUV	87
---	----

7.4 Resultados	87
--------------------------	----

7.5 Discusión	92
-------------------------	----

8. CONCLUSIONES GENERALES 98

APÉNDICE 100

A.1 Programación del microcontrolador PIC16F877 para su implementación en el generador de pulsos programables del aparato de perforación eléctrica	100
--	-----

A.2 Manual para la programación de pulsos (o descargas eléctricas) desde el equipo generador de pulsos programable	110
--	-----

A.3 Diseño y programación del software de adquisición de datos utilizando Labview y manual de operación	112
---	-----

Listado de figuras	118
-------------------------------------	------------

Listado de tablas	122
------------------------------------	------------

LISTA DE PUBLICACIONES	123
---	------------

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
---	------------

RESUMEN GENERAL

Los péptidos policatiónicos son moléculas que hacen parte del sistema de defensa de los seres vivos contra microorganismos patógenos. En esta tesis fue evaluada la actividad permeabilizadora de péptidos derivados de la protoxina Cry11Bb1 de *Bacillus thuringiensis*, subespecie *medellin*, en membranas artificiales como bicapa lipídica plana (BLP) y liposomas. Para ello fue necesario implementar en la técnica de BLP un método novedoso de perforación eléctrica de láminas de Teflón en cuyas perforaciones, de bordes finos, regulares y sin quemaduras, se formó la BLP. El método de perforación eléctrica desarrollado en este trabajo se puede utilizar para perforar otras láminas orgánicas, lo que permitió solicitar la patente de invención de este método a nivel nacional e internacional. En BLP se mostró que la permeabilización con los péptidos antimicrobianos BTM-P1 y BTM-P4 es potencial-dependiente, igual que con los péptidos anticancerígenos P7-4 y P7-5. También se mostró que la permeabilización de la BLP depende del potencial superficial, el cual puede ser modulado por la adsorción del catión divalente Mg^{2+} en la membrana. En presencia de Mg^{2+} , se incrementa la concentración efectiva del péptido BTM-P1 para permeabilizar la bicapa lipídica. El otro modelo de membrana lipídica artificial para evaluar la actividad permeabilizadora de los péptidos fueron los liposomas, usando la sonda catiónica de fluorescencia DiSC₃(5) para monitorear cambios de potencial transmembranal. Para esto, se diseñó un modelo computacional sobre la distribución de la sonda DiSC₃(5) en una suspensión de liposomas con el fin de definir las condiciones experimentales más adecuadas para monitorear cambios del potencial transmembranal en función de la concentración de liposomas en la suspensión y de la carga superficial de membrana (la cual depende de la concentración de los lípidos negativamente cargados y de la fuerza iónica del medio de incubación). Las pruebas con liposomas confirmaron que la actividad permeabilizadora de los péptidos policatiónicos (que poseen actividad antimicrobiana y anticancerígena) es potencial-dependiente, y que dicha actividad se puede afectar adicionalmente cambiando el potencial superficial de membrana.

Abreviaturas y símbolos:

ANS⁻: 1-anilino-8-naphthalenesulfonate

AP,%: Porcentaje de fosfolípidos aniónicos en liposomas, %

BLP: Bicapa lipídica plana

DiSC₃(5): 3,3'-Dipropylthiadicarbocyanine iodide

LUV: Large unilamellar vesicles

PEG400: Polyethylene glicol 400

POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

POPE: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

SUV: Small unilamellar vesicles

$\Delta\Psi$: Potencial transmembranal

σ : densidad de carga superficial

ϕ : potencial superficial

Palabras clave:

Péptidos Policatiónicos - Bicapa Lipídica Plana - Liposomas - Potencial Transmembranal - Potencial Superficial - Perforación Eléctrica - Modelo Computacional.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Algunos antibióticos clásicos se han caracterizado por bloquear la síntesis de ácidos nucleicos, afectar estructuras como ribosomas e inhibir las enzimas que participan en la síntesis de proteínas de microorganismos patógenos (Goldberg y Friedman 1971; Finberg et al. 2004; Tenson y Mankin 2006). Pero para los antibióticos clásicos se ha reportado el fenómeno de resistencia de los microorganismos (Woodford y Ellington 2007), lo que representa un problema de salud pública (Jackson et al. 1998). Por ello, se están desarrollando otros tipos de antibióticos con mecanismos de acción distintos a los antibióticos clásicos.

Entre estos otros tipos de antibióticos están los péptidos policatiónicos (Giacometti et al. 1999; Epanand et al. 2016), los cuales permeabilizan la bicapa lipídica de las membranas, estructura no mutable de las células patógenas (Peschel y Sahl 2006). Por lo tanto, estudiar la interacción de los péptidos con la bicapa lipídica es importante, y para ello se han desarrollado y utilizado modelos de bicapa lipídica artificial como la BLP y los liposomas.

La técnica de BLP es efectiva pero compleja. Esta consiste en formar la BLP en una perforación hecha en una lámina de Teflón que separa dos compartimientos con medios acuosos en los cuales se ubican electrodos para aplicar voltaje y registrar la corriente eléctrica a través de la BLP. Uno de los principales problemas de la técnica es la estabilidad de la BLP, la cual depende de la calidad de los bordes de la perforación en la lámina de Teflón donde se forma (White 1972). En esta tesis se desarrolló un método novedoso de perforación eléctrica que permitió mejorar la estabilidad de la BLP. En láminas de Teflón se realizaron perforaciones utilizando dos tipos de configuración de electrodos, uno metal-metal y el otro metal-líquido; este último ofreció la ventaja de formar perforaciones uniformes y de bordes no quemados. El método de perforación eléctrica con electrodo-líquido permitió además fijar sustancias en los bordes de las perforaciones, lo que podría ser útil para futuras investigaciones con BLP. Para desarrollar este método de perforación eléctrica fue necesario construir un equipo que permitió adicionalmente ajustar el tamaño

de las perforaciones, tanto en Teflón como en otras láminas orgánicas, programando algunos parámetros como número y frecuencia de las descargas eléctricas.

Otro modelo de membrana lipídica artificial, de gran interés, para estudiar la actividad permeabilizadora de la bicapa lipídica con péptidos policatiónicos son los liposomas. Es posible generar un potencial transmembranal relativamente alto aprovechando un gradiente de iones de potasio (K^+) entre los medios acuosos interno y externo de los liposomas y adicionando el ionóforo valinomicina (sustancia que aumenta la permeabilidad de la membrana para el K^+). Con una sonda catiónica fluorescente, como DiSC₃(5), es posible monitorear los cambios de potencial transmembranal en liposomas provocados por la permeabilización de la membrana con péptido. Con el fin de encontrar las mejores condiciones experimentales para monitorear los cambios de potencial transmembranal, fue desarrollado un modelo computacional de distribución de la sonda DiSC₃(5) en una suspensión de liposomas. Con este modelo computacional se evaluó el cambio de potencial transmembranal según la concentración de DiSC₃(5), la concentración de liposomas y el potencial eléctrico superficial de membrana.

Por lo tanto, se evaluó la influencia del potencial transmembranal y el potencial superficial sobre la permeabilización de la BLP y de los liposomas, con algunos péptidos policatiónicos diseñados en nuestro laboratorio, los cuales ya habían sido estudiados con algunas biomembranas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Péptidos policatiónicos y su actividad biológica

Los microorganismos, animales, hongos y plantas poseen un sistema de defensa contra microorganismos patógenos llamado péptidos antimicrobianos (Zasloff 2002; Reddy et al. 2004; Jenssen et al. 2006; Sorensen et al. 2008). Los péptidos antimicrobianos en su mayoría son péptidos policatiónicos, los cuales son moléculas de cadena corta, entre 12 y 50 aminoácidos, y anfipáticos, es decir, poseen una parte hidrofílica y otra parte hidrofóbica (Morizane y Gallo 2012). La estructura de estos péptidos puede ser mixta, formada por hojas β y hélices α (Jenssen 2009) (Fig. 2.1).

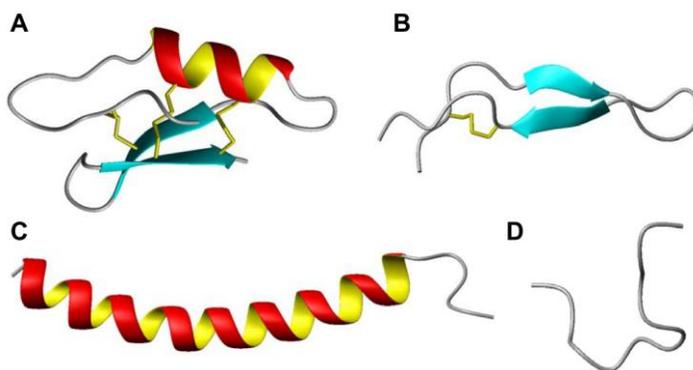


Fig. 2.1 Estructuras de péptidos antimicrobianos. (A) De estructura mixta de plectasina, una molécula tipo defensina; (B) estructura orquilla- β de la lactoferricina, (C) estructura hélice- α de la catelicidina, (D) estructura extendida de la indolicidina. Figura tomada de Jenssen (2009).

Los antibióticos tradicionales se han utilizado para provocar la muerte y evitar la proliferación celular de microorganismos patógenos, estos pueden actuar sobre algunas estructuras celulares y moleculares como pared celular, ARN, ADN, ribosomas, y enzimas de importancia vital para la célula (Jackson et al. 1998). Pero estas estructuras pueden mutar y las células pueden desarrollar resistencia ante los antibióticos, haciéndolos menos eficientes; por lo tanto, esto se traduce en un problema de salud considerable para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Jackson et al. 1998).

La bicapa lipídica de las biomembranas es una estructura no mutable (Peschel y Sahl 2006), y la evolución de la vida ha desarrollado los péptidos policatiónicos como antibióticos naturales, los cuales han mostrado ser específicos y eficientes para esta estructura celular. Por ello los péptidos policatiónicos se han convertido en drogas potenciales contra enfermedades infecciosas de origen microbiano (Epanand y Vogel 1999; Duclouhier 2002). Cuando los péptidos interactúan con la bicapa lipídica de las biomembranas, se orientan y sufren cambios estructurales mutuos con la membrana para formar poros de distinta configuración (Wang et al. 2012) (Fig. 2.2). En el modelo de poro barril (Fig. 2.2A), el péptido primero se pega a la superficie de la membrana lipídica con su eje longitudinal paralelo a la superficie, cuando la concentración local se incrementa, el péptido adopta una conformación más ordenada y cooperativamente se inserta en la membrana hasta formar un poro donde las regiones hidrofóbicas de los péptidos se orientan hacia el corazón hidrofóbico de la bicapa lipídica. En el modelo de poro toroidal (Fig. 2.2B), el péptido unido a la membrana se inserta dentro de la bicapa lipídica y fuerza continuamente a la monocapa lipídica externa para doblarse y luego fusionarse con la monocapa lipídica interna; como resultado, un poro transmembranal reversible se forma con la zona hidrofílica de los péptidos y las cabezas polares de los lípidos. En el modelo de alfombra (Fig. 2.2C), el péptido permeabiliza la membrana a través de un mecanismo sin-poro. El péptido se acumula en la monocapa lipídica externa de la bicapa lipídica induciendo la expansión de la monocapa externa y provocando luego un estiramiento entre las dos monocapas hasta colapsar la membrana. En el modelo detergente (Fig. 2.2D), los péptidos interactúan con la bicapa lipídica y remueven lípidos para formar micelas solubles en medio acuoso, lo cual colapsa catastróficamente a la membrana. En el modelo clústeres lipídicos (Fig. 2.2E), péptidos catiónicos unidos a la membrana se pueden agrupar con los lípidos aniónicos presentes allí, la interacción péptido-lípido puede cambiar el empaquetamiento lateral de los lípidos e incrementar la permeabilidad a través de la membrana.

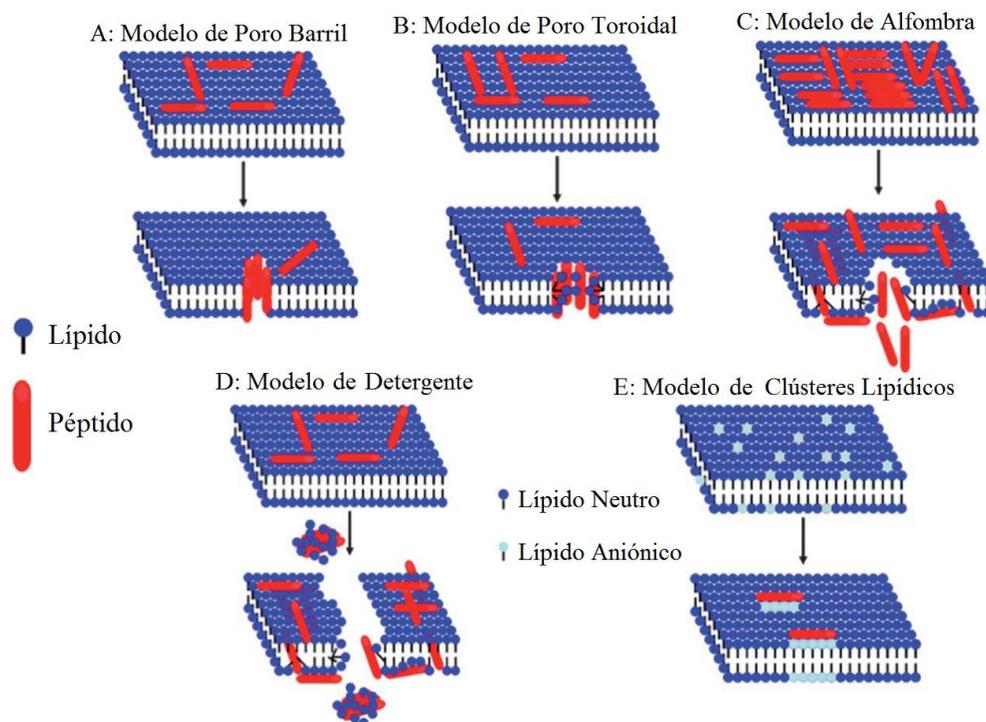


Fig. 2.2 Modelos de permeabilización de membrana. (A) Modelo de poro barril: los péptidos se insertan en la membrana y cooperativamente forman un poro cuyas zonas hidrofóbicas se orientan hacia el corazón hidrofóbico de la membrana. (B) Modelo de poro toroidal: los péptidos se insertan en la membrana y forman un canal junto con las cabezas de los lípidos de la membrana. (C) Modelo de alfombra: los péptidos unidos a la membrana se acumulan y provocan un estiramiento de las monocapas lipídicas hasta colapsar la membrana. (D) Modelo de detergente: los péptidos interactúan con la membrana arrancando lípidos para formar micelas solubles en medio acuoso. (E) Modelo de clústeres lipídicos: los péptidos catiónicos interactúan con los lípidos aniónicos de la membrana disminuyendo el empaquetamiento de los lípidos y aumentando la permeabilidad en la membrana. Figura modificada y traducida de Wang et al. 2012.

La investigación de los péptidos policationicos no sólo se ha enfocado para tratar enfermedades infecciosas de origen microbiano, adicionalmente existe el interés para el tratamiento contra otras células como las del cáncer (Mader y Hoskin 2006; Schweizer 2009; Gaspar et al. 2013).

2.2 Membranas lipídicas artificiales como modelos de membrana para la investigación de la actividad ionofórica de los péptidos policationicos

Las membranas biológicas son estructuras importantes para la compartimentalización de las células, están constituidas por la bicapa lipídica, proteínas periféricas, proteínas integrales y

glúcidos. La bicapa lipídica es la estructura soporte de las membranas biológicas; formada básicamente por fosfolípidos, lípidos cuya estructura es anfipática, tienen una cabeza polar y 2 cadenas hidrofóbicas de ácidos grasos (Fig. 2.3). Desde una solución de fosfolípidos se pueden formar membranas artificiales como liposomas, BLP y películas de Langmuir-Blodgett.

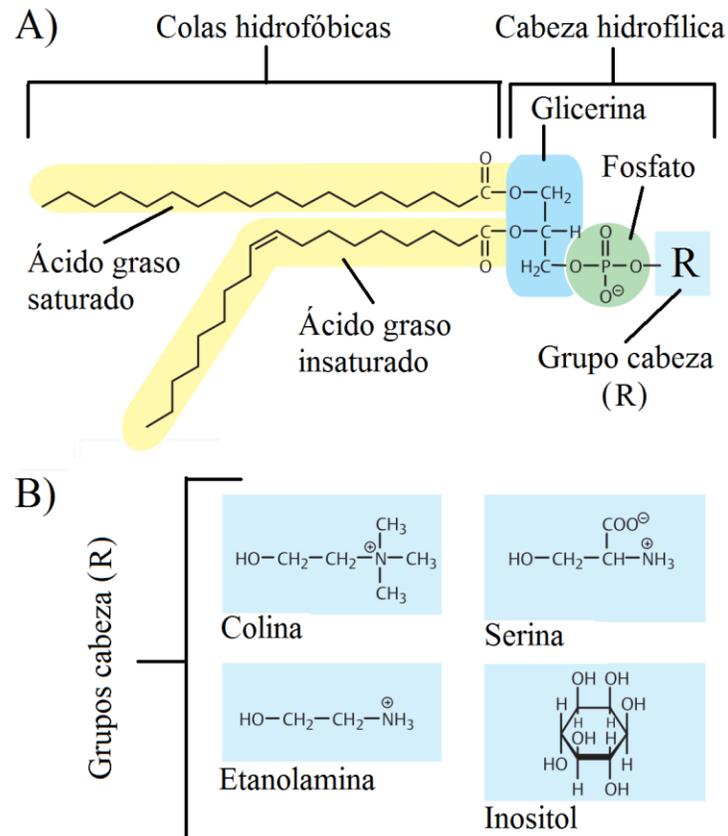


Fig. 2.3 Estructura de los fosfolípidos. A) Estructura básica de un fosfolípido, que consiste en una cabeza polar compuesta por glicerina, fosfato y un grupo cabeza (R); y de colas hidrofóbicas que son dos cadenas de ácidos grasos los cuales pueden ser saturados e insaturados. B) El grupo cabeza (R) puede ser diferente (colina, serina, etanolamina o inositol) y ser neutro o cargado eléctricamente según el pH. Figura tomada y modificada desde Koolman y Roehm (2005).

Los fosfolípidos pueden ser de diferente clase según la estructura de su cabeza polar, o la longitud y grado de saturación de los ácidos grasos en las colas hidrofóbicas. Según la cabeza polar tenemos los lípidos de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol (Koolman y Roehm 2005). El colesterol, aunque no es un fosfolípido,

puede ser parte de la bicapa lipídica y afectar su microfluidez (Cooper 1978). Se les han asignado formas geométricas a los fosfolípidos (Fig. 2.4) para poder explicar las estructuras más probables formadas con estas moléculas tales como micelas invertidas, micelas no-invertidas y bicapa lipídica. La longitud y grado de saturación de los ácidos grasos en los fosfolípidos es importante porque afecta la permeabilidad, estabilidad y fluidez de la membrana lipídica (Morizane y Gallo 2012).

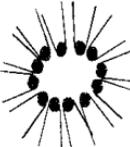
<u>Fosfolípido</u>	<u>Forma molecular</u>	<u>Organización</u>
Fosfatidilcolina		 Laminar (L)
Lisofosfatidilcolina		 Hexagonal (H_I)
Fosfatidiletanolamina		 Hexagonal (H_{II})

Fig. 2.4 Formas de lípidos y organización supramolecular (polimorfismo). La forma lipídica es un concepto muy conveniente, frecuentemente utilizado para describir el volumen ocupado por los fosfolípidos. Usando esta aproximación, los lípidos pueden ser clasificados como cilindros (por ejemplo, fosfatidilcolina), conos (por ejemplo, fosfatidiletanolamina) y conos invertidos (por ejemplo, lisofosfatidilcolina), dependiendo de los volúmenes relativos de sus cabezas polares y cadenas de ácidos grasos. La organización supramolecular, o empaquetamiento, de tales moléculas origina una bicapa amplia (o laminar, L), y fases (micelas tubulares) H_I y H_{II} no-laminares. Tomado de Escribá et al. (1997).

Para estudiar la permeabilización de membranas con péptidos policationicos se han desarrollado técnicas para formar membranas artificiales tales como liposomas y BLP, los cuales son modelos simplificados de las membranas biológicas (Gallucci et al. 2003; Duclohier 2006; Stoilova et al. 2007).

2.2.1 Bicapa lipídica plana (BLP)

La técnica de BLP es una técnica fisiológica que permite estudiar la actividad de canales iónicos, porinas y otros complejos moleculares que formen poro (Hanke y Schlue 1993). El propósito principal de este método es monitorear el comportamiento de un poro en una membrana artificial, la BLP (Zakharian 2013). La Fig. 2.5 muestra un esquema de los principios de esta técnica.

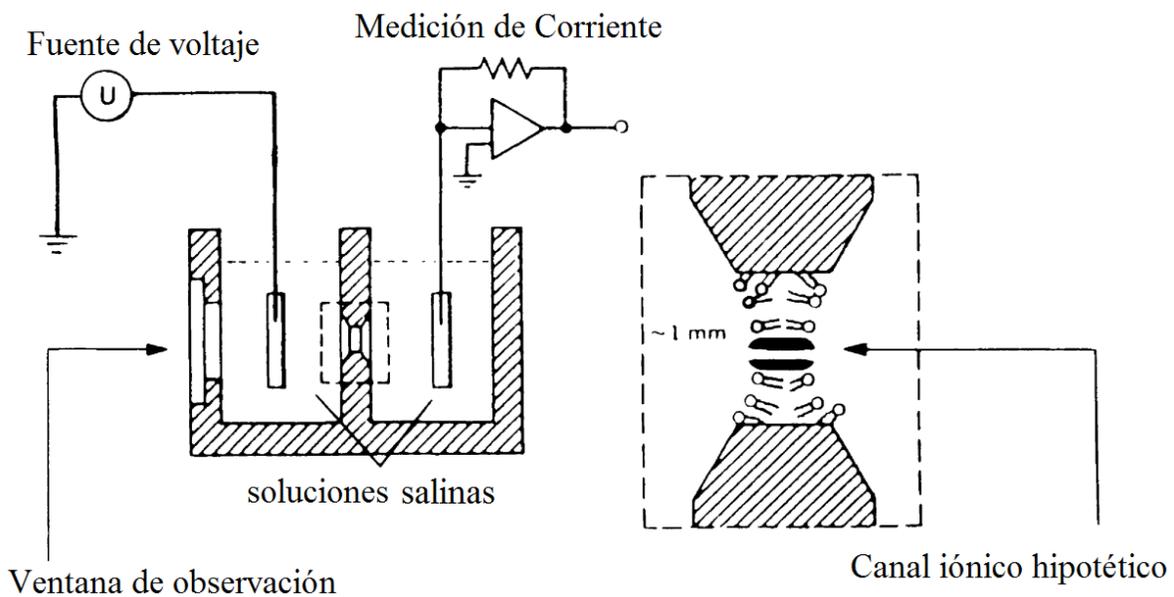


Fig. 2.5 Principios de la técnica de bicapa lipídica plana (BLP). Una membrana artificial es construida sobre una apertura en una partición que separa dos compartimientos con soluciones salinas de igual concentración. Se muestra el circuito básico para medir el flujo de corriente a través del canal iónico hipotético. Básicamente se insertan dos electrodos a las soluciones salinas para aplicar voltaje y registrar la corriente eléctrica a través de la membrana simultáneamente. Figura tomada y traducida de Hanke y Schlue (1993).

Es posible evaluar la actividad permeabilizadora potencial-dependiente de un péptido policatiónico usando la BLP. Para ello es necesario producir el potencial transmembranal en la bicapa utilizando un par de electrodos, sumergidos en las soluciones salinas, los cuales tienen conexión con una fuente de voltaje que permite ajustar la polaridad e intensidad del potencial eléctrico (Fig. 2.5). El péptido se adiciona en uno de los compartimientos con solución salina; se espera que la permeabilización de la bicapa se incremente cuando la polaridad del potencial eléctrico en el compartimiento opuesto sea de

polaridad negativa (lo cual es favorable para atraer moléculas cargadas positivamente, como péptidos policatiónicos, hacia la bicapa). Cuando la polaridad en el compartimento opuesto es positiva se espera que la corriente disminuya, desaparezca o se mantenga en un valor fijo en el tiempo. Es por ello que durante los experimentos con BLP se puede variar periódicamente la polaridad del potencial transmembranal para observar el efecto de permeabilización potencial-dependiente. La permeabilización de la bicapa se registra con la corriente eléctrica que pasa a través de esta, para ello uno de los electrodos tiene conexión con un medidor de corriente que es un circuito de transimpedancia (Fig. 2.5).

2.2.2 Liposomas

Los liposomas son vesículas de membranas, constituidas sólo de fosfolípidos y se pueden clasificar según su tamaño. Existen liposomas pequeños o SUV (small unilamellar vesicles), liposomas grandes o LUV (large unilamellar vesicles) y liposomas gigantes o GUV (giant unilamellar vesicles) (Fig. 2.6).

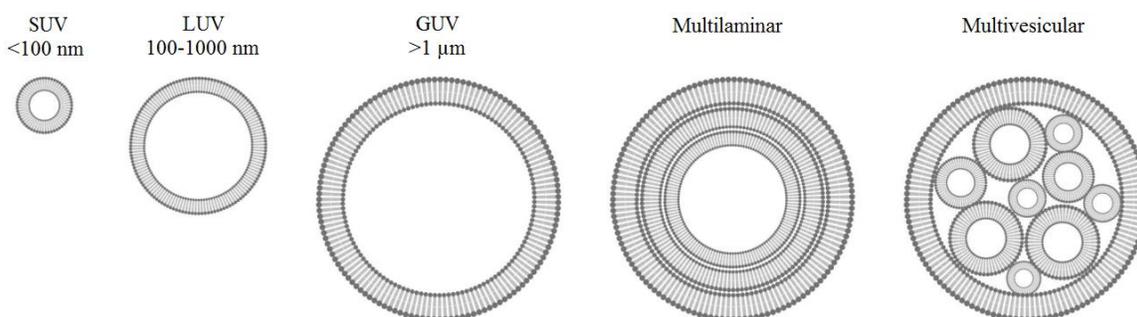


Fig. 2.6 Clasificación de vesículas de membrana según su tamaño y laminaridad. Liposomas pequeños o SUV (small unilamellar vesicles) los cuales tienen un diámetro menor de 100 nm; liposomas grandes o LUV (large unilamellar vesicles) que son de 100 a 1000 nm; y liposomas gigantes o GUV que son de diámetro mayor a una micra. Las vesículas multilaminares tienen muchas capas de membrana, y las vesículas multivesiculares encapsulan vesículas más pequeñas. Figura tomada y traducida de van Swaay y deMello (2013).

Los liposomas LUV o SUV se obtienen mediante preparaciones diferentes. La Fig. 2.7 ilustra los pasos para lograr los liposomas desde una suspensión de lípidos en medio orgánico.

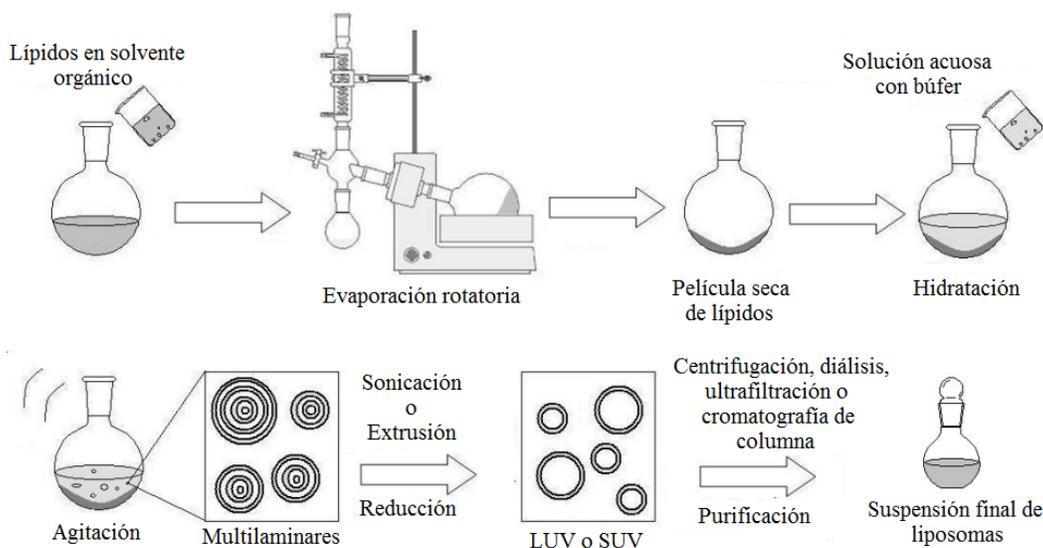


Fig. 2.7 Etapas para la producción de liposomas LUV o SUV. Figura tomada y traducida desde de Araújo Lopes et al. (2013).

Desde vesículas multilaminares los liposomas LUV y SUV se obtienen por extrusión y sonicación (aplicación de ultrasonido), respectivamente; si es necesario, se puede hacer una purificación de los liposomas para eliminar residuos indeseados (Fig. 2.7).

2.3 Generación de potencial eléctrico transmembranal en liposomas

El potencial eléctrico transmembranal, o simplemente potencial transmembranal ($\Delta\psi$), es la diferencia de potencial eléctrico entre dos medios separados por una membrana. Para el caso de BLP, este potencial se genera aplicando un voltaje a través de la bicapa utilizando electrodos (Fig. 2.5); pero para el caso de liposomas, el $\Delta\psi$ se genera utilizando el ionóforo valinomicina y un gradiente de concentración de K^+ a través de la membrana (Fig. 2.8). Inicialmente la membrana del liposoma impide la difusión del K^+ a través de esta; al adicionar valinomicina (V) se produce una difusión de cationes K^+ desde el medio acuoso interno (i , con alta concentración de K^+) hacia el medio acuoso externo (o , con baja concentración de K^+) lo cual produce una diferencia de cargas que se traduce en la generación de $\Delta\psi$ el cual se equilibra (se iguala) con el potencial de difusión de K^+ frenando finalmente la difusión de K^+ a través de la membrana (estado estacionario).

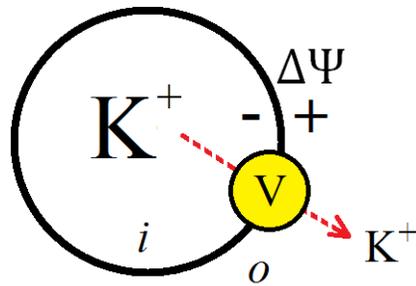


Fig. 2.8 Mecanismo para generar potencial transmembranal en liposomas. Se aprovecha un gradiente de concentración de K^+ y se utiliza el ionóforo valinomicina (V) para facilitar la difusión de K^+ desde el medio de mayor concentración (i) hacia el medio de menor concentración (o). El potencial de difusión de K^+ se equilibra con el potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) generado y por lo tanto el flujo de K^+ se detiene.

El $\Delta\Psi$ en liposomas se puede estimar según la relación nernstiana:

$$\Delta\Psi = -\frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_i}{[K^+]_o}, \quad (2.1)$$

donde R es la constante universal de los gases, F la constante de Faraday y T la temperatura absoluta. $[K^+]_i$ y $[K^+]_o$ son las concentraciones de K^+ dentro y fuera del liposoma, respectivamente.

Para un $\Delta\Psi$ con potencial eléctrico negativo dentro del liposoma, se favorecería la permeabilización de la membrana con péptido policationico. Los cambios de potencial transmembranal, provocados por la permeabilización de membrana con péptido, pueden ser monitoreados usando una sonda fluorescente como DiSC₃(5) (Sims et al. 1974).

2.4 Potencial eléctrico superficial

Un factor que afecta la interacción péptido-membrana es el potencial eléctrico superficial (o simplemente potencial superficial) de la membrana, el cual depende de la carga eléctrica superficial de la membrana y de la fuerza iónica del medio de incubación (Lemeshko 2013). Según la teoría de la doble capa eléctrica, el potencial superficial surge por la adsorción o presencia de especies cargadas sobre la superficie de la membrana la cual afecta la adsorción de otras especies con carga presentes en el medio acuoso por interacciones electrostáticas (Fig. 2.9).

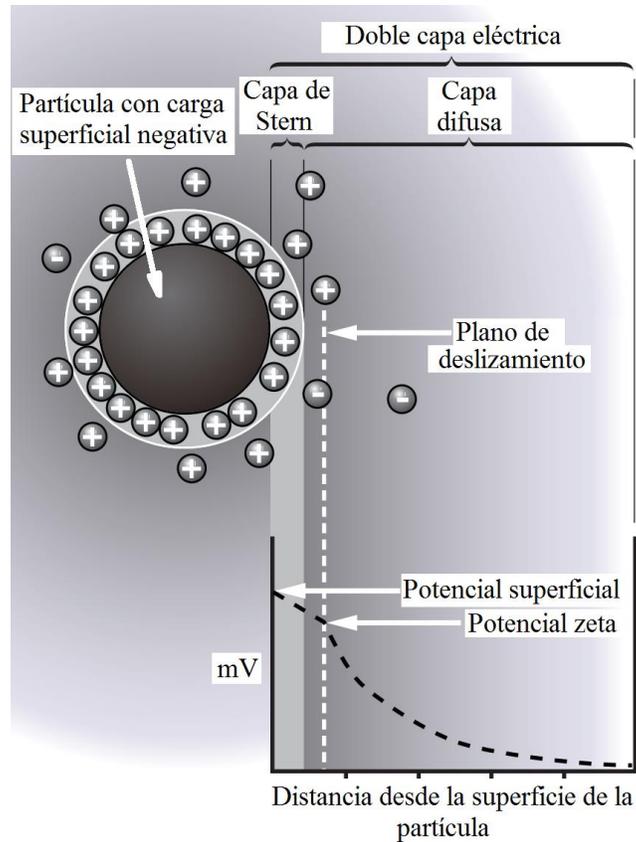


Fig. 2.9 Representación esquemática de la doble capa eléctrica que rodea una partícula en medio acuoso. La carga neta de la partícula en la superficie, que le provee un potencial superficial, afecta la distribución de iones alrededor de la región interfaz, provocando un incremento en la concentración de contra-iones (iones de carga opuesta a la partícula) cerca de la superficie. La capa líquida alrededor de la partícula existe en dos partes; una región interna, llamada la capa de Stern donde los iones están unidos fuertemente a la partícula; y otra externa difusa, donde los iones están interactuando electrostáticamente de una manera más débil con la partícula. Cuando la partícula se mueve (por ejemplo, por la gravedad), los iones que la acompañan se encuentran hasta un plano de deslizamiento que coincide con la posición donde se manifiesta el potencial zeta. Tomado y traducido de Malvern (2013).

Sabiendo la densidad de carga eléctrica superficial en la membrana (σ), por la presencia de lípidos cargados u otras moléculas cargadas adsorbidas en la membrana, es posible determinar el potencial eléctrico superficial (ϕ) usando la ecuación de Grahame:

$$\sigma = \pm \sqrt{2\varepsilon RT \sum_i C_i \left[e^{-\frac{Z_i F}{RT} \phi} - 1 \right]}, \quad (2.2)$$

donde C_i es la concentración del ión “ i ”, de valencia Z_i , en el medio de incubación; ε la permitividad dieléctrica del agua y R , T y F fueron definidos antes para la ecuación (2.1).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar la capacidad de algunos péptidos policatiónicos, previamente diseñados en el Laboratorio de Biofísica, para permeabilizar membranas lipídicas artificiales, tales como liposomas y bicapa lipídica plana.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Implementar la técnica de bicapa lipídica plana.

3.2.2 Desarrollar una técnica de perforación de láminas de Teflón que permita montar la bicapa lipídica plana.

3.2.3 Evaluar la permeabilización de la bicapa lipídica plana con algunos péptidos policatiónicos.

3.2.4 Determinar, por medio de un modelo computacional, las condiciones experimentales más adecuadas para monitorear cambios del potencial transmembranal en liposomas con la sonda de fluorescencia catiónica DiSC₃(5).

3.2.5 Estudiar la permeabilización de liposomas con péptidos policatiónicos.

3.2.6 Evaluar el efecto de cambios del potencial superficial de membrana sobre la permeabilización de bicapa lipídica plana y liposomas con péptidos policatiónicos.

4. MÉTODO Y APARATO PARA LA PERFORACIÓN ELÉCTRICA DE LÁMINAS DE TEFLÓN PARA EXPERIMENTOS CON BICAPA LIPÍDICA PLANA

4.1 Resumen

La bicapa lipídica plana es una membrana lipídica artificial útil para evaluar la actividad permeabilizadora de agentes biológicamente activos como péptidos policatiónicos. La bicapa lipídica plana se forma en una perforación de una lámina de Teflón que separa dos compartimientos con medios acuosos en los cuales se ubican electrodos para aplicar voltaje y medir la corriente eléctrica a través de la bicapa. Una de las principales dificultades de trabajar con bicapa lipídica plana es su estabilidad, sobre todo cuando están presentes péptidos policatiónicos y un voltaje aplicado a través de la bicapa. La estabilidad de la bicapa depende de la calidad de los bordes de la perforación. Los bordes de las perforaciones pueden tener fisuras si se forman por medio de perforación mecánica, o quemaduras si se forman con descargas eléctricas, lo cual no es conveniente para la estabilidad de la bicapa. Presentamos un método novedoso de perforación eléctrica el cual utiliza un sistema formado por dos electrodos, uno metálico y el otro líquido, que permite formar perforaciones de bordes finos y uniformes sin quemaduras. Además, se construyó un aparato que permite programar la frecuencia y el número de descargas eléctricas para formar perforaciones de diferente tamaño. Con el electrodo-líquido también fue posible fijar sustancias en los bordes de la perforación. El aparato y nuestro método novedoso de perforación eléctrica, con electrodo-líquido, pueden ser utilizados para la perforación de otras láminas orgánicas. Esto nos permitió presentar la solicitud de patente ante la Superintendencia de Industria y Comercio (número de radicado 13-016117, gaceta 701) y a nivel internacional (PCT con número de publicación internacional WO 2014/118698).

4.2 Introducción

La técnica de bicapa lipídica plana (BLP) es una técnica que permite evaluar la permeabilización de la membrana lipídica con moléculas como péptidos policatiónicos (Hanke y Shulue 1993). La bicapa lipídica plana se forma dentro de una perforación de una lámina de Teflón la cual separa dos compartimientos con solución acuosa donde se sumergen electrodos que permiten aplicar voltaje y medir la corriente eléctrica a través de la BLP simultáneamente (Hanke y Shulue 1993).

La estabilidad de la BLP es un problema que se debe superar durante los experimentos y depende de la calidad del borde de la perforación donde se forma dicha membrana (White 1972). La perforación mecánica de láminas de Teflón tiene la desventaja de formar fisuras en los bordes de la perforación (Chanturiya 2013) y la perforación eléctrica, usando sólo electrodos metálicos, deja perforaciones con bordes quemados (Hanke and Shulue 1993).

En este trabajo se desarrolló una técnica de perforación eléctrica con un electrodo novedoso basado en líquido (electrodo-líquido) que mantiene contacto con la lámina orgánica a perforar, sirviéndole de soporte y a la vez como refrigerante que reduce la quemadura en los bordes de las perforaciones durante las descargas eléctricas. El líquido puede ser electrolito y se puede mezclar con pinturas, tintes o colorantes los cuales se fijan en los bordes de la perforación después de las descargas eléctricas. Se construyó un equipo que permite controlar el tamaño de las perforaciones programando el número y frecuencia de las descargas eléctricas.

El propósito de la técnica desarrollada aquí fue mostrar las ventajas de nuestro método de perforación eléctrica y del electrodo-líquido, y su utilidad para experimentos con bicapa lipídica plana.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Construcción de un sistema de perforación eléctrica

Un esquema del aparato de perforación eléctrica que se construyó se muestra en la Fig. 4.1. Se presentan dos configuraciones de electrodos, uno metal-metal (Fig. 4.1A) y otro metal-líquido (Fig. 4.1B). Para generar pulsos eléctricos de alto voltaje, y por lo tanto las descargas eléctricas, se utilizó un transformador elevador de voltaje conectado a un circuito de conmutación cuyo interruptor fue un MOSFET controlado electrónicamente con un generador de pulsos cuadrados.

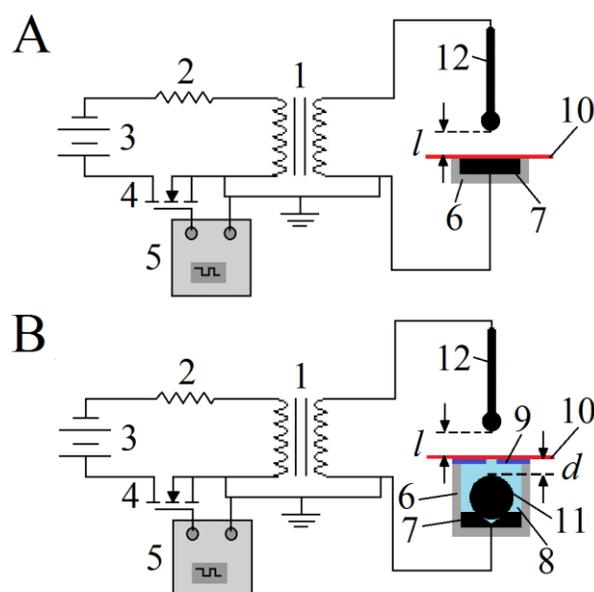


Fig. 4.1 Esquemas del aparato de perforación eléctrica construido en nuestro Laboratorio. Se muestra la configuración de electrodos metal-metal (A) donde la lámina orgánica tiene contacto directo con la parte metálica de uno de los electrodos, o la configuración metal-líquido (B) donde la lámina orgánica tiene contacto directo con el líquido. El aparato de perforación eléctrica consiste de un transformador elevador de voltaje (1) conectado a un circuito de conmutación formado por un resistor (2) que limita la corriente eléctrica a través del circuito, una fuente de voltaje DC (3), un MOSFET (4) controlado por un generador de pulsos cuadrados (5). Para la configuración de electrodos metal-líquido, el “electrodo inferior” posee una cubeta (6) que soporta una parte metálica (7) en su fondo. La cubeta puede contener líquido (8) que puede ser electrolito (configuración metal-electrolito) o agua destilada (configuración metal-agua) o no contener líquido (sólo aire, configuración metal-aire). En la parte superior de la cubeta (6) está una pieza de vidrio (9) que soporta la lámina orgánica (10), ésta última se separa una distancia d (0.5 a 1.0 mm) desde un balín (11), y una distancia l por debajo del “electrodo superior” metálico que es de forma de barra con un balín soldado en su extremo (12).

Para nuestros experimentos se utilizó como transformador elevador de voltaje la bobina de encendido para carro Motorcraft de la marca Ford modelo DG-314. Los detalles del circuito de conmutación conectado a la bobina primaria del transformador elevador de voltaje se muestran en la Fig. 4.2. La resistencia en serie que limitó la corriente eléctrica hasta 2.0A en el circuito de conmutación fue de 2.2 Ohms (resistor más cercano al único capacitor de 4700 μF , ver Fig. 4.2). La fuente de voltaje en el circuito de conmutación fue de 24 VDC.

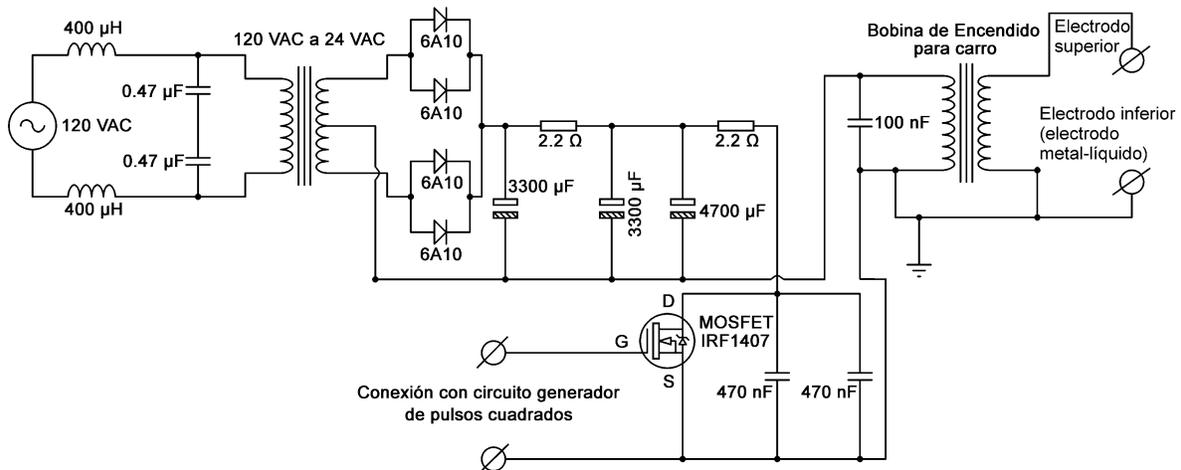


Fig. 4.2 Circuito de conmutación del aparato de perforación eléctrica. Se muestra conexión con el transformador elevador de voltaje (30 kV) desde la bobina primaria. Los detalles del generador de pulsos cuadrados se muestran en la Fig. 4.3.

La apertura y cierre del interruptor electrónico (MOSFET) se controló electrónicamente usando el circuito generador de pulsos (Fig. 4.3) cuyo “corazón” es el microcontrolador PIC16F877, el cual fue programado en lenguaje BASIC (ver apéndice A.1).

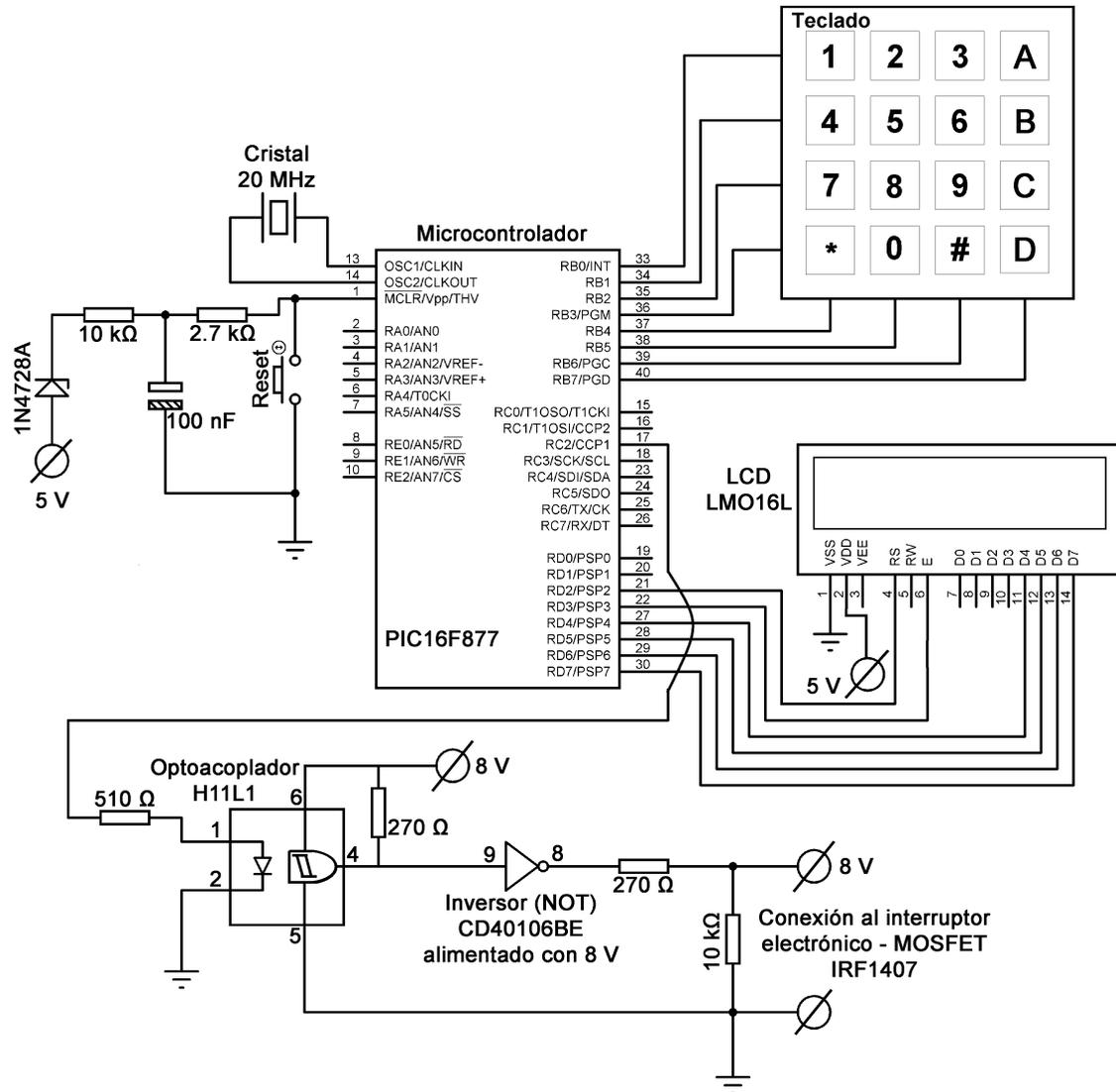


Fig. 4.3 Circuito del generador de pulsos cuadrado programable. El circuito genera pulsos cuadrado de 5 V desde el microcontrolador PIC16F877 (en el pin 17) que luego llegan al optoacoplador H11L1 con salida hacia al inversor CD40106BE, ambos alimentados con 8 V, esto se hace para proteger al generador de pulsos de las descargas eléctricas que ocurren en el transformador elevador de voltaje conectado al circuito de conmutación (ver Fig. 4.3). Después del inversor se obtienen pulsos cuadrado de 8 V que controlan al MOSFET del circuito de conmutación (Fig. 4.3). El circuito generador de pulsos permite programar número de pulsos, ancho del pulso y distancia entre pulsos desde el teclado. La programación del microcontrolador PIC16F877 se muestra en el apéndice A.1.

El circuito de conmutación tuvo su propia fuente de 24 V (ver Fig. 4.2), fuentes adicionales se construyeron para alimentar al generador de pulsos con 5 V, al optoacoplador y al ventilador del equipo con 8 V (ver Fig. 4.4).

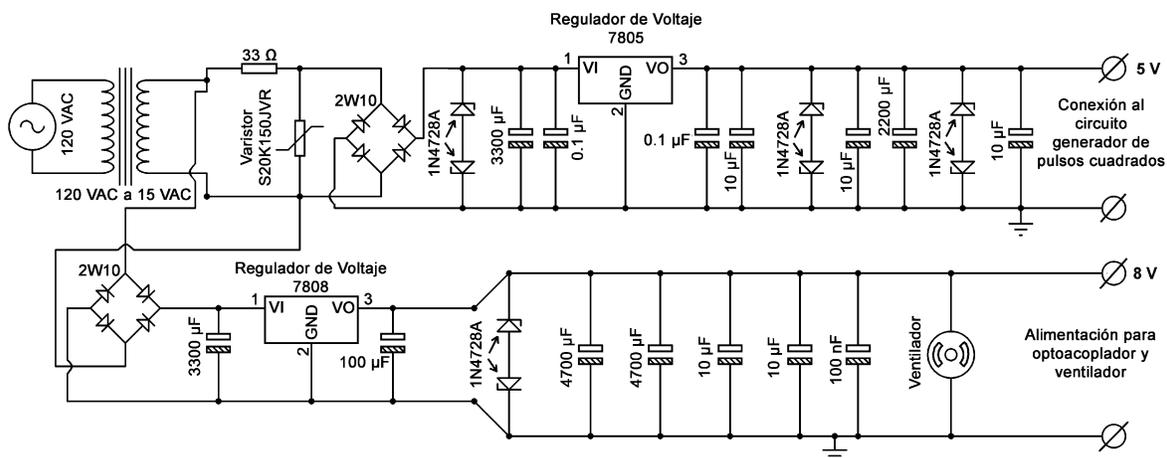


Fig. 4.4 Circuitos de otras fuentes de voltaje. Para el circuito generador de pulsos programable se utilizó la fuente de 5 V y para el optoacoplador y ventilador la fuente de 8 V.

Haber separado las fuentes de voltaje en cada uno de los circuitos utilizados en el aparato de perforación eléctrica permitió que el generador de pulsos cuadrados programable no se reseteara durante las descargas eléctricas.

4.3.2 Perforación eléctrica de láminas orgánicas

Para indicar la zona de perforación en la lámina orgánica fue necesario aplicar una ligera punción sobre esta para facilitar el inicio de la perforación eléctrica. Se realizaron algunas perforaciones en láminas de Teflón y polietileno de 50 μm de espesor, y vinilo de 75 μm de espesor. En el aparato de perforación eléctrica se varió el número de pulsos que equivale al número de descargas eléctricas, también se varió la frecuencia de emisión de las descargas eléctricas. Para la configuración de electrodos metal-líquido (Fig. 4.1B) también se varió la salinidad del líquido; en algunos casos se utilizó como líquido, pintura y solventes orgánicos para mostrar la fijación de sustancias en el borde de la perforación formada.

4.4 Resultados

La Fig. 4.5 muestra una fotografía del aparato que fue construido para la perforación eléctrica de láminas orgánicas (Fig. 4.5A) y se ilustra como ejemplo la configuración de

electrodos metal-líquido (Fig. 4.5B). Un breve manual de operación del equipo generador de pulsos programable se encuentra en el apéndice A.2 de esta tesis.

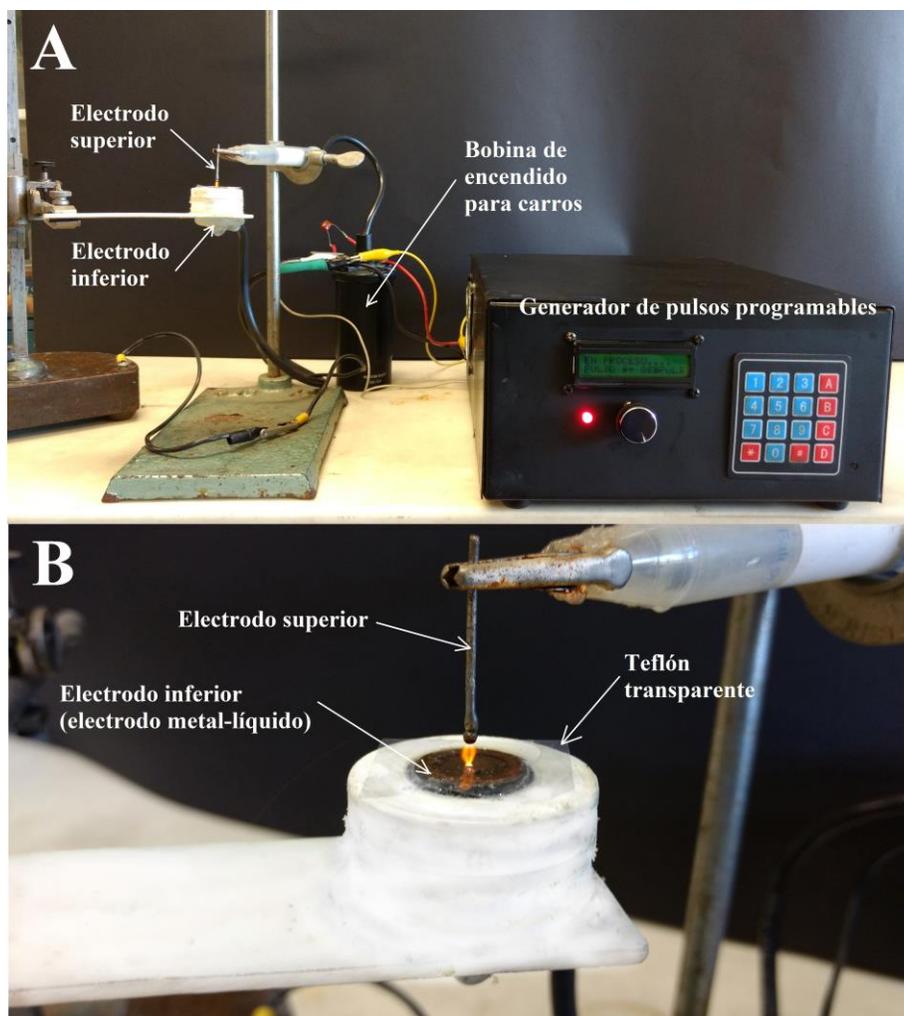


Fig. 4.5 Sistema de perforación eléctrica de láminas orgánicas desarrollado en el Laboratorio. (A) Aparato de perforación eléctrica; y (B) configuración de electrodos metal-líquido.

La forma de las descargas dependió de la presencia o ausencia de la lámina a perforar. La Fig. 4.6 muestra algunas fotografías de las descargas eléctricas obtenidas a las frecuencias de 20 y 100 Hz usando la configuración de electrodos metal-líquido (Fig. 4.1B). Las descargas eléctricas se fotografiaron sin lámina orgánica (Fig. 4.6A) y con lámina orgánica (Fig. 4.6B).

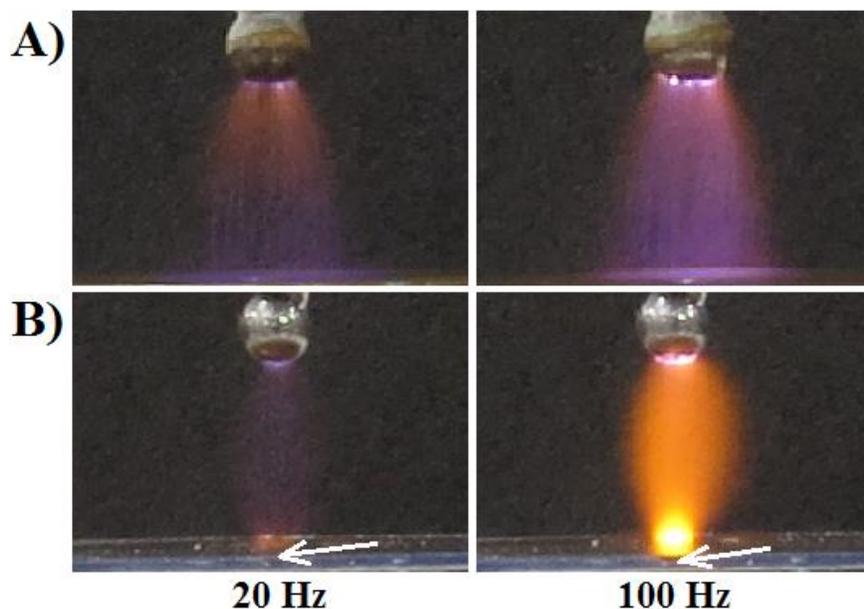


Fig. 4.6 Forma de las descargas eléctricas en presencia y ausencia de una lámina orgánica. A) Formas de las descargas eléctricas en ausencia de lámina orgánica. B) Formas de las descargas eléctricas en presencia de lámina orgánica, la flecha indica el punto donde se forma la perforación en la lámina orgánica. Se utilizó la configuración de electrodos metal-líquido, donde el líquido fue el electrolito 0.1 M NaCl.

Para mostrar la dependencia del tamaño de las perforaciones formadas en láminas orgánicas según la frecuencia y número de descargas, se realizaron algunas pruebas en dos tipos de lámina de Teflón, blanco y transparente, utilizando la configuración de electrodos metal-metal (Fig. 4.1A). Los resultados en la Fig. 4.7 muestran que el tamaño de las perforaciones formadas fue proporcional al número y a la frecuencia de las descargas eléctricas. Los efectos en los dos tipos de Teflón fueron similares, la aplicación de 2000 pulsos generó quemaduras en los bordes de las perforaciones en ambos tipos de Teflón.

La relación proporcional entre el tamaño de la perforación y el número de pulsos (o número de descargas eléctricas) también se muestra en la Fig. 4.8 para Teflón transparente (50 μm de espesor), polietileno (50 μm de espesor) y vinilo (75 μm de espesor). Se usaron diferentes configuraciones de electrodos: metal-aire (ver Fig. 4.1B, cubeta 6 sin líquido), metal-metal (Fig. 4.1A), metal-electrolito (ver Fig. 4.1B, el líquido 8 es 0.1 M NaCl) y metal-agua (ver Fig. 4.1B, el líquido 8 es agua destilada). Para Teflón transparente y vinilo la configuración de electrodos que ofreció mayor tamaño en las perforaciones fue la de

metal-metal, luego en el orden fue metal-aire, metal-electrolito y metal-agua; para el caso de polietileno el orden fue metal-aire, metal-metal, metal-electrolito y metal-agua.

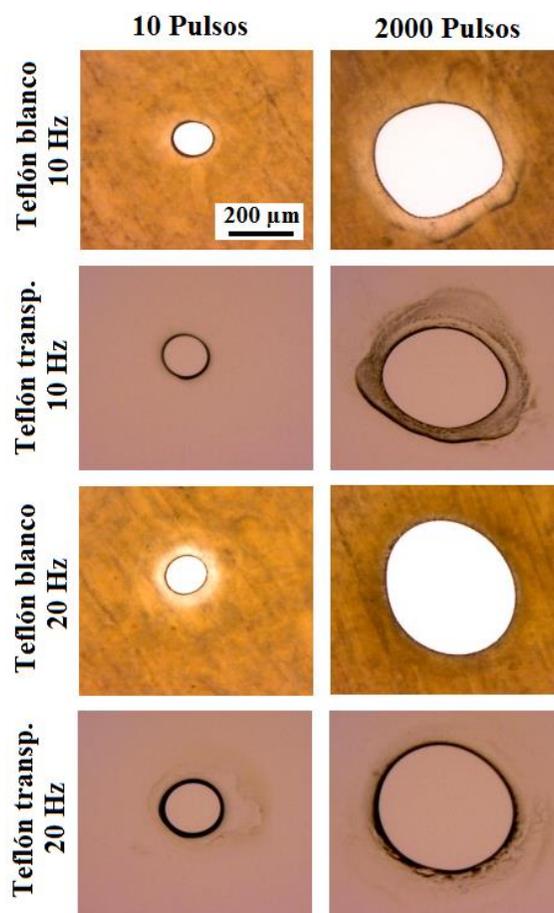


Fig. 4.7 Perforaciones formadas en láminas de Teflón blanco y transparente utilizando la configuración de electrodos metal-metal. Las frecuencias de descarga eléctrica fueron de 10 y 20 Hz, aplicando 10 o 2000 pulsos. La distancia entre el electrodo superior y la lámina orgánica fue de 3 mm. El espesor de las láminas de Teflón fue de 50 μm .

La Fig. 4.9 muestra algunas perforaciones logradas con las láminas orgánicas y las configuraciones de electrodos que fueron ya descritas en la Fig. 4-8. Con la configuración de electrodos metal-metal y metal-aire se generan perforaciones irregulares y de bordes quemados notablemente con láminas de polietileno y vinilo. Con la configuración metal-electrolito o metal-agua, dichas irregularidades y deformaciones se reducen o desaparecen en algunos casos (Fig. 4.9).

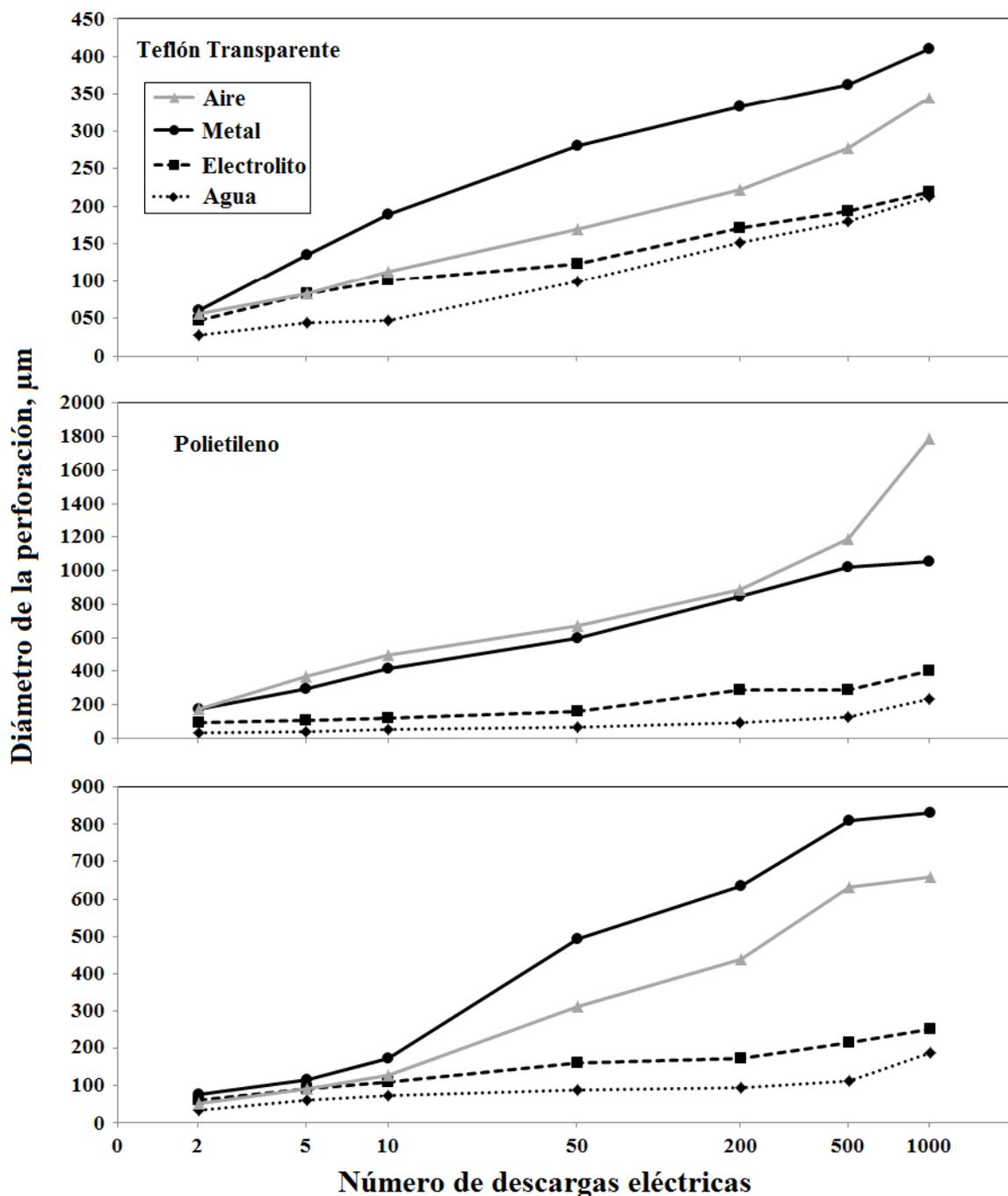


Fig. 4.8 Correlación entre el tamaño de las perforaciones y el número de descargas eléctricas aplicadas sobre algunas láminas orgánicas. Las perforaciones se formaron sobre láminas de Teflón transparente (50 μm de espesor), polietileno (50 μm de espesor) y vinilo (75 μm de espesor) usando configuraciones diferentes de electrodos metal-aire, metal-metal, metal-electrolito (0.1 M NaCl), y metal-agua (agua destilada) (ver texto). La frecuencia de descarga fue de 20 Hz. La distancia entre el electrodo superior y la lámina orgánica fue igual a 3 mm.

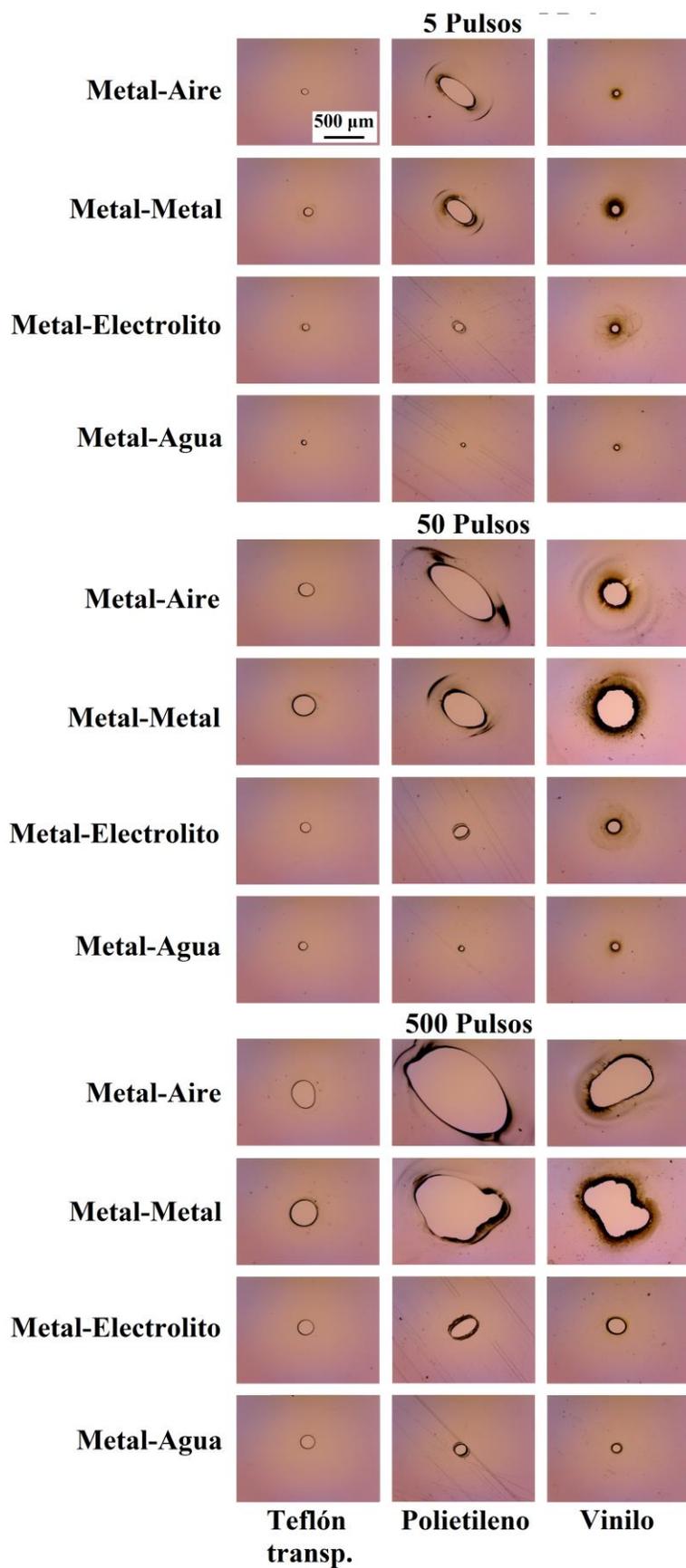


Fig. 4.9 Perforaciones en Teflón transparente, polietileno y vinilo que fueron hechas usando las configuraciones de electrodos metal-metal, metal-aire, metal-electrolito y metal-agua a diferentes números de pulsos. La frecuencia de las descargas eléctricas fue igual 20 Hz.

El tamaño de la perforación fue proporcional a la frecuencia de las descargas eléctricas. La Fig. 4.10 muestra algunos ejemplos de perforaciones formadas en láminas de Teflón transparente (espesor 50 μm) que se obtuvieron a diferentes frecuencias y número de descargas (o número de pulsos), usando la configuración de electrodos metal-agua (ver Fig. 4.1B, el líquido 8 es agua destilada). En cualquier caso de número fijo de pulsos, el tamaño de la perforación en Teflón transparente fue proporcional a la frecuencia.

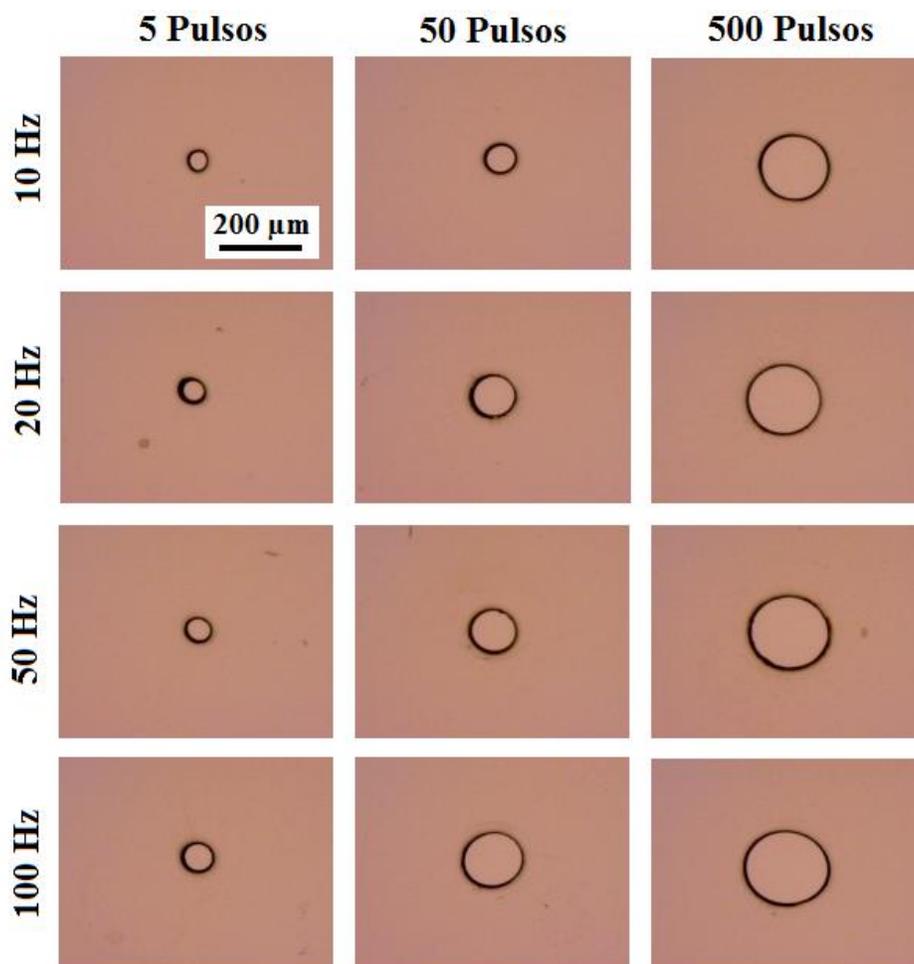


Fig. 4.10 Variación del tamaño de las perforaciones según la frecuencia de las descargas eléctricas. Se utilizó la configuración de electrodos metal-líquido; el líquido fue agua destilada y la distancia entre el electrodo superior y la lámina orgánica fue 3 mm. La dependencia del tamaño de las perforaciones con la frecuencia se evaluó a diferente número de descargas eléctricas o de pulsos.

Para mostrar ventajas de la configuración de electrodos metal-líquido, adicionales a la reducción de quemadura en los bordes de las perforaciones, se disolvieron algunas

sustancias en 0.1 M NaCl que luego se fijaron en los bordes de dichas perforaciones. La Fig. 4.11 muestra algunas perforaciones en Teflón transparente donde se fijaron algunas sustancias en sus bordes, tales como glicerol, PEG400 (polietilenglicol-400) y pintura luminiscente después de aplicar descargas eléctricas en Teflón transparente, polietileno y vinilo. El líquido que sirvió como control fue electrolito 0.1 M NaCl. Para el caso con glicerol (10% glicerol en 0.1 M NaCl), la fijación no es notable después de 50 o 1000 descargas. Para el caso con PEG400 (10% PEG400 en 0.1 M NaCl) existe una fijación notable de esta sustancia en las tres láminas orgánicas, especialmente en vinilo y polietileno. Para mostrar si la fijación de sustancias en los bordes era proporcional al número de descargas eléctricas, de una manera más visible, se realizaron pruebas con pintura luminiscente (1% pintura luminiscente en 0.1 M NaCl); tanto el tamaño como la fijación de pintura (aumento de luminiscencia) aumentaron con el número de pulsos (Fig 4.11).

De acuerdo a la configuración de electrodos metal-líquido, la lámina orgánica sólo tiene contacto directo con el líquido en una de sus caras durante la perforación eléctrica, la cara inferior de la lámina mantiene contacto (según Fig. 4.1B). Todas las láminas perforadas eléctricamente se llevaron al microscopio para su observación, conservando la misma orientación de las caras que tuvo entre los electrodos del aparato de perforación eléctrica, la iluminación siempre estuvo debajo de la lámina y las lentes (el microscopio) estuvieron por encima de ésta. Ya que las láminas a perforar (Teflón transparente, polietileno y vinilo) fueron transparentes, fue difícil saber qué tanto se fijó en la cara superior y qué tanto en la cara inferior; la Fig. 4.12A muestra esta dificultad con Teflón transparente, donde se ensayó invirtiendo la orientación de la lámina o cambiando la posición de la fuente de iluminación violeta sobre la lámina (es decir, se iluminó desde arriba a la lámina).

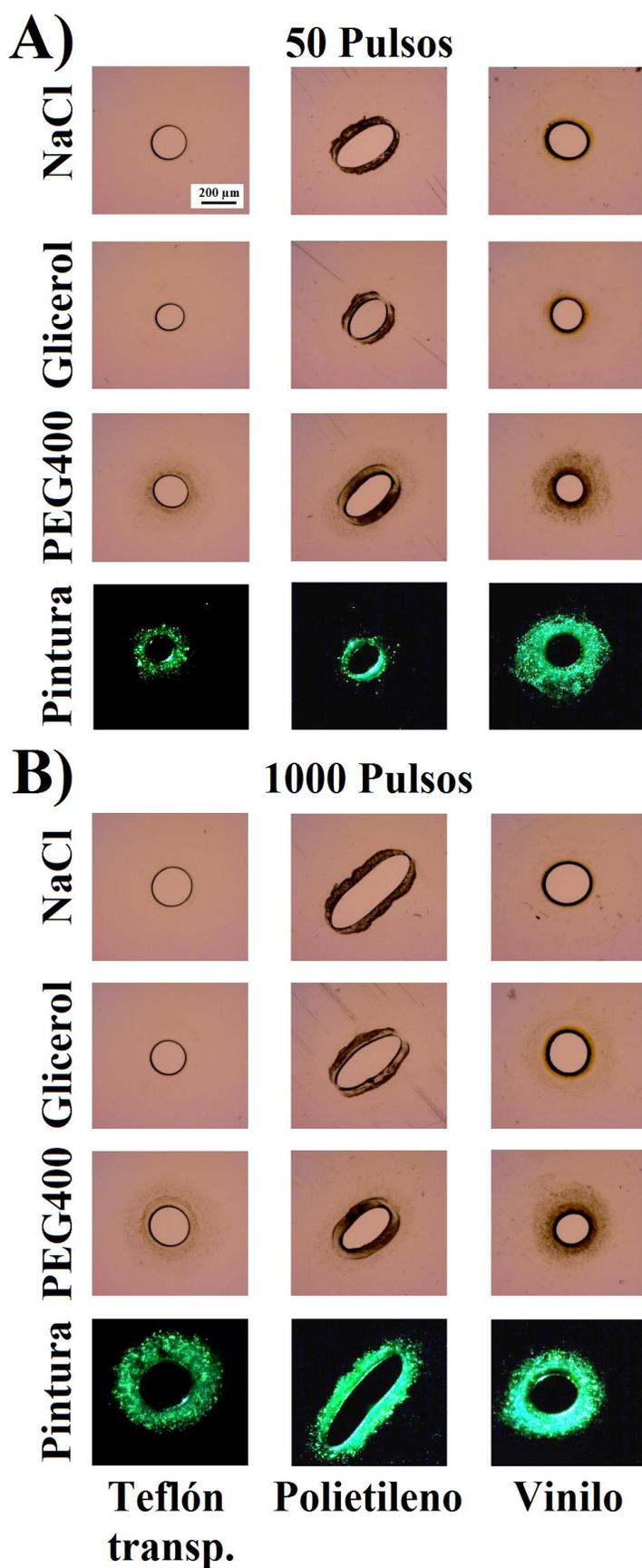


Fig. 4.11 Fijación de sustancias en los bordes de las perforaciones formadas con descargas eléctricas en láminas orgánicas. Se aplicaron A) 50 o B) 1000 descargas eléctricas. Las sustancias que se fijaron fueron glicerol, PEG400 y pintura luminiscente. La configuración de electrodos que se utilizó fue metálico donde el líquido fue 0.1 M NaCl – (control), Glicerol (10% glicerol en 0.1 M NaCl), PEG400 (10% PEG400 en 0.1 M NaCl), o Pintura (1% pintura luminiscente en 0.1 M NaCl). Para resaltar la fijación de pintura luminiscente en las perforaciones, las láminas orgánicas (Teflón transparente, polietileno y vinilo) se iluminaron con luz violeta. La frecuencia de las descargas eléctricas fue de 20 Hz.

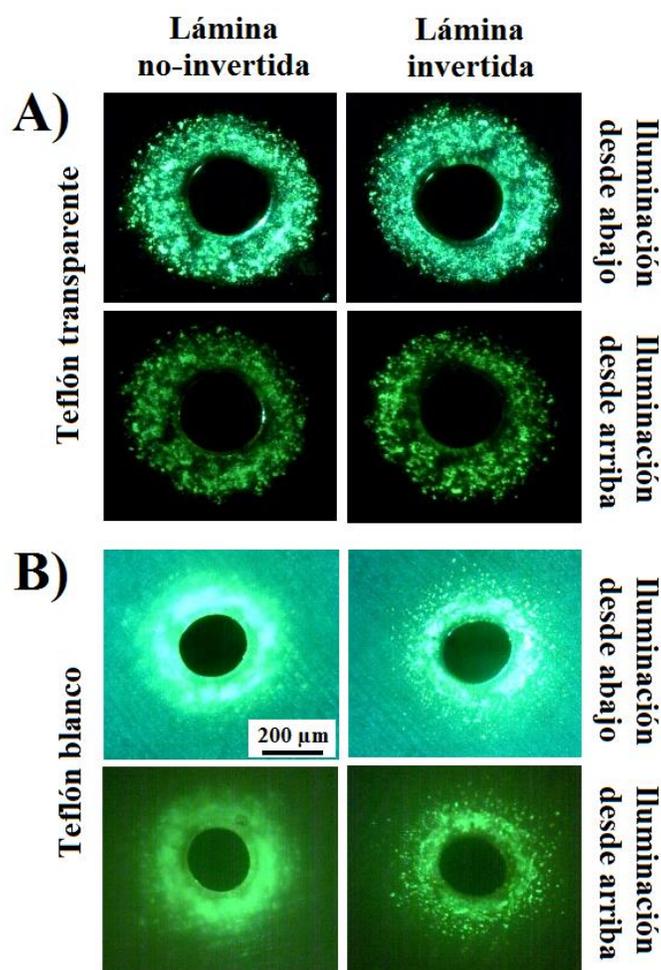


Fig. 4.12 Perforaciones realizadas en láminas de Teflón transparente y Teflón blanco pintadas con pintura luminiscentes después de la aplicación de descargas eléctricas. El líquido utilizado para la configuración de electrodos metal-líquido fue 1% de pintura luminiscente en 0.1 M NaCl. El número de pulsos aplicados fue 1000 a 20 Hz y la distancia entre el electrodo superior y la lámina orgánica fue $d = 3$ mm. Las fotografías se tomaron cambiando la orientación de la lámina o cambiando la posición de la fuente de iluminación violeta sobre la lámina.

Ya que el Teflón blanco tuvo un comportamiento similar al Teflón transparente, después de aplicar descargas eléctricas (ver Fig. 4.7), se logró mostrar que precisamente la cara expuesta al líquido (cara inferior) en la configuración metal-líquido es donde se fija la sustancia alrededor del borde de la perforación (Fig. 4.12B).

4.5 Discusión

La técnica de BLP es una técnica sensible y efectiva para evaluar la actividad permeabilizadora de algunas moléculas como péptidos policatiónicos en membranas. La BLP es una membrana que se monta dentro de una perforación hecha en una lámina de Teflón que separa dos contenedores con medio acuoso donde se sumergen electrodos para aplicar voltaje y medir la corriente eléctrica simultáneamente a través de la bicapa. Uno de los principales problemas de la técnica de BLP es la estabilidad de la membrana la cual depende de la calidad de los bordes de la perforación formada en la lámina de Teflón (White 1972). Las perforaciones se pueden hacer mecánicamente con una aguja, la cual deja fisuras en los bordes, o eléctricamente mediante una configuración típica de dos electrodos metálicos (configuración metal-metal) que fue evaluada en este trabajo (Fig. 4.1A) y comparada con nuestra configuración novedosa de electrodos metal-líquido (Fig. 4.1B).

Con la configuración de electrodos metal-metal se formaron perforaciones en láminas de Teflón, de dos tipos (blanco y transparente) con quemaduras en los bordes (Fig. 4.7), lo cual no es conveniente para formar la BLP.

Nuestra configuración de electrodos, metal-líquido, mejora la calidad de los bordes de las perforaciones garantizando una estabilidad de la BLP formadas, como mínimo dos horas. La ventaja de esta configuración es que el líquido, al mantener contacto físico con el Teflón, provee refrigeración durante las descargas eléctricas y por ende reduce la quemadura en los bordes de la perforación.

Para modular el tamaño de las perforaciones, no sólo en Teflón sino también en otras láminas orgánicas, fue construido un equipo que permite programar el número y frecuencia de las descargas eléctricas (Fig. 4.5A). El equipo de perforación eléctrica se construyó utilizando elementos eléctricos y electrónicos de fácil consecución (Figs. 4-2, 4-3 y 4-4). Obviamente los circuitos que presentamos aquí para el equipo, se podrían optimizar en un futuro buscando por ejemplo otros tipos de MOSFET más rápidos, otros transformadores

elevadores de voltaje y fuentes de voltaje con mayor entrega de corriente; pero estos componentes también dependen de la necesidad del usuario si desea perforaciones eléctricas a mayor escala y a nivel industrial. Para nuestro caso, el aparato de perforación eléctrica que se construyó fue suficiente para preparar nuestros experimentos con BLP.

El tamaño de las perforaciones logradas desde nuestro aparato dependió del número de pulsos (o número de descargas eléctricas), esto se mostró en las láminas orgánicas como Teflón transparente (50 μm de espesor), polietileno (50 μm de espesor) y vinilo (50 μm de espesor) (Fig. 4.8). Por otra parte, el tamaño de las perforaciones dependió también de la frecuencia de las descargas eléctricas (Fig. 4.10).

Se compararon las perforaciones formadas desde distintas configuraciones de electrodos, metal-aire (Fig. 4.1B, cubeta 6 sin líquido), metal-metal (Fig. 4.1A), metal-electrolito (Fig. 4.1B, el líquido es 0.1 M NaCl) y metal-agua (Fig. 4.1B, el líquido es agua destilada). Para Teflón transparente y vinilo, las perforaciones fueron más grandes con la configuración metal-metal, luego con metal-aire, metal-electrolito y metal-agua; pero para polietileno el orden fue metal-aire, luego metal-metal, metal-electrolito y metal-líquido, la explicación podría ser por diferencias entre las propiedades térmicas de estos materiales, el tamaño de la perforación no dependería de la perforación eléctrica sino de la combustión del material porque después de un determinado tamaño de perforación, las descargas no quemaron al material y éstas llegaron directamente al otro electrodo (Fig. 4.9). Por otro lado, la forma ovalada de las perforaciones en polietileno se podría explicar por la anisotropía del material (Fig. 4.9). Perforaciones más grandes con la configuración metal-electrolito respecto a la configuración metal-agua justifican la opción de variar la salinidad del líquido para modular el tamaño de las perforaciones (Fig. 4.9).

Con la configuración metal-líquido (Fig. 4.1B) es posible fijar sustancias en los bordes de la perforación, esto podría ser útil para cambiar las propiedades de los bordes. Se mezclaron algunas sustancias como glicerol, PEG400 y pintura luminiscente con el electrolito 0.1 M NaCl. La fijación de estas sustancias en los bordes pudo haber sido por el fenómeno de electropolimerización (Dubal et al. 2012). Para ilustrar con detalle en cuál cara de la lámina

orgánica se fija la sustancia, ya que las láminas usadas fueron transparentes, se realizó una prueba con Teflón blanco; la fijación de sustancias por electropolimerización se dio precisamente en la cara de la lámina que mantuvo contacto directo con el líquido durante la perforación eléctrica (Fig. 4.12). La fijación de sustancias en los bordes de la perforación se podría aprovechar para aumentar la hidrofobicidad y por lo tanto la fijación de la BLP en futuros experimentos.

Nuestro método de perforación eléctrica se puede extender para perforar otras láminas orgánicas como cuero, caucho, tela, plástico y papel para la manufactura de bolsos, bolsas, zapatos, correas, etcétera. Esto nos permitió solicitar la patente de invención de nuestro método ante la Superintendencia de Industria y Comercio (número de radicado 13-016117, gaceta 701) y a nivel internacional (PCT con número de publicación internacional WO 2014/118698).

5. PERMEABILIZACIÓN IÓNICA DE LA BICAPA LIPÍDICA PLANA CON PÉPTIDOS POLICATIÓNICOS, MODULADA CON POTENCIAL TRANSMEMBRANAL Y POTENCIAL SUPERFICIAL

5.1 Resumen

Para estudiar la permeabilización de membranas con péptidos policatiónicos, fue instalada una estación de trabajo de bicapa lipídica plana en nuestro Laboratorio. La bicapa lipídica plana es una membrana artificial para la cual es posible aplicar voltajes de distinta magnitud y polaridad y paralelamente registrar la corriente eléctrica a través de ésta, provocada por la permeabilización con agentes biológicamente activos como los péptidos policatiónicos. Los péptidos BTM-P1 y BTM-P4 derivados de la protoxina Cry11Bb1 de *Bacillus thuringiensis*, subespecie *medellin*, y los péptidos anticancerígenos P7-4 y P7-5 ya han mostrado permeabilización potencial-dependiente en biomembranas. Nuestros resultados confirmaron el comportamiento permeabilizador potencial-dependiente de los péptidos policatiónicos, donde el péptido BTM-P4 reveló ser más activo que BTM-P1; y entre los péptidos anticancerígenos, P7-5 reveló ser más activo que P7-4 tal como se había mostrado previamente en biomembranas. Por otra parte, al variar el potencial superficial de la bicapa por la adsorción del catión divalente Mg^{2+} , se mostró que la concentración efectiva del péptido para permeabilizar la membrana se tuvo que aumentar, debido a la competencia electrostática entre el Mg^{2+} y el péptido policatiónico.

5.2 Introducción

Los péptidos policatiónicos son moléculas que hacen parte del sistema de defensa antimicrobiano de los seres vivos (Giacometti et al. 1999; Epanand et al. 2016). El mecanismo de estos péptidos es permeabilizar las células formando poros en sus membranas lo cual conduce a la lisis celular (Belokoneva et al. 2003; Hollmann et al.

2016). Los péptidos pueden incrementar su capacidad permeabilizadora en células de manera proporcional al potencial transmembranal (Aspedon y Groisman 1996; Lemeshko 2013; Wilmes et al. 2014), este mecanismo es conocido como permeabilización potencial-dependiente, el cual es favorable en algunas células (tales como bacterias) puesto que su potencial transmembranal es relativamente alto, alrededor de -180 mV (Skulachev 1988; Wax et al. 2002). Para células con potencial transmembranal relativamente bajo, con algunas décimas de milivoltios, es posible incrementar su potencial transmembranal usando valinomicina y un gradiente de K^+ para facilitar la permeabilización potencial-dependiente con péptidos policatiónicos (Wu et al. 1999). Ya se ha evaluado la permeabilización potencial-dependiente de los péptidos BTM-P1 y BTM-P4 en biomembranas (Lemeshko 2011; Orduz y Lemeshko 2016). Algunos péptidos policatiónicos también han mostrado propiedades anticancerígenas (Gaspar et al. 2013). Los péptidos anticancerígenos P7-4 y P7-5 también han mostrado permeabilización potencial-dependiente en biomembranas (Lemeshko 2013).

Para estudiar la permeabilización de la bicapa lipídica de las biomembranas con péptidos policatiónicos, se han desarrollado membranas artificiales como la bicapa lipídica plana (BLP). La aplicación de pulsos eléctricos en BLP nos ofrece la posibilidad de estudiar la dinámica de incorporación de moléculas cargadas como los péptidos, puesto que dependiendo de la polaridad del potencial, se afectará la inserción de dichas moléculas en la membrana y la permeabilización de la bicapa (Koo et al. 1999; Chanturiya et al. 2004).

El propósito de este trabajo fue evaluar, usando una estación de trabajo de BLP, la actividad permeabilizadora de algunos péptidos policatiónicos, previamente evaluados con biomembranas, y mostrar el efecto del potencial transmembranal y el potencial superficial sobre la interacción péptido-membrana.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Reactivos

Los péptidos antimicrobianos BTM-P1 (VAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS) y BTM-P4 (IAPALIAVAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS); y anticancerígenos P7-4 (RRRRRRRGGIYLATALAKWALKQGF) y P7-5 (IYLATALAKWALKQFGGRRRRRRR) fueron proveídos por GenScript Corporation. Los reactivos para la preparación del medio de incubación fueron de alta pureza de las compañías Merck y Sigma. Lípidos POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) y POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) fueron de la compañía Avanti Lipids.

5.3.2 Instalación de una estación de trabajo para experimentos con bicapa lipídica plana

La BLP es un modelo de membrana artificial constituida por una sección de bicapa lipídica que se ensambla dentro de una perforación de lámina de Teflón la cual separa dos medios acuosos salinos donde se pueden instalar dos electrodos respectivos para aplicar voltaje y medir la corriente a través de esta membrana, simultáneamente. La BLP es bastante útil para monitorear la permeabilización de membranas con péptidos policatiónicos, de manera potencial-dependiente.

Un esquema de una estación de trabajo para experimentos con BLP que se propuso instalar se muestra en la Fig. 5.1. La BLP se modela como un circuito RC en paralelo formado por la capacitancia (C_m) y la resistencia eléctrica (R_m) de la membrana. Cuando se forman poros en la membrana se puede incluir una resistencia adicional en paralelo (R_p). La cubeta doble o celda doble de Teflón para experimentos con BLP consiste de dos contenedores, cada uno con medio electrolito, separados por una lámina de Teflón, de 25 a 50 μm de espesor, en la cual se tiene una perforación de 100 a 500 μm de diámetro donde se forma la BLP. La cubeta doble de Teflón dispone de espacios en la parte baja de los contenedores para los agitadores magnéticos. Cada electrodo fue utilizado para aplicar potencial eléctrico y

registrar simultáneamente la corriente eléctrica a través de la BLP. Cada electrodo consiste de un alambre de Ag/AgCl ubicado dentro de una punta de pipeta plástica que contiene electrolito 0.1 M KCl y gel-agarosa 1% como puente salino. La corriente eléctrica registrada a través de la bicapa lipídica se convierte en voltaje con el preamplificador, el cual es un amplificador de transimpedancia; se utilizó el amplificador operacional OPA111 de ruido bajo e impedancia de entrada alta. La resistencia de retroalimentación del circuito de transimpedancia es del orden de los giga-ohms, utilizamos uno de 1 GOhm. Un generador de señales permite programar la magnitud y polaridad del potencial eléctrico aplicado a través de la BLP. Con un equipo amplificador se puede acondicionar y amplificar la señal de voltaje proveniente del preamplificador; el amplificador puede contener filtros paso-bajo, para reducir el ruido de la señal de voltaje, y sistema OFFSET para cancelar el voltaje electroquímico proveído desde los electrodos. La señal de corriente que pasa y el voltaje aplicado a través de la bicapa se pueden visualizar en tiempo real en un computador (PC) usando una tarjeta de adquisición de datos, para nuestro caso, se utilizó la tarjeta NI USB-6281. Un microscopio (lentes, Fig. 5.1) con conexión a videocámara y TV fue utilizado para observar la formación de la BLP.

La Fig. 5.2 muestra una fotografía de la estación de trabajo para experimentos con BLP que se instaló en nuestro Laboratorio. El montaje para BLP, que contiene el preamplificador y la cubeta doble de Teflón, se instaló dentro de una caja metálica conectada a tierra (ver Fig. 5.3 para más detalles), sobre amortiguadores neumáticos y base antivibratoria con pelotas de caucho para reducir, durante los experimentos, las vibraciones mecánicas generadas en el entorno de la estación de trabajo del laboratorio (Fig. 5.2).

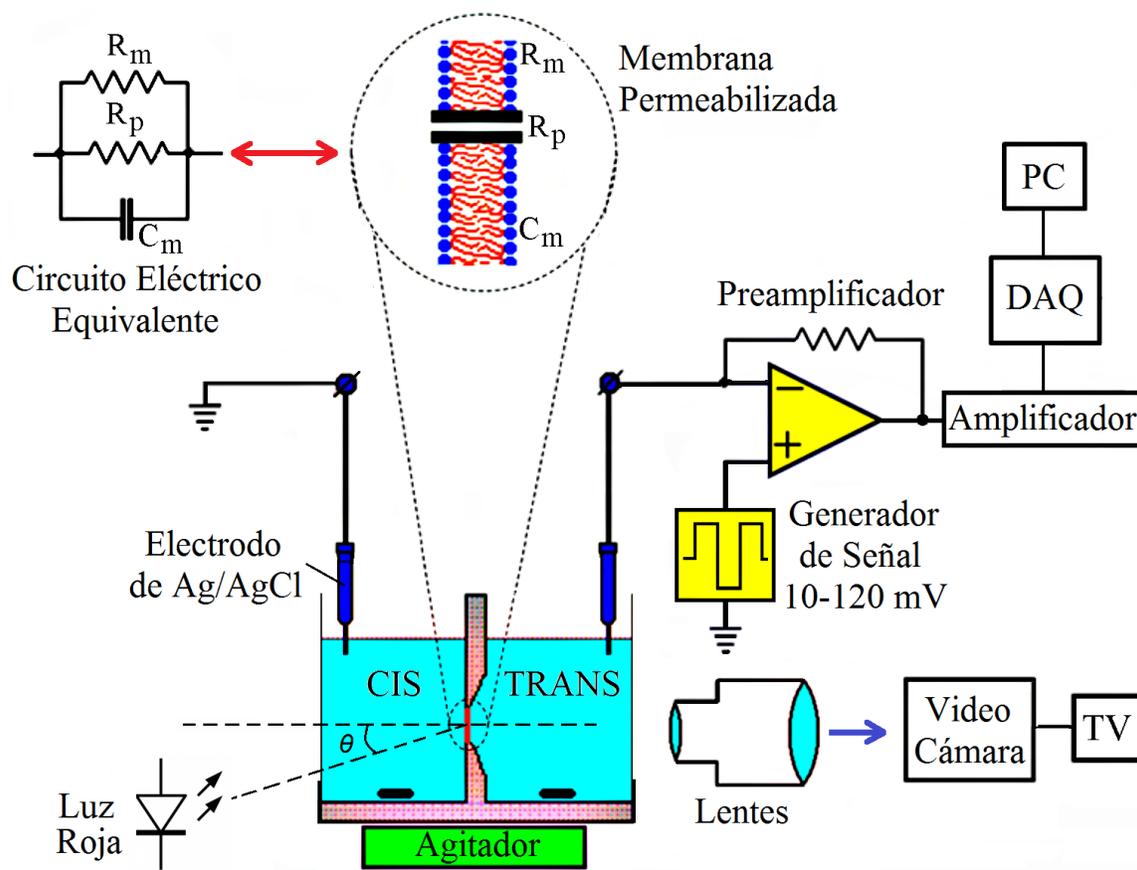


Fig. 5.1 Esquema de una estación de trabajo para experimentos con bicapa lipídica plana (BLP). A través de una lámina de Teflón, que separa dos compartimientos con medio salino, se hace una perforación para formar la BLP. La bicapa se puede modelar como un circuito RC en paralelo, donde C_m es la capacitancia de la membrana, y R_m la resistencia eléctrica de la membrana. Los péptidos policatiónicos pueden formar poros a través de la bicapa y por lo tanto se incluye, dentro del circuito RC, una segunda resistencia R_p correspondiente al poro formado con péptidos. Los compartimientos con medio salino mantienen contacto con electrodos de Ag/AgCl que permiten aplicar voltaje, controlado desde un generador de señales, y registrar la corriente eléctrica con un preamplificador (amplificador operacional de transimpedancia) que toma la señal de corriente y luego la convierte en señal de voltaje para ser amplificada y acondicionada con el amplificador. Los registros de corriente y potencial eléctrico se pueden observar desde un computador (PC) con la ayuda de un sistema de adquisición de datos (DAQ). Para controlar la formación de la bicapa se utiliza un sistema de lentes (microscopio) con iluminación (luz roja) para captar imágenes en tiempo real mediante una videocámara y observar en una pantalla (TV).

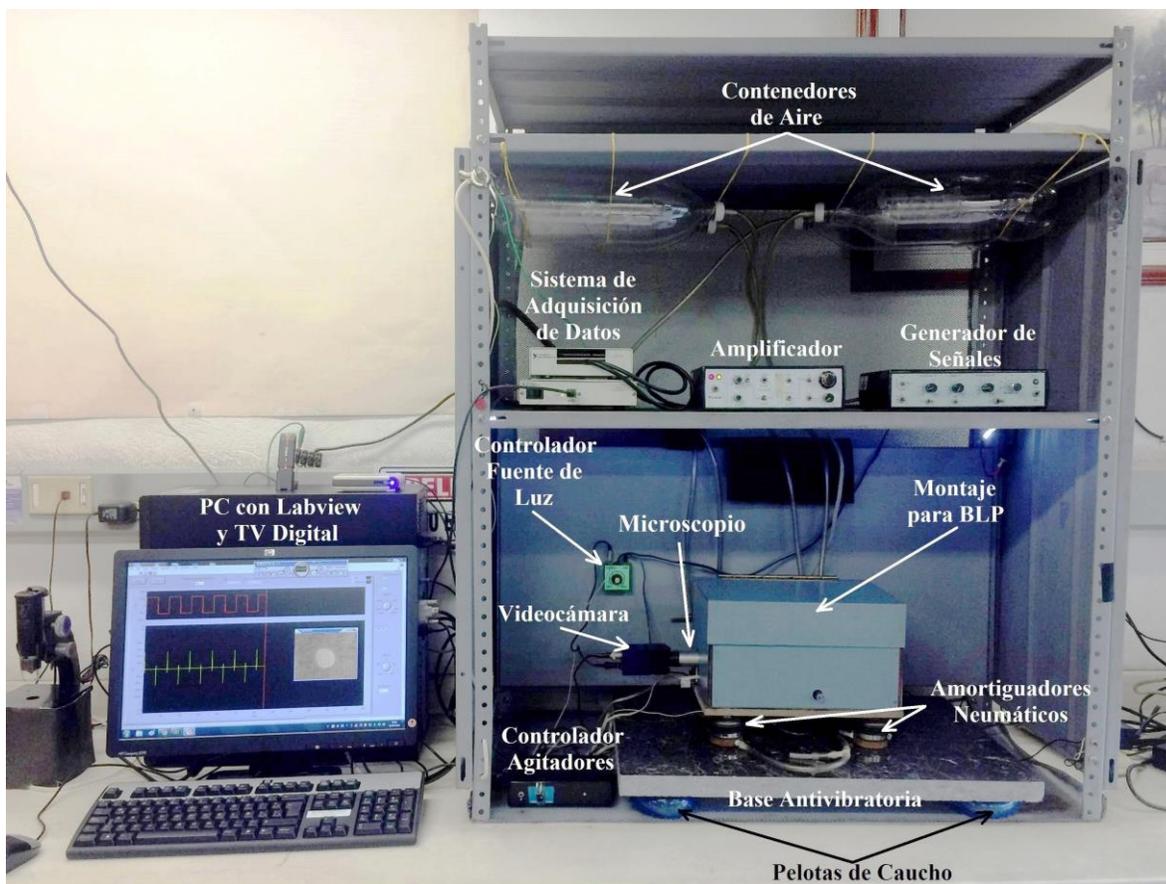


Fig. 5.2 Estación de trabajo para experimentos con bicapa lipídica plana (BLP) instalado en nuestro Laboratorio. El montaje para BLP (ver Fig. 5.3 para más detalles) se realizó dentro de una caja metálica sobre amortiguadores neumáticos conectados con los contenedores de aire para reducir las vibraciones mecánicas sobre la membrana; para optimizar esta parte, adicionalmente se instaló debajo una base antivibratoria sobre pelotas de caucho. Para observar la BLP desde la pantalla de un computador (PC), se utilizó un microscopio con videocámara e interfaz de TV digital. La iluminación se ajustó con un controlador de la fuente de luz y la agitación se ajustó con el controlador de agitadores MS-21A (Eastern Scientific LLC - Rockville, USA). Para aplicar voltaje y acondicionar la señal de corriente eléctrica registrada a través de la BLP se utilizó un generador de señales RG-3 y un amplificador BBA-02 (Eastern Scientific LLC - Rockville, USA), respectivamente. Las señales eléctricas se visualizaron en el PC con la ayuda del software Labview 2010 y el sistema de adquisición de datos NI USB-6281.

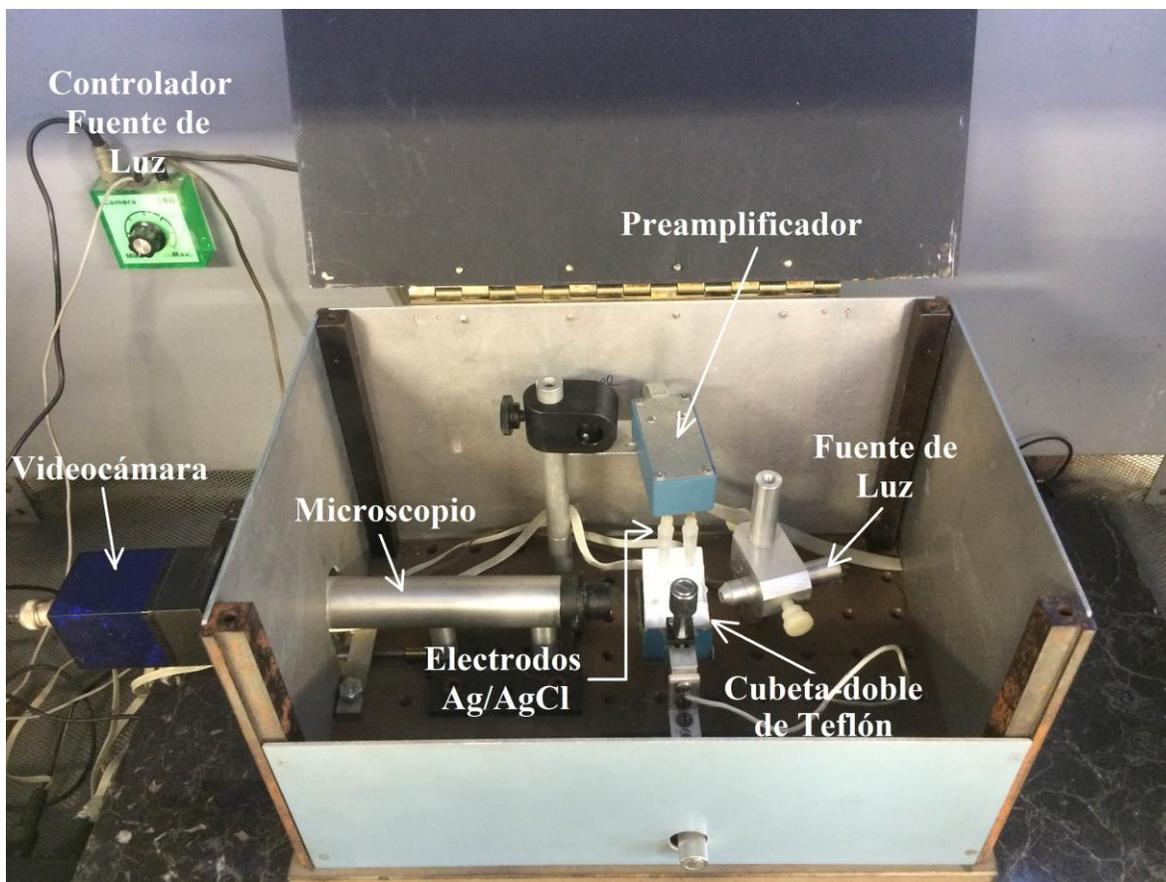


Fig. 5.3 Montaje para bicapa lipídica plana (BLP). La BLP que se forma en la cubeta doble de Teflón (más detalles en Fig. 5.4) se puede observar con un microscopio con conexión a videocámara. La BLP se ilumina con una fuente de luz cuya intensidad se ajusta con el controlador de fuente de luz. Para aplicar voltaje y registrar corriente eléctrica a través de la BLP se utilizan un par de electrodos de Ag/AgCl conectados con el preamplificador el cual recibe la señal de voltaje desde el generador de señales y envía la señal de corriente eléctrica hacia el amplificador para su acondicionamiento (ver Fig. 5.2).

La cubeta doble de Teflón tiene un diseño especial para la configuración espacial de los elementos eléctricos y ópticos que fueron utilizados. En la Fig. 5.4 se muestra y se describe la cubeta que se utilizó para los experimentos.

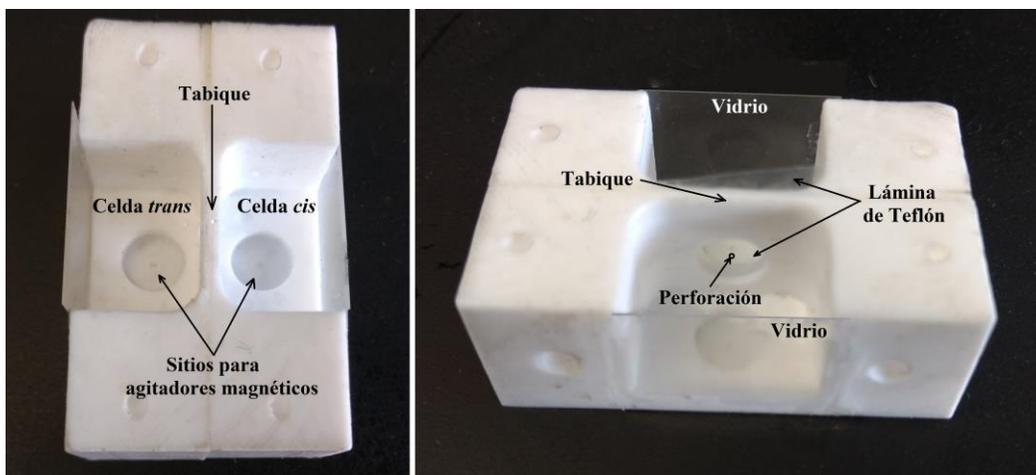


Fig. 5.4 Cubeta doble de Teflón. Consiste de dos compartimientos (celda *cis* y celda *trans*) que se llenan con medio salino y en los cuales se ubican los electrodos de Ag/AgCl. Cada compartimiento contiene sitios para ubicar los agitadores magnéticos. Los compartimientos están separados por medio de un tabique donde se encuentra una lámina de Teflón con una perforación donde se forma la bicapa lipídica plana (BLP). Esta cubeta posee paredes de vidrio transparente para poder iluminar y observar la formación de la BLP simultáneamente.

Las perforaciones en láminas de Teflón para la cubeta doble se hicieron con el método de perforación eléctrica descrito en el capítulo 4. La Fig. 5.5 muestra un seguimiento de la formación de la BLP. Inicialmente se pre-cubre la perforación con la solución *a* (5 mg lípido/ml hexano), se deja evaporar el hexano y se adiciona medio salino con búfer en las dos celdas de la cubeta (Fig. 5.5A). Luego se agrega, con una micropipeta de vidrio, la solución *b* (20 mg lípido/ml decano) en la perforación y se observa la formación de la bicapa (Fig. 5.5, B-F) haciendo un seguimiento junto con los picos de corriente capacitiva (Fig. 5.5G). La membrana lipídica se modela como un capacitor, por lo tanto la corriente capacitiva (I_m) se relaciona con la capacitancia de la membrana (C_m) y la variación del voltaje aplicado ($\frac{dV}{dt}$) en la forma $I_m = C_m \frac{dV}{dt}$. Según la configuración de los capacitores de placas plano-paralelas, la capacitancia (C_m) es inversamente proporcional al espesor (d) del capacitor ($C_m = \varepsilon \frac{A}{d}$, donde ε es la permitividad dieléctrica de la membrana y A el área de la bicapa), por lo tanto, cuando la bicapa se adelgaza C_m aumenta y por ende I_m también, tal como se muestra en la Fig. 5.5G.

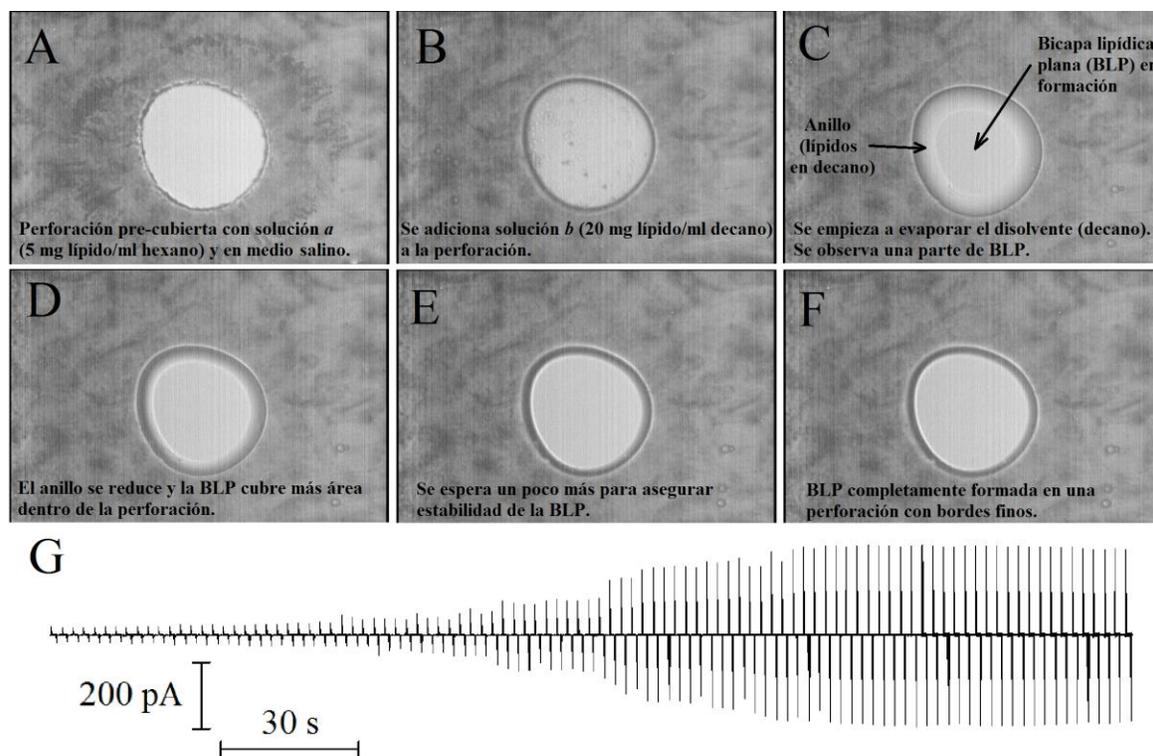


Fig. 5.5 Seguimiento de la formación de la bicapa lipídica plana (BLP). Inicialmente se pre-cubre la perforación con solución *a* (5 mg lípido/ml hexano) y se agrega el medio salino (ver foto A), luego con una pipeta de vidrio se agrega la solución *b* (20 mg lípido/ml decano) (ver foto B). Se puede ver el incremento del área de la BLP (C-E) hasta formarse completamente (F), este proceso se acompaña con el incremento de la capacitancia de la membrana, C_m , registrado con los picos de corriente capacitiva (G).

Nuestro método de perforación eléctrica permitió formar BLPs, como mínimo, estables hasta por 2 horas después de ensayar con voltajes (potencial transmembranal) desde ± 10 hasta ± 90 mV.

5.3.3 Preparación de soluciones lipídicas para experimentos con bicapa lipídica plana

Lípidos de POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) y POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine) disueltos en cloroformo:metanol (2:1), se agregaron y se mezclaron en dos frascos de vidrio, *a* y *b*, en la proporción POPC:POPE (6:4 peso:peso) (Fig. 5.6A). La mezcla fue secada por microevaporación rotatoria en presencia de nitrógeno gaseoso y succión al vacío por 6 horas (Fig. 5.6, B y C).

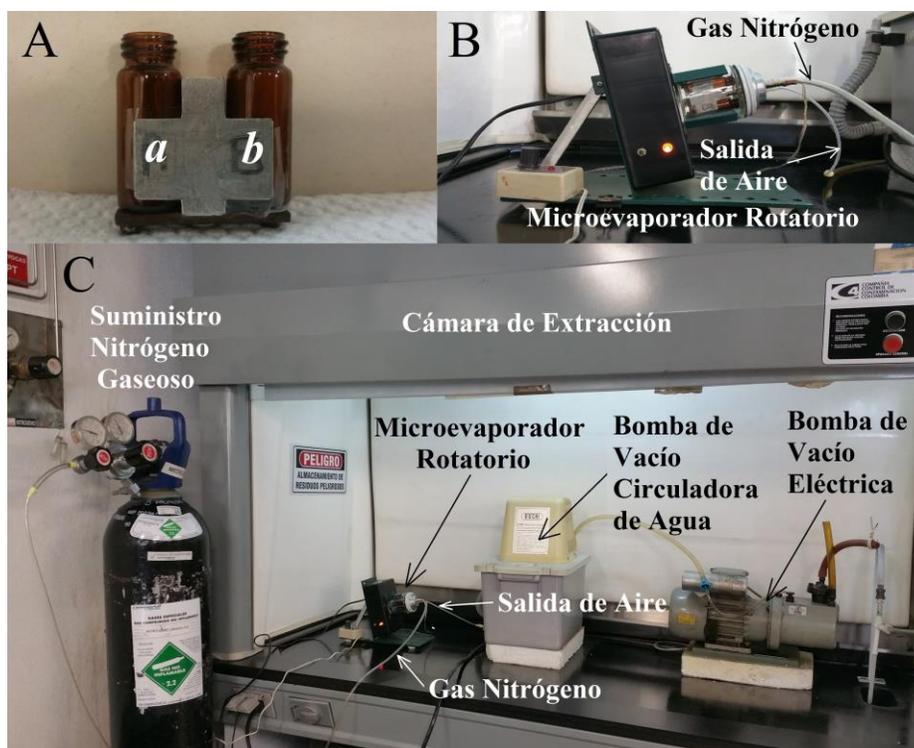


Fig. 5.6 Preparación de los lípidos para experimentos con bicapa lipídica plana. Se tiene inicialmente dos frascos de vidrio, *a* y *b*, con lípidos disueltos en cloroformo:metanol (2:1) (ver foto A), los cuales se llevaron al microevaporador rotatorio (ver foto B) que tenía suministro de nitrógeno gaseoso y succión al vacío a través de mangueras (ver foto C). Se utilizaron dos bombas de vacío, una para succión suave (con bomba de vacío circuladora de agua) durante dos horas, y otra con bomba eléctrica para succión fuerte durante cuatro horas.

Finalmente, los lípidos secos en cada uno de los frascos *a* y *b* se disuelven en hexano hasta obtener 5 mg/mL (solución *a*) y en decano hasta obtener 20 mg/mL (solución *b*), respectivamente.

5.3.4 Formación de la bicapa lipídica plana

La BLP se formó según la técnica de Mueller-Rudin (Mueller et al. 1962; Mueller y Rudin 1963), con la mezcla de lípidos POPC:POPE (6:4, peso:peso, Avanti Lipids). La solución *a* (5 mg lípido/ml hexano) se utilizó para pre-cubrir con lípidos la perforación (200 μ m de diámetro) en la lámina de Teflón transparente (CS Hyde Company, USA) de 25 μ m de espesor. Luego se llenó la cubeta doble (Fig. 5.1) con la solución 100 mM de KCl, 5 mM HESPES a pH 7.0, o con 100 mM de KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES a pH 7.0 para

evaluar el efecto del Mg^{2+} sobre la actividad permeabilizadora de un péptido policatiónico. Usando una micropipeta con punta de vidrio, se adicionó la solución *b* (20 mg lípido/ml decano) sobre la perforación mientras se observó desde el microscopio; la BLP se formó cuando se evaporó todo el decano.

5.3.5 Evaluación de la actividad permeabilizadora potencial-dependiente de los péptidos policatiónicos

Para mostrar la actividad permeabilizadora potencial-dependiente, los péptidos fueron adicionados al lado *cis* (tierra) de la cubeta doble (Fig. 5.1) y la polaridad del potencial eléctrico en *trans* fue cambiada durante el curso de los experimentos mientras se registró la corriente eléctrica a través de la BLP simultáneamente. Un potencial negativo en *trans* es favorable para la incorporación y formación de canal en la membrana, manifestándose como un incremento en la magnitud de la corriente eléctrica; mientras que un potencial positivo en *trans* desfavorece la incorporación y formación de poro manifestándose como una disminución o mantenimiento de la magnitud de la corriente eléctrica. La concentración de los péptidos policatiónicos se ajustó a la máxima posible que podía soportar la BLP sin destruirse instantáneamente respecto al potencial eléctrico utilizado.

5.4 Resultados

Para mostrar la utilidad de las perforaciones formadas en Teflón transparente con el equipo de perforación eléctrica (descrito en el capítulo 4 de este trabajo), usando la configuración de electrodos metal-líquido, se montó la BLP y se realizaron pruebas previas de permeabilización potencial-dependiente con péptido policatiónico. La Fig. 5.7 muestra un resultado con el péptido BTM-P4CD (también extraído de la protoxina natural Cry11Bb1 de *Bacillus thuringiensis* subesp. *medellin*) en una bicapa formada con fosfatidilcolina de huevo y colesterol (proporción 2:1, peso:peso) que para la polaridad *trans*(-) se incrementó la corriente, es decir, cuando el potencial transmembranal en la bicapa fue de -25 mV; mientras que para *trans*(+) la magnitud de la corriente eléctrica se redujo o se mantuvo constante.

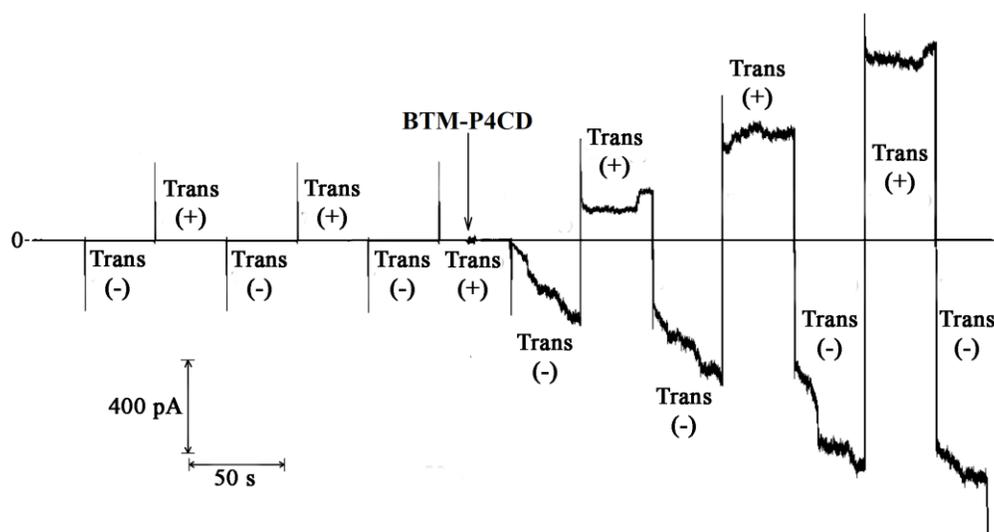


Fig. 5.7 Registro de la corriente eléctrica a través de la bicapa lipídica plana antes y después de la adición de $0.2 \mu\text{M}$ BTM-P4CD. La membrana se formó a partir de una mezcla de fosfatidilcolina de huevo y colesterol en la proporción 2:1. Se utilizó Teflón transparente de espesor $50 \mu\text{m}$, el diámetro de la perforación fue de $\sim 400 \mu\text{m}$. El potencial aplicado fue $\pm 25 \text{ mV}$ con período de cambio de polaridad de voltaje igual a 40 s . El medio de incubación fue 200 mM KCl , 5 mM HEPES a $\text{pH } 7.2$.

Para mostrar la permeabilización potencial-dependiente en BLP con los péptidos BTM-P1 y BTM-P4 se registró la corriente eléctrica a través de la membrana (Fig. 5.8). Los péptidos fueron adicionados en el lado *cis* de la cubeta doble de Teflón con agitación mientras que la polaridad del lado *trans* se mantuvo negativa, se observó que la magnitud de la corriente eléctrica se incrementó en el tiempo (Fig. 5.8). Se cambió periódicamente la polaridad del potencial transmembranal para mostrar el efecto sobre la actividad permeabilizadora de los péptidos; en general, *trans* negativo fue favorable para incrementar la permeabilización de la bicapa (Fig. 5.8). Para el medio de incubación 100 mM KCl , 5 mM HEPES , $\text{pH } 7.0$, la membrana fue permeabilizada con $0.5 \mu\text{M}$ BTM-P1 a -90 mV (Fig. 5.8A) o con $1.0 \mu\text{M}$ BTM-P1 a -60 mV (Fig. 5.8B). Para el caso del péptido BTM-P4, las concentraciones usadas fueron 0.2 y $0.4 \mu\text{M}$ a -90 mV y -60 mV , respectivamente (Fig. 5.8, C y D). En algunos casos, un decrecimiento exponencial fue observado en los registros de corriente eléctrica inmediatamente después de pasar a *trans*(+) (ver círculos, Fig. 5.8). Durante *trans*(+), la magnitud de la corriente eléctrica en cualquier caso fue reducida notablemente (alrededor de un 75%) respecto a la magnitud de la corriente eléctrica en *tran*(-) para el

péptido BTM-P4 (Fig. 5.8, C y D), mientras que para el péptido BTM-P1 esta magnitud se redujo alrededor de un 25% (Fig. 5.8, A y B).

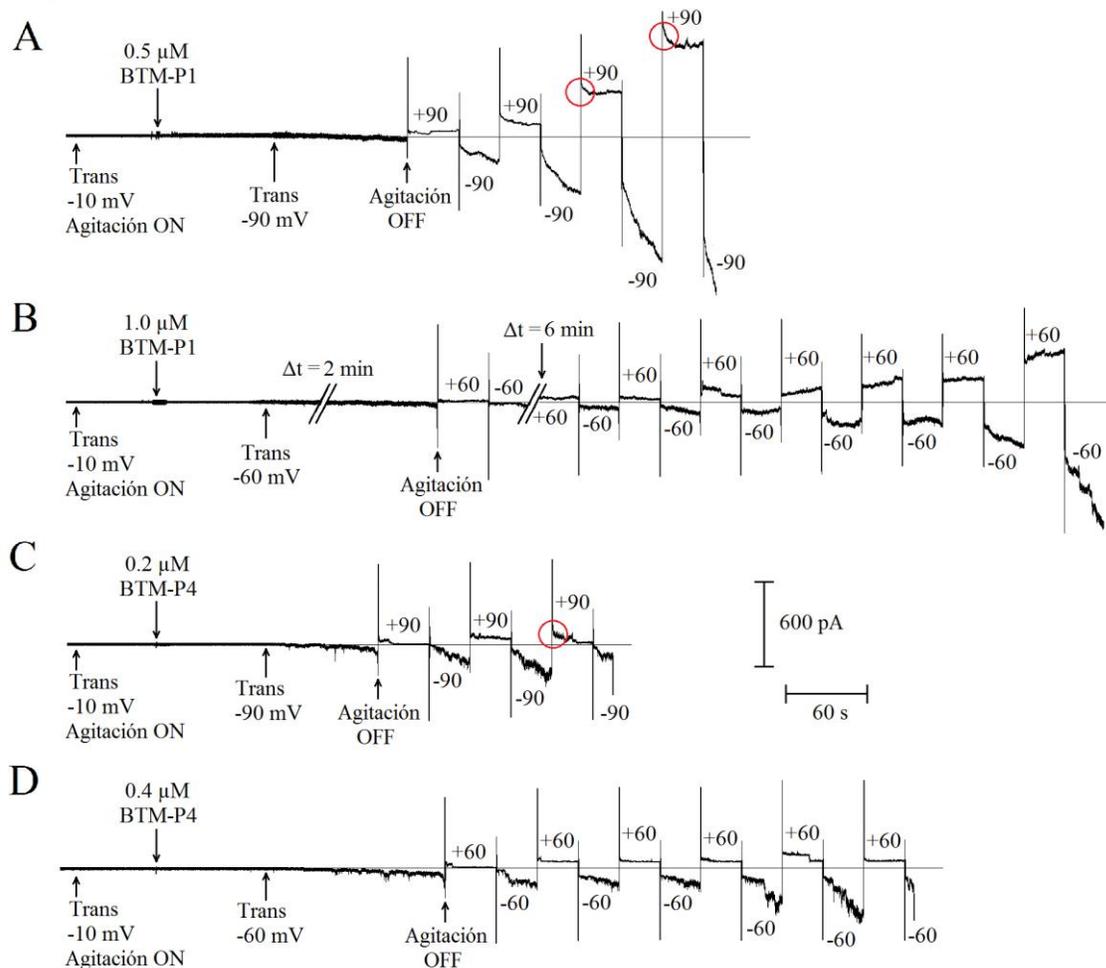


Fig. 5.8 Permeabilización potencial-dependiente de bicapa lipídica plana (BLP) con los péptidos BTM-P1 y BTM-P4. La BLP fue formada usando una mezcla de POPC:POPE (6:4) (ver Métodos). El péptido fue adicionado en el lado *cis* de la cubeta doble (Tierra) con agitación mientras se aplicaron -10 mV en el lado *trans*, 1 minuto después se subió cuidadosamente el potencial en *trans* hasta -90 mV (A y C) o a -60 mV (B y D). Luego de observar un incremento notable en la corriente eléctrica a través de la BLP, la agitación se detuvo y el potencial eléctrico en *trans* fue cambiado periódicamente ± 90 mV (A y C) o ± 60 mV (B y D) cada 30 segundos. Algunos efectos de reversibilidad en la permeabilización de la membrana, después de aplicar el potencial positivo en *trans*, fueron señalados con círculo. El medio salino fue 100 mM KCl, 5 mM HEPES a pH 7.0.

Para evaluar el efecto del potencial superficial sobre la permeabilización de membrana con péptido policationico, fue incluido el catión divalente Mg^{2+} en el medio salino (1 mM

MgCl₂) (Fig. 5.9, A y B), donde se mostró que la concentración efectiva de BTM-P1 para permeabilizar la membrana se tuvo que aumentar desde 0.5 a 1.0 μM para lograr un efecto comparable a lo observado en medio sin Mg²⁺ (comparar Fig. 5.8A con Fig. 5.9A, y luego con Fig. 5.9B).

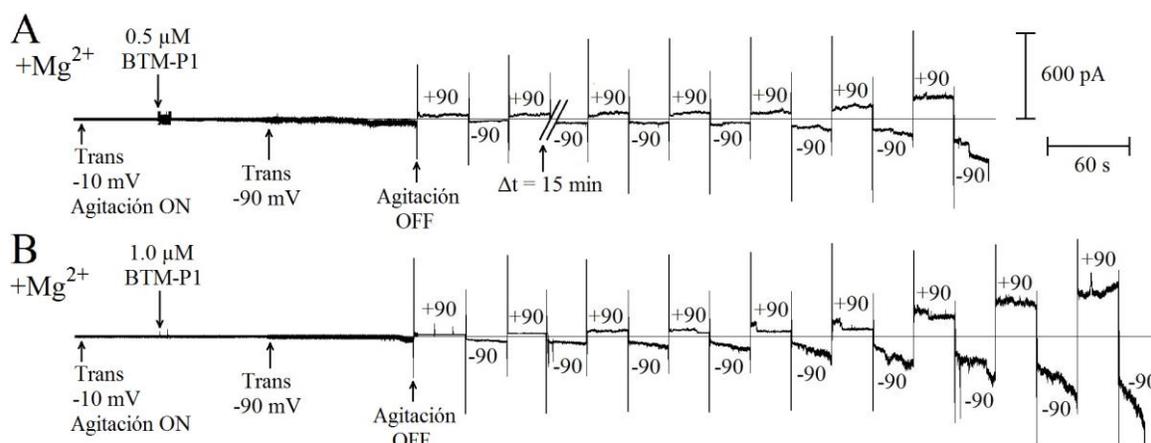


Fig. 5.9 Permeabilización potencial-dependiente de la bicapa lipídica plana (BLP) con el péptido BTM-P1 en medio salino con magnesio. La BLP fue formada usando una mezcla de POPC:POPE (6:4) (ver Métodos). El péptido BTM-P1 a las concentraciones 0.5 μM (A) y 1.0 μM (B) fue adicionado en el lado *cis* (Tierra) de la cubeta doble con agitación mientras fueron aplicados -10 mV en el lado *trans*, 1 minuto después se empezó a incrementar el potencial hasta -90 mV. Después de observar un incremento notable en la corriente eléctrica a través de la BLP, la agitación fue detenida y el potencial eléctrico en *trans* fue cambiado periódicamente ± 90 mV cada 30 segundos. El medio salino fue 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.0.

De igual manera se evaluó la actividad permeabilizadora potencial-dependiente de los péptidos anticancerígenos P7-4 y P7-5 (Fig. 5.10). Se muestra claramente que el péptido P7-5 para permeabilizar la membrana requirió de una concentración menor respecto a P7-4, lo cual indica que P7-5 es más activo.

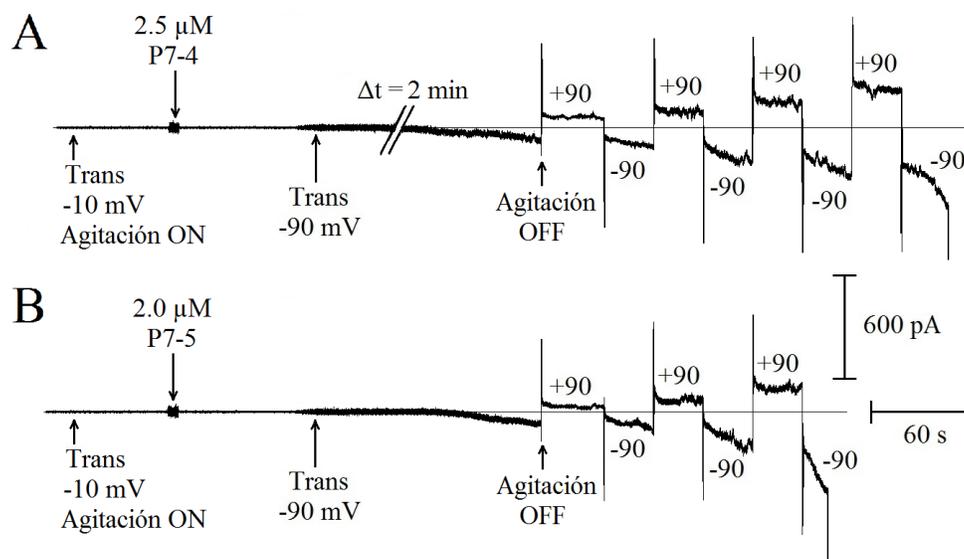


Fig. 5.10 Permeabilización potencial-dependiente de la bicapa lipídica plana (BLP) con los péptidos anticancerígenos P7-4 y P7-5. La BLP fue formada usando una mezcla de POPC:POPE (6:4) (ver Métodos). Los péptidos P7-4 y P7-5 fueron adicionados en las concentraciones 2.5 μM (A) y 2.0 μM (B) respectivamente en el lado *cis* (Tierra) de la cubeta doble de Teflón con agitación mientras fueron aplicados -10 mV en el lado *trans*. Aproximadamente 1 minuto después el potencial se incrementó cuidadosamente hasta -90 mV. Después de observar un incremento notable en la corriente eléctrica a través de la BLP, la agitación fue detenida y el potencial eléctrico en *trans* fue cambiado periódicamente ± 90 mV cada 30 segundos. El medio salino fue 100 mM KCl, 5 mM HEPES, pH 7.0.

En general los resultados confirman la actividad permeabilizadora potencial-dependiente de los péptidos, ya que durante *trans* negativo se incrementó la magnitud de la corriente como un indicador de la permeabilización de la membrana. Por otro lado, la permeabilización con péptido es susceptible al potencial superficial según lo observado con el Mg^{2+} , debido a una competencia electrostática entre este catión divalente y el péptido policatiónico para estar en la membrana.

5.5 Discusión

La necesidad de encontrar antibióticos alternativos ha sido motivada por la resistencia que han manifestado los microorganismos patógenos en los últimos años debido a su mutación (Woodford y Ellington 2007). La evolución de la vida ha desarrollado un sistema de defensa antimicrobiano llamado péptidos policatiónicos los cuales son específicos para

permeabilizar las membranas biológicas (Findlay et al. 2010). Los péptidos pueden formar poros a través de las membranas de las células, lo cual provoca la lisis celular y por lo tanto su muerte (Shai 1999). Por otro lado, los péptidos policatiónicos se han convertido en potenciales drogas para el tratamiento del cáncer (Mader y Hoskin 2006; Schweizer 2009; Gaspar et al. 2013) siendo así una alternativa ante otros tratamientos como la quimioterapia y la radioterapia.

Los péptidos policatiónicos fueron adicionados en el lado *cis* de la cubeta doble (ver Métodos) y la permeabilización fue favorable cuando la polaridad del potencial eléctrico en el lado *trans* fue negativo. La concentración de péptidos seleccionada para los experimentos fue la máxima posible que podía soportar la bicapa antes de su destrucción instantánea. El hecho de que la permeabilización con BTM-P1 fue favorable con *trans* negativo en BLP (Fig. 5.8A y B) es soportado con estudios en biomembranas donde el potencial transmembranal $\Delta\Psi$ generado con valinomicina y un gradiente de K^+ , negativo adentro, favoreció la permeabilización, lo cual fue seguido por un hinchamiento progresivo de la biomembrana y una disipación de $\Delta\Psi$ (Lemeshko et al. 2005; Arias et al. 2009; Lemeshko 2011; Lemeshko 2013; Lemeshko y Orduz 2013). La permeabilización con el péptido BTM-P4 fue más activa que con BTM-P1, se requirió de menos concentración de este péptido para permeabilizar la BLP (Fig. 5.8C y D), este hecho fue soportado con algunos resultados reportados en la patente (concedida en Colombia) de Orduz y Lemeshko (2016).

Para demostrar el efecto del potencial superficial sobre la actividad permeabilizadora del péptido policatiónico, se mostró que la presencia de un catión divalente como el Mg^{2+} en el medio salino ofreció cierta protección contra la permeabilización producida con BTM-P1. Este hecho se observó al comparar los resultados usando igual concentración de péptido en el medio salino con y sin Mg^{2+} (Fig. 5.9A y Fig. 5.8A). Se sabe que los cationes divalentes pueden ser adsorbidos en la membrana (Haynes y Staerk 1974; Träuble y Eibl 1974) y generar un apantallamiento electrostático sobre otras moléculas cargadas tales como péptidos policatiónicos por repulsión electrostática (MacKinnon y Miller 1989; MacKinnon et al. 1989). Debido a este hecho, se justifica por qué fue necesario adicionar más cantidad

de péptido BTM-P1 para recuperar la capacidad permeabilizadora respecto a aquella observada en medio sin Mg^{2+} (Fig. 5.9). La presencia de Mg^{2+} afecta a la concentración efectiva del péptido para permeabilizar la bicapa.

La permeabilización potencial-dependiente de la BLP con péptidos anticancerígenos (Fig. 5.10) reveló que P7-5 es más activo que P7-4; esto está en concordancia a lo observado previamente con mitocondrias y glóbulos rojos aislados (Lemeshko 2013).

En general, los resultados con BLP y los péptidos policatiónicos antimicrobianos BTM-P1 y BTM-P4, y anticancerígenos P7-4 y P7-5, revelaron que el potencial eléctrico negativo en *trans* fue favorable para la permeabilización de la bicapa; por otra parte, con un potencial eléctrico positivo en *trans* fue desfavorable (Fig. 5.8, 5.9 y 5.10), en algunos casos, la corriente eléctrica disminuyó en forma de decaimiento exponencial inmediatamente después de aplicar el potencial positivo, indicando un efecto reversible en la permeabilización de la membrana (Menestrina y Ropele 1989; Bullock et al. 1990). En algunos registros se mostró que la magnitud de la corriente eléctrica se incrementó durante *trans*(+) posiblemente porque algunas moléculas de péptido se alcanzaron a oligomerizar hasta formar un poro que se mantuvo durante *trans*(+) permitiendo el paso de la corriente eléctrica a través de la bicapa.

Para mostrar la permeabilización potencial-dependiente de otra forma con membrana artificial y péptidos policatiónicos, se realizaron experimentos con liposomas. Pero antes, se desarrolló un modelo computacional que permitió estudiar la distribución de la sonda catiónica fluorescente DiSC₃(5) para monitorear los cambios de potencial transmembranal en una suspensión de liposomas. Este modelo ofreció criterios para seleccionar las concentraciones de liposomas y DiSC₃(5) necesarias para los experimentos de permeabilización con péptidos policatiónicos. El modelo computacional y los experimentos con liposomas y péptidos están descritos en los dos siguientes capítulos.

6. MODELOS COMPUTACIONALES PARA MONITOREAR EL POTENCIAL TRANSMEMBRANAL DE VESÍCULAS LIPÍDICAS CON SONDAS DE FLUORESCENCIA: CASO DiSC₃(5)

6.1 Resumen

Las sondas fluorescentes cargadas son comúnmente utilizadas para monitorear el potencial transmembranal en vesículas de lípidos y membranas biológicas, los cuales han sido previamente descritos por varios modelos matemáticos. En el presente estudio, desarrollamos un modelo más completo basado en un análisis computacional realizado paso a paso sobre la influencia de varios factores, tales como potencial superficial, fuerza iónica, y las propiedades de agregación de la sonda catiónica DiSC₃(5) en la fase membrana y fases acuosas, además de la distribución Nernstiana de la sonda a través de la membrana y la interacción hidrofóbica con la bicapa lipídica. El modelo completo permite la predicción de las condiciones experimentales óptimas para monitorear el potencial transmembranal, tales como la relación sonda/lípido y la concentración de liposomas con un porcentaje dado de fosfolípidos cargados negativamente en la membrana, la fuerza iónica del medio acuoso, y el coeficiente de repartición “membrana-agua” y las propiedades de agregación de la sonda, como también el modo más adecuado de medir la fluorescencia. De acuerdo con varios estudios experimentales, este modelo mostró una sensibilidad alta al voltaje desde la cantidad de monómeros DiSC₃(5) en las fases acuosas, mostrando casi un decrecimiento exponencial con un incremento en el valor del potencial transmembranal. El modelo también mostró que usando la relación de la cantidad de monómeros DiSC₃(5) en las fases acuosas con la fase membrana es posible registrar cambios de voltaje con buena sensibilidad. Un nuevo parámetro combinado, la función logarítmica de dicha relación, demostró un cambio casi lineal dentro de un rango amplio de los cambios de potencial transmembranal.

6.2 Introducción

Las sondas cargadas lipofílicas fluorescentes son comúnmente utilizadas para monitorear los potenciales eléctricos transmembranales (Cohen y Salzberg 1978; Plášek y Hrouda 1991; Mishra et al. 2000; Solaini et al. 2007; Gerencser et al. 2012; Vekshin 2013; Hrynevich et al. 2015 y otros). La parte importante de tal monitoreo es la distribución Nernstiana de una sonda catiónica permeable a través de las membranas de las células (Ehrenberg et al. 1988; Klymchenko et al. 2006; Klapperstück et al. 2013), mitocondrias (Solaini et al. 2007; Perry et al. 2011; Perelman et al. 2012) y liposomas (Toyomizu et al. 2002; Chanturiya et al. 2004; Ytzhak et al. 2010), resultando en un cambio de las concentraciones de la sonda en las fases acuosas interna y externa y en la cantidad de sonda ligada a la membrana con propiedades ópticas alteradas (Sims et al. 1974; Salama et al. 1980; Ivkova et al. 1984; Cabrini y Verkman 1986a).

Varios modelos matemáticos han sido desarrollados para explicar los cambios potencial-dependientes sobre las propiedades ópticas de sondas cargadas permeables en vesículas de membrana (Ivkov et al. 1984; Cabrini y Verkman 1986b; Tomov 1986; Apell y Bersch 1987; Bunting et al. 1989; Clarke 1991; Plášek y Hrouda 1991; Epps et al. 1994; Ivashchuk-Kienbaum 1996; Portele et al. 1997; Gerencser et al. 2012). Los modelos más simples han sido basados sólo en la distribución Nernstiana de sondas cargadas fluorescentes que no se agregan y que cruzan la membrana (Ehrenberg et al. 1988; Gerencser et al. 2012; Klapperstück et al. 2013). Algunos modelos matemáticos avanzados, consideraron perfiles lineales específicos de tres etapas sobre el potencial eléctrico a través de la membrana, han sido propuestos para liposomas compuestos de fosfolípidos neutros (Ivkov et al. 1984; Apell y Bersch 1987 y referencias allí presentes).

Se sabe que el potencial superficial de membrana con bicapa lipídica negativa afecta la incorporación de sondas cargadas en la membrana (Haynes 1974; Krasne 1977; Krasne 1980b; Lemeshko 2014), en particular, la membrana lipídica contiene fosfolípidos aniónicos que se unen con 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide (DiSC₃(5)) con afinidad alta debido a la atracción electrostática de la sonda catiónica hacia la membrana, de esta

forma influye sobre su coeficiente de repartición entre las fases membrana y acuosa (Zeng et al. 1999). La interacción competitiva entre sondas fluorescentes positivamente cargadas y péptidos anfipáticos se ha mostrado en experimentos con mitocondrias y liposomas, y se ha descrito teóricamente desde un modelo computacional (Lemeshko 2014). Otros efectores sinérgicos, tales como un incremento en la incorporación de la sonda aniónica 1-anilino-8-naphthalenesulfonate (ANS^-) en la membrana en presencia de iones de calcio y magnesio (Haynes 1974), el palmitato/ Ca^{2+} que induce apertura de poro lipídico (Belosludtsev et al. 2015) y otros han sido también atribuidos a las modulaciones del potencial transmembranal.

Se ha sugerido que el *quenching* (desactivación de la fluorescencia) potencial-dependiente de DiSC₃(5) asociado a la célula es principalmente debido a la agregación de la sonda (Sims et al. 1974). Muchas otras sondas fluorescentes de cianina son conocidas por agregarse en medio acuoso (Kay et al. 1964; West y Pearce 1965; Sims et al. 1974) y en medio de membranas (Krasne 1980b; Cabrini y Verkman 1986b) disminuyendo notablemente su intensidad de fluorescencia afectando el monitoreo del potencial transmembranal (Waggoner et al. 1977; Vekshin 2013). Algunos efectos particulares de dimerización en las sondas cargadas permeables en la fase membrana sobre el monitoreo del potencial transmembranal han sido previamente considerados con varias aproximaciones en modelos sugeridos para vesículas de membrana (Cabrini y Verkman 1986b) y mitocondrias (Tomov 1986; Bunting et al. 1989).

Así, la adición de la distribución Nernstiana de la sonda cargada permeable a través de la membrana y sus interacciones hidrofóbicas con la bicapa lipídica, más varios factores mencionados arriba podrían influir en la intensidad de la fluorescencia de sondas fluorescentes sensibles al potencial, ampliamente utilizadas en estructuras de vesículas de membrana, produciendo, en algunos casos, una reflexión incorrecta de la magnitud del potencial transmembranal discutido por Vekshin (2013).

En el presente estudio, previamente publicado como una comunicación corta (Lemeshko y Alvarez, 2013), se realizó el análisis computacional sobre la distribución potencial-dependiente de los monómeros DiSC₃(5) entre la fase membrana y las fases acuosas interna y externa de los liposomas; dicho análisis se realizó evaluando paso a paso la influencia de varios factores como potencial superficial (generado por fosfolípidos cargados negativamente y por la adsorción de la sonda cargada en la membrana), la agregación de la sonda en la fase membrana y en las fases acuosas, y las concentraciones de la sonda y de los liposomas. El modelo más completo permite definir las condiciones experimentales y el modo más adecuado para monitorear el potencial transmembranal de liposomas con una sonda óptica potencial-dependiente.

6.3 Metodología

6.3.1 Algunas características de la suspensión de liposomas y descripción general de los modelos

El análisis computacional, paso a paso, de la distribución potencial-dependiente de la sonda catiónica DiSC₃(5) entre la fase membrana y las fases acuosas fue realizado usando varios modelos (Fig. 6.1) para 1 ml de suspensión hipotética de liposomas con un diámetro externo de 100 nm y un espesor de membrana de 5 nm. La mayoría de los cálculos fueron realizados a una concentración final de liposomas igual a 33 μ M de fosfolípidos, de acuerdo a las condiciones experimentales descritas por Zeng et al. (1999), y el medio acuoso compuesto de 150 mM NaCl. Para otras condiciones, las concentraciones de lípidos y la fuerza iónica del medio acuoso se indican en las leyendas de las figuras.

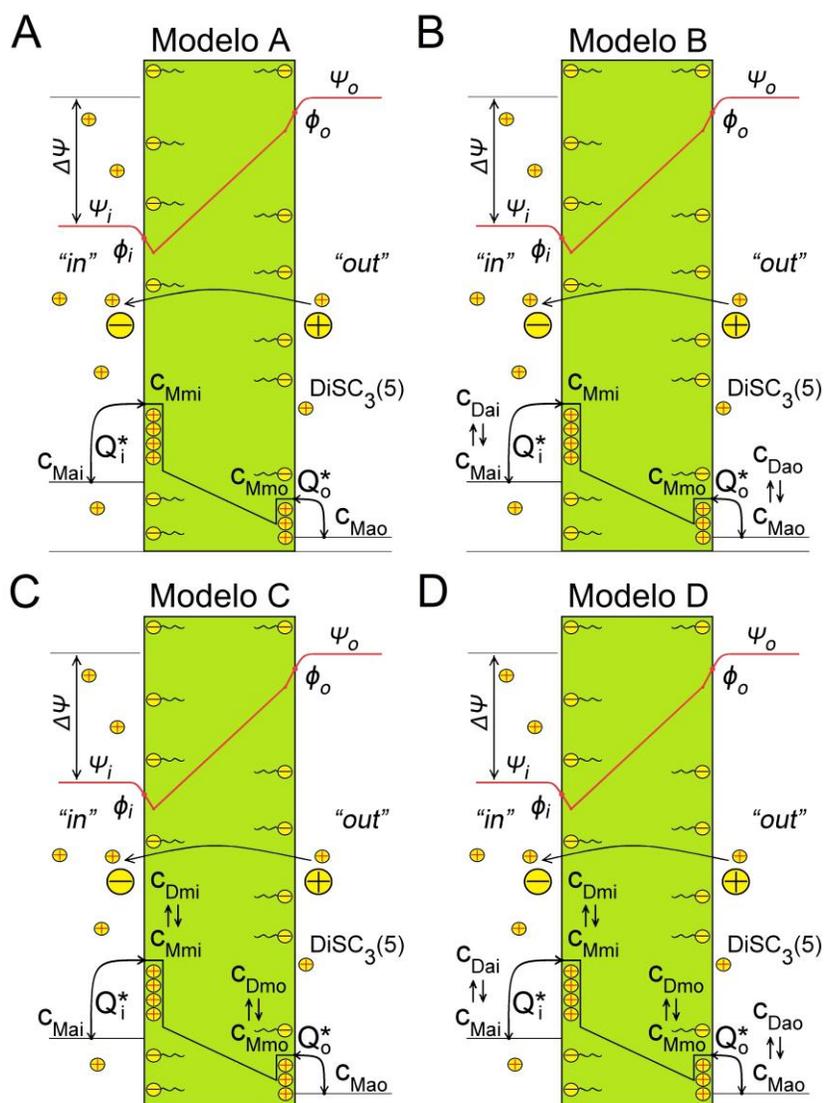


Fig. 6.1 Modelos para la distribución potencial-dependiente de la sonda catiónica $\text{DiSC}_3(5)$ entre las fases acuosas interna (*in*) y externa (*out*) de vesículas de membrana, como también entre las fases acuosas y las correspondientes monocapas de la membrana. **A** – modelo A, que representa la distribución Nernstiana de los monómeros $\text{DiSC}_3(5)$ a través de la membrana y sus reparticiones entre las fases membrana y acuosa dependiente de los potenciales superficiales en la monocapa interna (ϕ_i) y externa (ϕ_o) de la membrana de los liposomas. **B** – adicional al modelo A, el modelo B tiene en cuenta la dimerización de $\text{DiSC}_3(5)$ sólo en el medio acuoso; **C** – adicional al modelo A, el modelo C considera la dimerización de $\text{DiSC}_3(5)$ sólo en la membrana; **D** – adicional al modelo A, el modelo D tiene en cuenta la dimerización $\text{DiSC}_3(5)$ en ambos medios acuoso y membrana. C_{Mao} y C_{Mai} son las concentraciones de la sonda en la fase acuosa externa y en la fase acuosa interna, respectivamente; C_{Mmo} y C_{Mmi} son las concentraciones de la sonda en la monocapa externa y en la monocapa interna de la membrana, respectivamente; C_{Dao} y C_{Dai} son las concentraciones de la sonda en la fase acuosa interna y en la fase acuosa externa, respectivamente; C_{Dmo} y C_{Dmi} son las concentraciones de la sonda en la monocapa externa y en la monocapa interna de la membrana, respectivamente.

La densidad y la masa molecular de los fosfolípidos fueron tomadas como 1 g/ml y 750 g/mol, respectivamente (Tipping et al. 1979). En general, para un 1 ml de suspensión liposomal, el volumen total de la fase membrana (V_m) podría ser representado (en litros) como una función de la concentración de fosfolípidos (C_{phl}), en moles/litro, como:

$$V_m = 750 \cdot C_{phl} \cdot 10^{-6}, \quad (6.1)$$

El volumen total interno de liposomas (V_{ai}), para el caso general, fue determinado usando la relación:

$$V_{ai} = \frac{d_i^3}{d_o^3 - d_i^3} \cdot V_m, \quad (6.2)$$

donde d_o y d_i son los diámetros externo e interno (en nm), respectivamente. Además, para $C_{phl}=33 \mu\text{M}$, el volumen total V_m en 1 ml de suspensión liposomal es igual a 0,025 μl que representa el 27% del volumen total de liposomas, y el volumen acuoso interno total de liposomas $V_{ai}=0.068 \mu\text{l}$, determinado como $V_{ai}=(0.73/0.27) \cdot V_m$, de acuerdo a la Ec. 6.2. El volumen acuoso extra-liposomal (V_{ao}) para 1 ml de suspensión liposomal fue dado (en litros) como:

$$V_{ao} = 0.001 - V_m - V_{ai}, \quad (6.3)$$

6.3.2 Modelo que considera los cambios del potencial superficial de membrana (modelo A)

De acuerdo a los modelos más simples (Ehrenberg et al. 1988; Gerencser et al. 2012; Klapperstuck et al. 2013), la distribución Nernstiana de los monómeros DiSC₃(5) entre la fase acuosa interna (a la concentración C_{Mai}) y la fase acuosa externa (a la concentración C_{Mao}) de liposomas es expresada como:

$$\Delta\Psi = -\frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{C_{Mai}}{C_{Mao}}, \quad (6.4)$$

donde $\Delta\Psi$ es el potencial transmembranal, R es la constante universal de los gases, F es la constante de Faraday y T es la temperatura igual a 298 K.

El coeficiente de repartición aparente membrana-agua (Q) para los monómeros DiSC₃(5), debido a la interacción hidrofóbica con la membrana de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros, podría ser expresado como la relación de la concentración de sonda en la monocapa interna de la membrana (C_{Mmi}) respecto a la fase acuosa interna (C_{Mai}):

$$Q = \frac{C_{Mmi}}{C_{Mai}}, \quad (6.5)$$

también la razón de las concentraciones entre la monocapa lipídica externa (C_{Mmo}) respecto al de la fase acuosa externa (C_{Mao}):

$$Q = \frac{C_{Mmo}}{C_{Mao}}, \quad (6.6)$$

Para los cálculos, el valor de Q para la sonda DiSC₃(5) fue tomado como 10^4 , cercano al valor reportado por Ivkova et al. (1987).

La concentración promedio (C) para DiSC₃(5) en la suspensión liposomal puede ser expresada como:

$$C = \frac{M_a + M_m}{V_{ai} + V_{ao} + V_m}, \quad (6.7)$$

donde V_{ai} , V_{ao} y V_m son los volúmenes (en litros) definidos arriba, 1 ml en la suma. M_a y M_m son las cantidades de los monómeros DiSC₃(5) (en moles) en la fase membrana y en las fase acuosa, respectivamente, expresados como:

$$M_m = M_{mi} + M_{mo}, \quad (6.8)$$

y

$$M_a = M_{ai} + M_{ao}, \quad (6.9)$$

donde M_{mi} y M_{mo} son las cantidades molares de monómeros DiSC₃(5) en las monocapas interna y externa definidas como $M_{mi}=C_{Mmi} \cdot 0.5V_m$ y $M_{mo}=C_{Mmo} \cdot 0.5V_m$, respectivamente, y M_{ai} y M_{ao} son las cantidades molares de los monómeros de la sonda en las fases acuosas interna y externa, definidas como $M_{ai}=C_{ai} \cdot V_{ai}$ y $M_{ao}=C_{ao} \cdot V_{ao}$, respectivamente. Aquí

asumimos, por simplicidad, que los volúmenes de las monocapas lipídicas interna y externa son iguales.

Por lo tanto, el modelo computacional más simple, aplicable a las vesículas lipídicas compuestas de sólo fosfolípidos neutros eléctricamente, puede ser descrito por las Ecs. 6.1-6.9.

El modelo A (Fig. 6.1A) en comparación de los modelos más simples descritos arriba, permiten considerar la influencia de los potenciales superficiales (ϕ_i y ϕ_o , para las monocapas lipídicas interna y externa, respectivamente) resultante desde los fosfolípidos cargados negativamente (si están presentes) y la sonda cargada adsorbida sobre la monocapa lipídica correspondiente. Los nuevos coeficientes de repartición efectivos para los monómeros DiSC₃(5) para las interfaces “fase membrane-acuosa” interna y externa (Q_{mi}^* y Q_{mo}^* , respectivamente), mostrados en la Fig. 6.1A, incluyen el coeficiente Q y los factores exponenciales que describen la influencia de los correspondientes potenciales eléctricos de superficie (Lemeshko 2014):

$$Q_{mi}^* = Q \cdot e^{-\frac{F}{RT}\phi_i} = \frac{C_{Mmi}}{C_{Mai}}, \quad (6.10)$$

$$Q_{mo}^* = Q \cdot e^{-\frac{F}{RT}\phi_o} = \frac{C_{Mmo}}{C_{Mao}}, \quad (6.11)$$

Este modelo permite el análisis computacional de liposomas que contiene un porcentaje de fosfolípidos aniónicos (AP) de una carga por molécula (el cual cada uno ocupa un área de 70 \AA^2 , de acuerdo a McLaughlin et al. 2002). Si consideramos la sonda catiónica DiSC₃(5) adsorbida como una superficie monomolecular plana en cada monocapa lipídica de la membrana (Waggoner et al. 1977; Krasne 1980b), es decir, igual al área total de la membrana liposomal (A_s , en \AA^2), representado como $A_s = V_m \cdot 10^{27} \text{ \AA}^3 / 50 \text{ \AA}$ (donde V_m , en litros, es el volumen lipídico total definido arriba, Ec. 6.1), la densidad de carga superficial para la monocapa interna de la membrana (σ_{mi}), podría ser expresada (en cargas eléctricas por \AA^2) como:

$$\sigma_{mi} = \frac{M_{mi} \cdot N_A}{A_s} - \frac{0.01}{70\text{\AA}^2} \cdot AP, \quad (6.12)$$

y para la monocapa externa de la membrana (σ_{mo}) como:

$$\sigma_{mo} = \frac{M_{mo} \cdot N_A}{A_s} - \frac{0.01}{70\text{\AA}^2} \cdot AP, \quad (6.13)$$

donde N_A es el número de Avogadro, M_{mi} y M_{mo} son las cantidades molares de los monómeros DiSC₃(5) en las monocapas interna y externa de la membrana, respectivamente, definidos arriba, y A_s es el área total de membranas liposomales para 1 ml de la suspensión.

Por otra parte, de acuerdo a la ecuación de Grahame (ver Xu y Loew 2003), la densidad de carga superficial para la monocapa interna de la membrana (σ_{mi}) (cargas eléctricas por \AA^2) está relacionada con el potencial superficial de la monocapa interna de la membrana (ϕ_i):

$$\sigma_{mi} = \pm \left[2\varepsilon_r \varepsilon_0 RT \sum_i C_i \left(e^{-\frac{Z_i F}{RT} \phi_i} - 1 \right) \right]^{\frac{1}{2}}, \quad (6.14)$$

Similarmente, σ_{mo} está relacionada con el potencial superficial de la monocapa externa de la membrana (ϕ_o):

$$\sigma_{mo} = \pm \left[2\varepsilon_r \varepsilon_0 RT \sum_j C_j \left(e^{-\frac{Z_j F}{RT} \phi_o} - 1 \right) \right]^{\frac{1}{2}}, \quad (6.15)$$

Aquí, ε_r es la constante dieléctrica relativa del agua tomada como 78, ε_0 es la permitividad dieléctrica absoluta del vacío; Z_i y C_i son las valencias y concentraciones, respectivamente, de los iones “ i ” en la fase acuosa interna, Z_j y C_j son las valencias y concentraciones, respectivamente, de los iones “ j ” en la fase acuosa externa, R es la constante universal de los gases, F es la constante de Faraday y T es la temperatura tomada como 298 K.

6.3.3 Modelo que considera los cambios de potencial superficial de la membrana y la dimerización de la sonda en los medios acuosos (modelo B)

Respecto a las consideraciones descritas en el modelo A, el modelo B (Fig. 6.1B) considera la posibilidad de la agregación de la sonda solo en el medio acuoso, asumiendo que todos los agregados son representados sólo por dímeros. En este caso, la concentración promedio de DiSC₃(5) en la suspensión liposomal puede ser expresado como:

$$C = \frac{M_a + 2 \cdot D_a + M_m}{V_{ai} + V_{ao} + V_m}, \quad (6.16)$$

donde V_{ai} , V_{ao} y V_m son los volúmenes definidos arriba, 1 ml en la suma, y M_a y M_m son las cantidades molares de los monómeros DiSC₃(5) en la fase membrana y las fases acuosas, definidos por las Ecs. (6.8) y (6.9), respectivamente. D_a es la cantidad molar de los dímeros DiSC₃(5) en las fases acuosas en 1 ml de la suspensión liposomal, representado como la suma de las cantidades de dímeros DiSC₃(5) en las fases acuosas interna (D_{ai}) y externa (D_{ao}):

$$D_a = D_{ai} + D_{ao}, \quad (6.17)$$

donde $D_{ai} = C_{Dai} \cdot V_{ai}$ y $D_{ao} = C_{Dao} \cdot V_{ao}$, respectivamente. Aquí, C_{Dai} y C_{Dao} son las concentraciones de los dímeros DiSC₃(5) en los medios acuosos interno y externo, respectivamente. La constante de disociación de los dímeros, K_{DA} , para la fase acuosa correspondiente se expresa como:

$$K_{DA} = \frac{C_{Mai}^2}{C_{Dai}}, \quad (6.18)$$

y:

$$K_{DA} = \frac{C_{Mao}^2}{C_{Dao}}, \quad (6.19)$$

donde C_{Mai} y C_{Mao} son las concentraciones de los monómeros DiSC₃(5) en las fases acuosas interna y externa, respectivamente. K_{DA} fue tomado como 12.7 μ M, de acuerdo con Ivkova et al. (1983).

6.3.4 Modelo que considera los cambios del potencial superficial de membrana y la dimerización de la sonda en la fase-membrana (modelo C)

El modelo B considera la agregación de la sonda únicamente en el medio acuoso, pero el modelo C (Fig. 6.1C) sólo considera la agregación de la sonda en la fase membrana, asumiendo que todos los agregados son representados como dímeros. En este caso, la densidad de carga superficial para la monocapa interna de la membrana (σ_{mi}) puede ser expresado como:

$$\sigma_{mi} = \frac{(M_{mi} + 2D_{mi}) \cdot N_A}{A_s} - \frac{0.01}{70\text{\AA}^2} \cdot AP, \quad (6.20)$$

y para la monocapa externa de la membrana (σ_{mo}) como:

$$\sigma_{mo} = \frac{(M_{mo} + 2D_{mo}) \cdot N_A}{A_s} - \frac{0.01}{70\text{\AA}^2} \cdot AP, \quad (6.21)$$

Aquí, A_s , N_A , y AP son descritos arriba en la sección para el modelo modelo A (ver Ecs. 6.12 y 6.13), y D_{mi} y D_{mo} son las cantidades molares de los dímeros DiSC₃(5) en las monocapas interna y externa de la membrana, definidos como $D_{mi}=C_{Dmi} \cdot 0.5V_m$ y $D_{mo}=C_{Dmo} \cdot 0.5V_m$, respectivamente, donde C_{Dmi} y C_{Dmo} son las concentraciones de los dímeros DiSC₃(5) en las monocapas interna y externa de la membrana, respectivamente.

Para el modelo C, los potenciales de superficie de las monocapas interna y externa de la membrana (ϕ_i y ϕ_o), los cuales influyen en las interacciones de la sonda con la membrana (Ecs. 6.10 y 6.11), fueron calculados de acuerdo a las Ecs. 6.14, 6.15, 6.20 y 6.21, mostrando así la dependencia de los potenciales de superficie sobre el contenido de ambos monómeros y dímeros DiSC₃(5), como también del porcentaje de fosfolípidos aniónicos de una sola carga (AP) en la membrana.

En este caso, la concentración promedio de DiSC₃(5) en la suspensión liposomal podría ser expresada como:

$$C = \frac{M_a + 2 \cdot D_m + M_m}{V_{ai} + V_{ao} + V_m}, \quad (6.22)$$

donde D_m es la cantidad molar total de dímeros DiSC₃(5) en la fase membrana de la suspensión liposomal, expresado como la suma de las cantidades de dímeros DiSC₃(5) en las monocapas interna (D_{mi}) y externa (D_{mo}) de la membrana:

$$D_m = D_{mi} + D_{mo}, \quad (6.23)$$

De acuerdo con Cabrini y Verkman (1986b), la constante de disociación (K_D) para los dímeros DiSC₃(5) podría ser expresada para la monocapa interna de la membrana como:

$$K_D = \frac{M_{mi}^2}{D_{mi} \cdot L_{mi}}, \quad (6.24)$$

y para la monocapa externa de la membrana como:

$$K_D = \frac{M_{mo}^2}{D_{mo} \cdot L_{mo}}, \quad (6.25)$$

Donde L_{mi} y L_{mo} son las cantidades molares de fosfolípidos en 1 ml de la suspensión liposomal, expresado como $L_{mi} = C_{phl} \cdot 0.5 \cdot V_m$ y $L_{mo} = C_{phl} \cdot 0.5 \cdot V_m$, donde C_{phl} y V_m fueron definidos arriba. De acuerdo con Faria et al. (1990), fue deducido que $K_D = 0.03$.

6.3.5 Modelo que considera los cambios de potencial superficial de membrana y la dimerización de la sonda en las fases acuosas y en la membrana (modelo D)

El modelo D (Fig. 6.1D) considera las posibilidades de la dimerización de la sonda en la membrana como también en el medio acuoso, simultáneamente. Adicional a las Ecs. 6.1-6.11, 6.14, 6.15, 6.17-6.21 y 6.23-6.25, las cuales fueron descritas en los modelos B y C, la concentración promedio de DiSC₃(5) en la suspensión liposomal para el modelo D fue presentado como:

$$C = \frac{M_a + 2 \cdot D_a + 2 \cdot D_m + M_m}{V_{ai} + V_{ao} + V_m}, \quad (6.26)$$

en vez de la Ec. (6.22) usada para el modelo C. Aquí, M_a , M_m , D_a , D_m , V_{ai} , V_{ao} y V_m están definidas arriba.

Los cálculos fueron realizados para 150 mM NaCl o 15 mM NaCl en el medio acuoso de la suspensión liposomal con el propósito de evaluar la influencia de la fuerza iónica sobre los cambios dependientes del potencial $\Delta\Psi$ en las cantidades del DiSC₃(5) ligado a la membrana y en la fases acuosas.

Los modelos fueron analizados computacionalmente usando MathCad Professional-2001i software.

6.4 Resultados

El análisis computacional de los modelos mostrados en la Fig. 6.1 fue realizado calculando la distribución dependiente del potencial de la sonda catiónica permeable a través de la membrana, DiSC₃(5), en su forma monomérica entre las fases membrana (M_m) y acuosas (M_a). El modelo A (Fig. 6.1A) permite los cálculos que tienen en cuenta la carga superficial de la membrana, la cual depende de la presencia de fosfolípidos cargados y/o de la sonda cargada adsorbida. El modelo B, C y D tienen en cuenta, además, la influencia de los procesos de agregación de la sonda DiSC₃(5) sólo en las fases acuosas (Fig. 6.1B), sólo en la fase membrana (Fig. 6.1C), o ambos (Fig. 6.1D), respectivamente.

Los cálculos realizados de acuerdo al modelo A para la suspensión de lipomas compuestos de fosfolípidos neutros 33 μ M, a 150 mM NaCl en las fases acuosas, mostraron cambios recíprocos dependientes del $\Delta\Psi$ en M_m y M_a , bien expresados para ambas concentraciones 0.2 μ M y 2.0 μ M DiSC₃(5) en la suspensión liposomal (Fig. 6.2, AP=0%). El punto de intersección de las curvas M_m y M_a , está cerca de $\Delta\Psi=-50$ mV a 0.2 μ M DiSC₃(5), desplazado a $\Delta\Psi=-70$ mV, aproximadamente, a 2.0 μ M DiSC₃(5).

Para los liposomas conteniendo 10% de fosfolípidos de una carga, ambos puntos de intersección se desplazaron significativamente a valores más bajos de $\Delta\Psi$ (Fig. 6.2, $AP=10\%$). Este efecto fue más significativo a la concentración 20% de fosfolípidos aniónicos (Fig. 6.2, $AP=20\%$), debido a un incremento en la fracción de monómeros DiSC₃(5) ligados a la membrana (M_m) y una disminución en la cantidad de sonda en las fases acuosas (M_a) (Fig. 6.2).

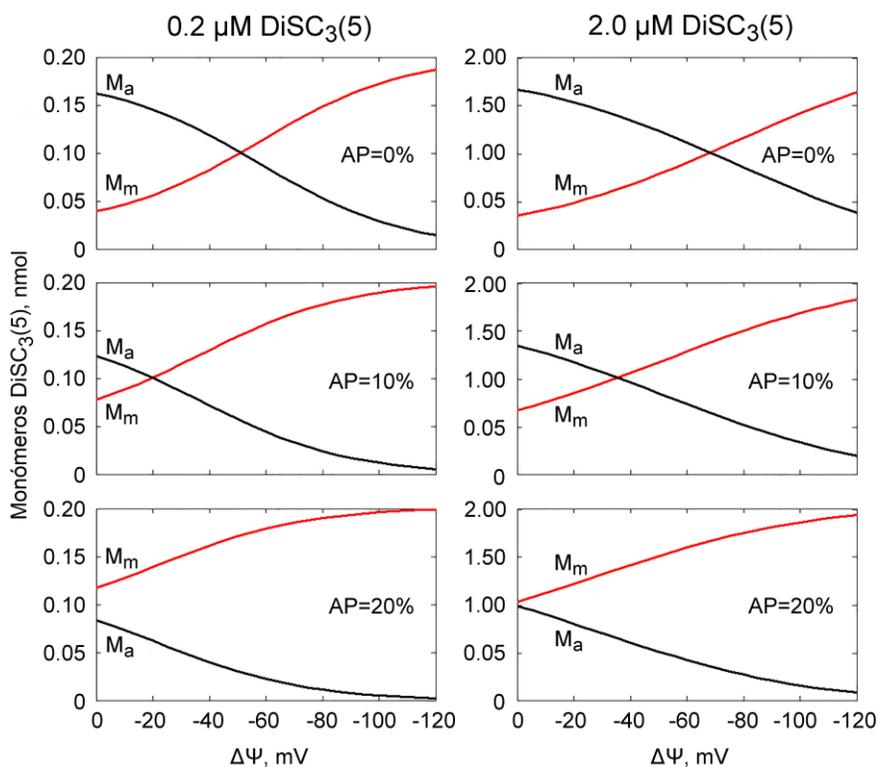


Fig. 6.2 Modelos de distribución potencial-dependiente en las cantidades de los monómeros DiSC₃(5) en la fase membrana (M_m) y en las fases acuosas (M_a , interna y externa) de una suspensión de liposomas compuesta de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) y aniónicos a ($AP=10\%$ o $AP=20\%$), de acuerdo al modelo A (Fig. 6.1A). Los cálculos fueron realizados a las concentraciones promedio de 0.2 μM y 2.0 μM de DiSC₃(5) para 1 ml de una suspensión de liposomas a una concentración de 33 μM de fosfolípidos. Los medios acuosos internos y externos liposomales fueron tomados como 150 mM NaCl.

Ya que los efectos descritos arriba dependen de la concentración de la sonda DiSC₃(5) y de la presencia de fosfolípidos cargados negativamente, éstos se podrían relacionar con los cambios de densidad de carga superficial. Los cálculos realizados de acuerdo al modelo A para liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) bajo las condiciones descritas

en la Fig. 6.2, demostraron que el cambio $\Delta\Psi$ desde 0 a -120 mV conducen a un incremento notable en el potencial superficial de la monocapa interna de la membrana (ϕ_i) y a una disminución marcada en el potencial superficial de la monocapa externa de la membrana (ϕ_o) (Fig. 6.3, $AP=0\%$) un incremento en ϕ_i desde 0.4 mV a 4.0 mV para 0.2 μM DiSC₃(5) y de 4 mV a 32 mV para 2.0 μM DiSC₃(5), mientras que los valores de ϕ_o disminuyeron a casi 0 mV para ambas concentraciones de la sonda.

Para liposomas cargados negativamente y $\Delta\Psi=0$ mV, ambos potenciales de superficie fueron negativos, iguales a -23.5 mV y -18.0 mV en la presencia de 0.2 μM DiSC₃(5) y 2.0 μM DiSC₃(5), respectivamente (Fig. 6.3, $AP=10\%$), o -43.4 mV y -36.0 mV, respectivamente (Fig. 6.3, $AP=20\%$). En la presencia de 0.2 μM DiSC₃(5), un incremento en el valor de $\Delta\Psi$ a -120 mV causó cierta disminución en los valores negativos de ϕ_i para ambos liposomas $AP=10\%$ y $AP=20\%$, mientras a 2.0 μM DiSC₃(5), un incremento en $\Delta\Psi$ proveyó cambios significativamente más altos para el caso de liposomas $AP=10\%$, o por lo menos causó una disminución notable en el valor negativo de ϕ_i para liposomas $AP=20\%$ (Fig. 6.3, $AP=10\%$ y $AP=20\%$, respectivamente). Lo opuesto y cambios relativamente pequeños fueron determinados para el potencial superficial de la monocapa externa de la membrana, ϕ_o , de liposomas $AP=10\%$ y $AP=20\%$ (Fig. 6.3).

Los modelos presentados aquí permitieron hacer estimaciones de los posibles efectos de la agregación de la sonda DiSC₃(5) en las fases acuosas y en la fase membrana, separadamente o para ambas fases simultáneamente. Para el caso de la agregación de la sonda DiSC₃(5) sólo en las fases acuosas, de acuerdo al modelo B (Fig. 6.1B), los cálculos demostraron que este proceso esencialmente no influyó en los datos de M_m y M_a para liposomas $AP=0\%$, $AP=10\%$, y $AP=20\%$ a 0.2 μM DiSC₃(5) (Fig. 6.4 en comparación con la Fig. 6.2). Por otra parte, a 0.2 μM de DiSC₃(5), solo la agregación en las fases acuosas causó un decrecimiento notable en M_a a valores negativos bajos de $\Delta\Psi$, especialmente para el caso de liposomas $AP=0\%$, mostrando un efecto relativamente pequeño de M_a a valores altos de $\Delta\Psi$ (Fig. 6.4 en comparación con Fig. 6.2). De acuerdo al modelo B, la formación de los dímeros DiSC₃(5) en las fases acuosas (D_a) fue más alta para una suspensión de liposomas $AP=0\%$ que para liposomas $AP=10\%$ o $AP=20\%$ (Fig. 6.4).

Para el modelo C (Fig. 6.1C), los cálculos revelaron que la agregación de la sonda DiSC₃(5) sólo en la fase membrana causó una notable disminución en M_m a altos valores de $\Delta\Psi$ inclusive a una concentración de 0.2 μM DiSC₃(5) (Fig. 6.5), en comparación con el modelo B (Fig. 6.4). Dicha agregación fue altamente expresada para el caso de liposomas conteniendo fosfolípidos aniónicos, mostrando un efecto de saturación dependiente de $\Delta\Psi$ en el incremento de M_m (Fig. 6.5). A 2.0 μM de DiSC₃(5) y a valores altos de $\Delta\Psi$, ambos M_m y M_a fueron significativamente disminuidos (Fig. 6.5), en comparación con los resultados del modelo B (Fig. 6.4), debido a la formación de una cantidad alta de D_m en la fase membrana (Fig. 6.5).

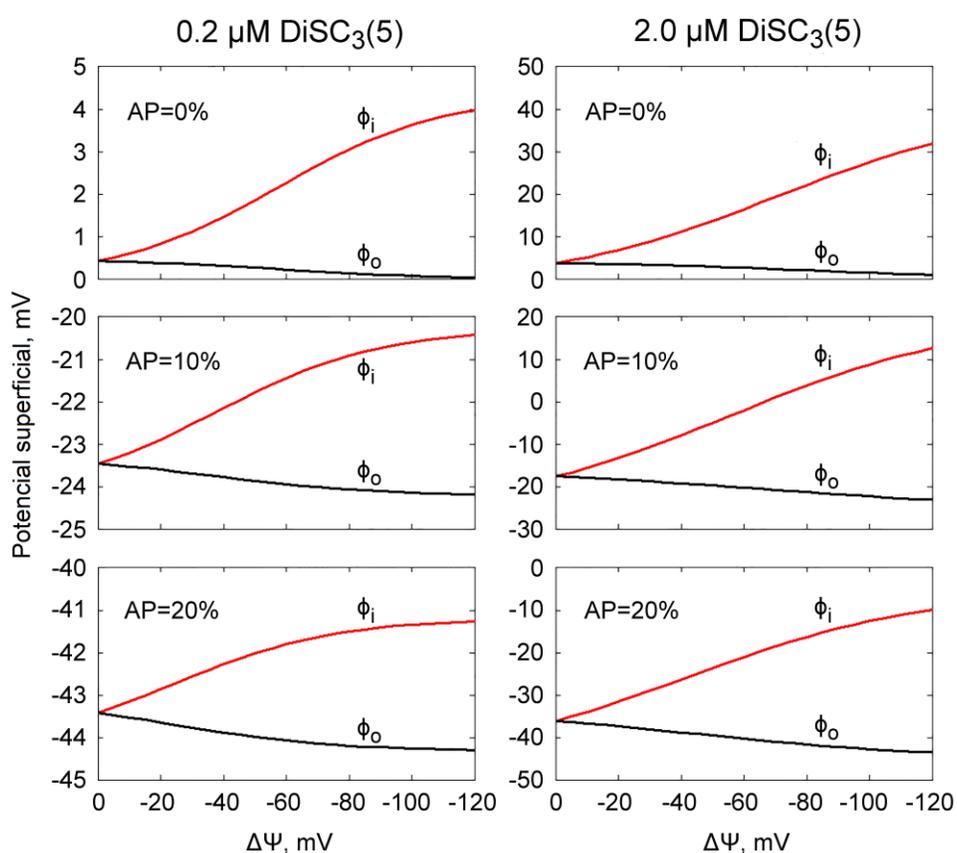


Fig. 6.3 Cambios dependientes del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) en los potenciales superficiales de las monocapas interna (ϕ_i) y externa (ϕ_o) de la membrana de los liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) y aniónicos ($AP=10\%$ o $AP=20\%$), de acuerdo al modelo A (Fig. 6.1A). Los cálculos fueron realizados a las concentraciones promedio 0.2 μM y 2.0 de μM DiSC₃(5) para 1 ml de una suspensión de liposomas a una concentración de 33 μM de fosfolípidos. Los medios acuosos interno y externo liposomales fueron considerados como 150 mM NaCl.

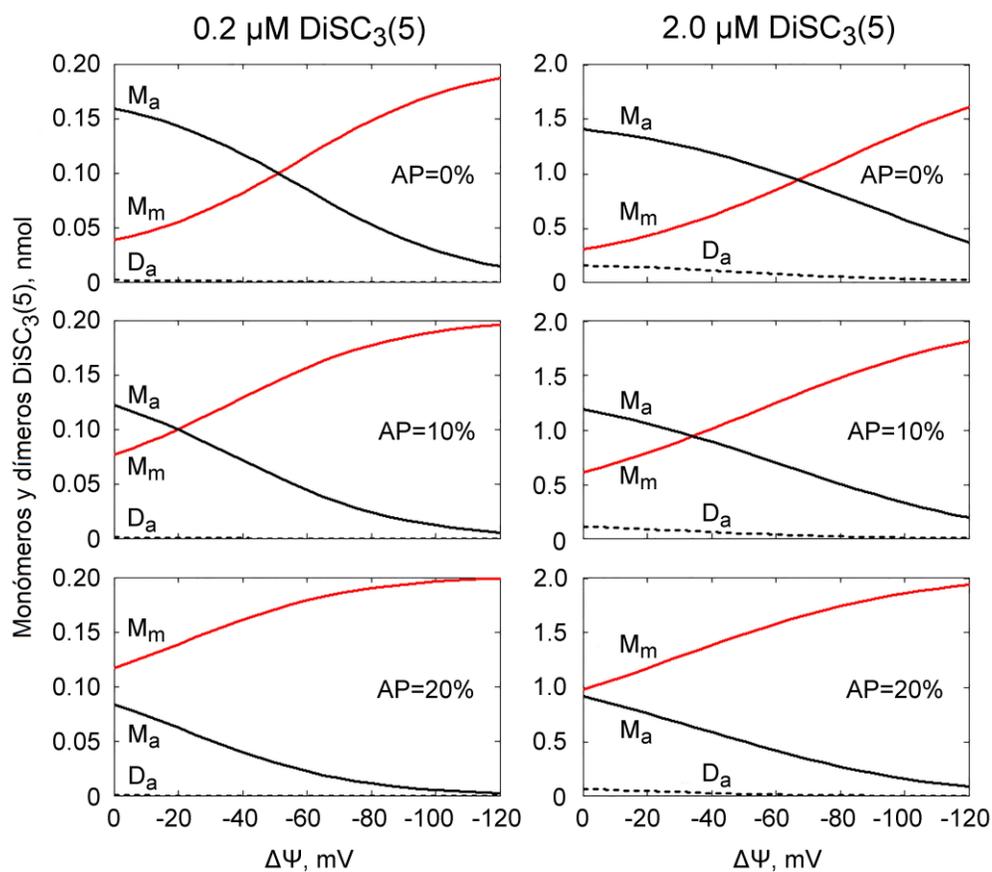


Fig. 6.4 Cambios dependientes del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) en las cantidades de monómeros DiSC₃(5) en la membrana (M_m) y en las fases acuosas (M_a , interna y externa), como de los dímeros en las fases acuosas (D_a , interna y externa) de una suspensión de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) y aniónicos ($AP=10\%$ o $AP=20\%$), de acuerdo al modelo B (Fig. 6.1B). Los cálculos fueron realizados a la concentración promedio de $0.2\ \mu\text{M}$ y $2.0\ \mu\text{M}$ de DiSC₃(5) para 1 ml de una suspensión de liposomas a una concentración de $33\ \mu\text{M}$ de fosfolípidos. Los medios acuosos interno y externo fueron considerados para ser 150 mM NaCl.

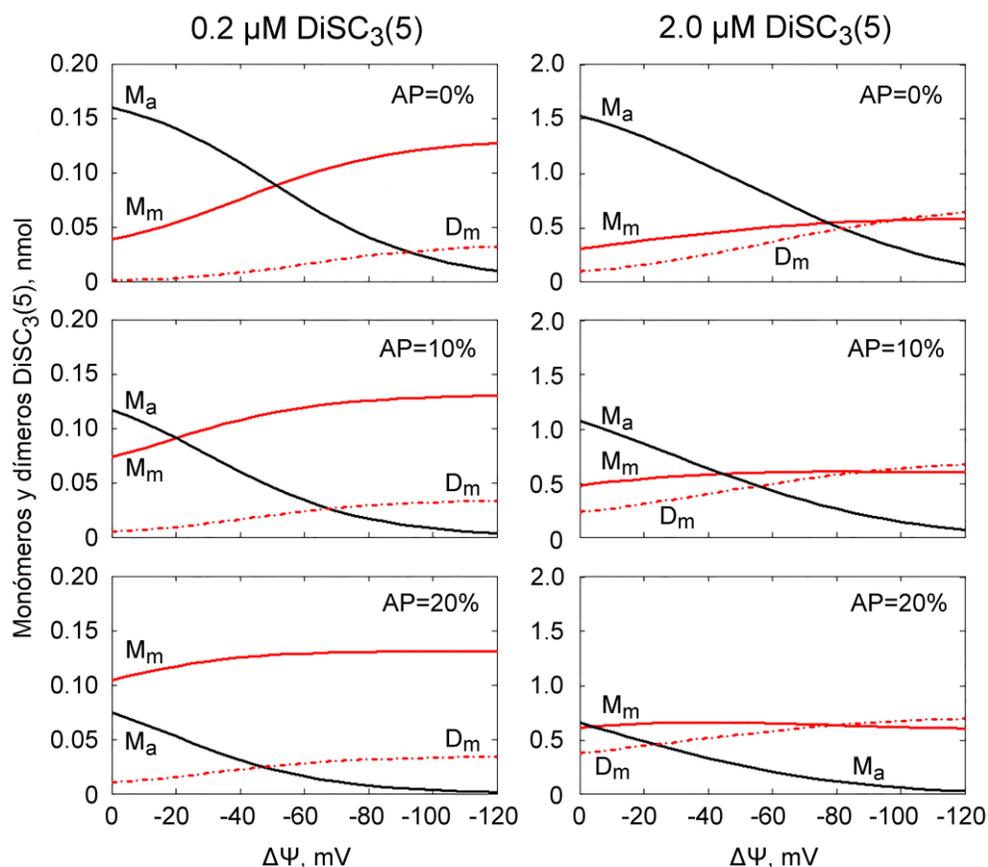


Fig. 6.5 Cambios dependientes del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) en las cantidades de monómeros DiSC₃(5) en la membrana (M_m) y en las fases acuosas (M_a , interna y externa), como también de dímeros DiSC₃(5) en la fase membrana (D_m) de una suspensión de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) y aniónicos ($AP=10\%$ o $AP=20\%$), de acuerdo al modelo C (Fig. 6.1C). Los cálculos fueron realizados a concentraciones promedios de 0.2 μM y 2.0 μM de DiSC₃(5) para 1 ml de una suspensión de liposomas a una concentración de 33 μM fosfolípidos. Los medios acuosos interno y externo liposomales fueron considerados para ser 150 mM NaCl.

Para el modelo D (Fig. 6.1D), los cambios potencial-dependientes calculados en M_m , D_m , y M_a a 0.2 μM de DiSC₃(5) (Fig. 6.6) fueron muy similares a aquellos obtenidos para el modelo C (Fig. 6.5), para las suspensiones de liposomas $AP=0\%$, $AP=10\%$, y $AP=20\%$. Por otra parte, a 2.0 μM DiSC₃(5) y valores bajos de $\Delta\Psi$, las cantidades M_a calculadas para el modelo D (Fig. 6.6) fueron esencialmente menores que aquellas calculadas para el modelo C (Fig. 6.5), especialmente en el caso de la suspensión de liposomas $AP=0\%$. Esto fue debido a la formación altamente expresada de los dímeros DiSC₃(5) en las fases acuosas D_a . Con respecto a esto, los valores de D_a para el modelo D (Fig. 6.6) fue similar a aquellos

calculados para el modelo B (Fig. 6.4) a $0.2 \mu\text{M}$ DiSC₃(5), y esencialmente más bajo que para el modelo B a $2.0 \mu\text{M}$ DiSC₃(5), especialmente para liposomas $AP=10\%$ y $AP=20\%$.

El modelo D también reveló un efecto de saturación fuerte en un incremento de M_m con un incremento en el valor de $\Delta\Psi$, especialmente para liposomas $AP=10\%$ y $AP=20\%$ resultando en la dimerización intramembranal de DiSC₃(5) (Fig. 6.6).

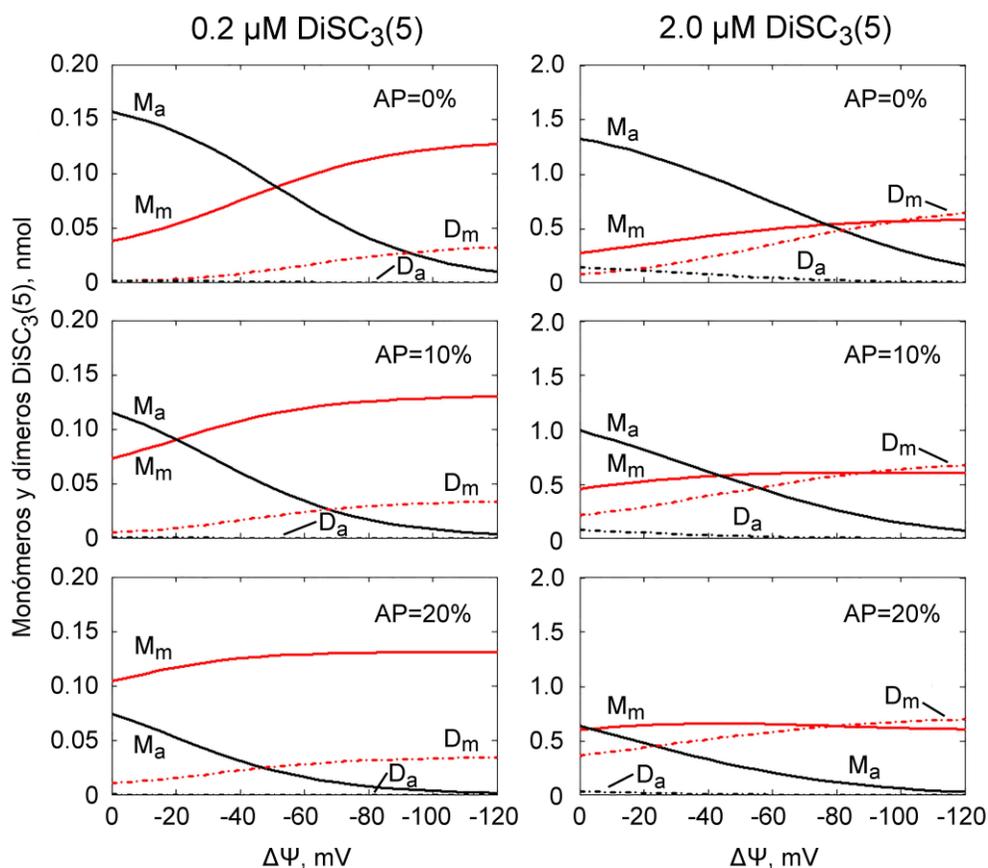


Fig. 6.6 Cambios dependientes del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) en las cantidades de monómeros DiSC₃(5) en la membrana (M_m) y en las fases acuosas (M_a , interna y externa), como también de dímeros DiSC₃(5) en la membrana (D_m) y en la fases acuosas (D_a , interna y externa) de una suspensión de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) y aniónicos ($AP=10\%$ o $AP=20\%$), de acuerdo al modelo D (Fig. 6.1D). Los cálculos fueron realizados a las concentraciones promedio de $0.2 \mu\text{M}$ y $2.0 \mu\text{M}$ de DiSC₃(5) para 1 ml de una suspensión de liposomas a una concentración de $33 \mu\text{M}$ fosfolípidos. Los medios acuosos interno y externo fueron 150 mM NaCl.

La influencia del tamaño liposomal ($0.1 \mu\text{m}$, $1.0 \mu\text{m}$ y $10.0 \mu\text{m}$ en diámetro) sobre los cambios dependientes de $\Delta\Psi$ en los monómeros de las fases acuosas M_a fueron estimados

para $\Delta\Psi$ de 0 mV, -60 mV y -120 mV, a la concentración fijada de fosfolípidos, 33 μM ($AP=0\%$ y $AP=20\%$), y la concentración DiSC₃(5) de 0.2 μM y 2.0 μM en la suspensión liposomal. Como se muestra en la Tabla 6.1 para 0.2 μM DiSC₃(5) y en la Tabla 6.2 para 2.0 μM DiSC₃(5), resultados muy similares fueron obtenidos para liposomas 0.1 μm y 1.0 μm los cuales fueron determinados a $\Delta\Psi=-120$ mV a ambas concentraciones de 0.2 μM (Tabla 6.1) y 2.0 μM (Tabla 6.2) de DiSC₃(5).

Tabla 6.1 Influencia del tamaño de los liposomas sobre la cantidad de monómeros DiSC₃(5) en las fases acuosas (M_a , interna y externa) según el potencial transmembranal $\Delta\Psi$ en una suspensión de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP\%=0$) o aniónicos ($AP\%=20$). Se utilizaron 33 μM de fosfolípidos y 0.2 μM de DiSC₃(5) para los cálculos.

Liposomas		M_a , pmol (y el porcentaje con respecto a $\Delta\Psi=0$ mV)		
AP%	Diámetro, μm	0 mV	-60 mV	-120 mV
0	0.1	157	72 (46%)	10 (6%)
	1.0	157	72 (46%)	11 (7%)
	10.0	157	76 (48%)	19 (12%)
20	0.1	75	16 (22%)	2 (2%)
	1.0	75	16 (22%)	2 (2%)
	10.0	75	18 (24%)	3 (4%)

Tabla 6.2 Influencia del tamaño de los liposomas sobre la cantidad de monómeros DiSC₃(5) en las fases acuosas (M_a , interna y externa) según el potencial transmembranal $\Delta\Psi$ en una suspensión de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP\%=0$) o aniónicos ($AP\%=20$). Se utilizaron 33 μM de fosfolípidos y 2.0 μM de DiSC₃(5) para los cálculos.

Liposomas		M_a , pmol (y el porcentaje con respecto a $\Delta\Psi = 0$ mV)		
AP%	Diámetro, μm	0 mV	-60 mV	-120 mV
0	0.1	1321	737 (56%)	159 (12%)
	1.0	1322	738 (56%)	166 (13%)
	10.0	1325	744 (56%)	228 (17%)
20	0.1	632	204 (32%)	28 (5%)
	1.0	632	205 (32%)	31 (5%)
	10.0	635	218 (34%)	54 (9%)

En general, el modelo D mostró que la presencia de fosfolípidos aniónicos ($AP=10\%$ y $AP=20\%$) en la membrana liposomal conduce a una disminución notable en los monómeros y dímeros de DiSC₃(5) en las fases acuosas, comparado con los liposomas compuestos de sólo lípidos neutros ($AP=0\%$) (Fig. 6.6). La presencia de fosfolípidos aniónicos influye en el potencial superficial de membrana, el cual es conocido por depender de la fuerza iónica (McLaughlin y Harary 1974; Toner et al. 1988; Xu y Loew 2003; Lemeshko 2014). Para los cálculos de los potenciales superficiales ejecutados de acuerdo al modelo completo D (Fig. 6.7), la presencia de un 20% de fosfolípidos aniónicos de una carga en la membrana permitió la generación de los potenciales de superficie ϕ_i y ϕ_o en los liposomas igual a -44.3 mV en un medio con 150 mM NaCl, e igual a -93.8 mV en un medio con 15 mM NaCl, en la ausencia de DiSC₃(5) (Fig. 6.7). Un cambio significativo adicional en ϕ_i , con cambios relativamente pequeños en ϕ_o , especialmente a fuerza iónica baja y concentración promedio DiSC₃(5) relativamente alta, tomó lugar debido a la adsorción de la sonda en la monocapa interna de la membrana seguido de una acumulación dependiente de $\Delta\Psi$ de esta sonda catiónica dentro de los liposomas (Fig. 6.7).

Luego, para el modelo completo D, estimamos la influencia de la cantidad de liposomas, que en otras palabras es la concentración de fosfolípidos (10-100 μM), sobre $\Delta\Psi$ para M_a y M_m . Los cálculos realizados para la fuerza iónica fisiológica (150 mM NaCl) a 2.0 μM DiSC₃(5) demostraron una sensibilidad alta al voltaje del parámetro M_a , en comparación con el de M_m , para el caso de concentraciones altas de fosfolípidos (50-100 μM), mostrando una disminución dependiente de $\Delta\Psi$ esencialmente exponencial en M_a en el rango de cambio $\Delta\Psi$ hasta aproximadamente -80 mV, (Fig. 6.8, medio 150 mM NaCl). Por otra parte, disminuyendo la concentración de liposomas (20-40 μM fosfolípidos), el rango de sensibilidad al voltaje para M_a se extendió a valores más altos de $\Delta\Psi$, a por lo menos -120 mV o más alto, aunque con una sensibilidad al voltaje más baja (Fig. 6.8, medio 150 mM NaCl).

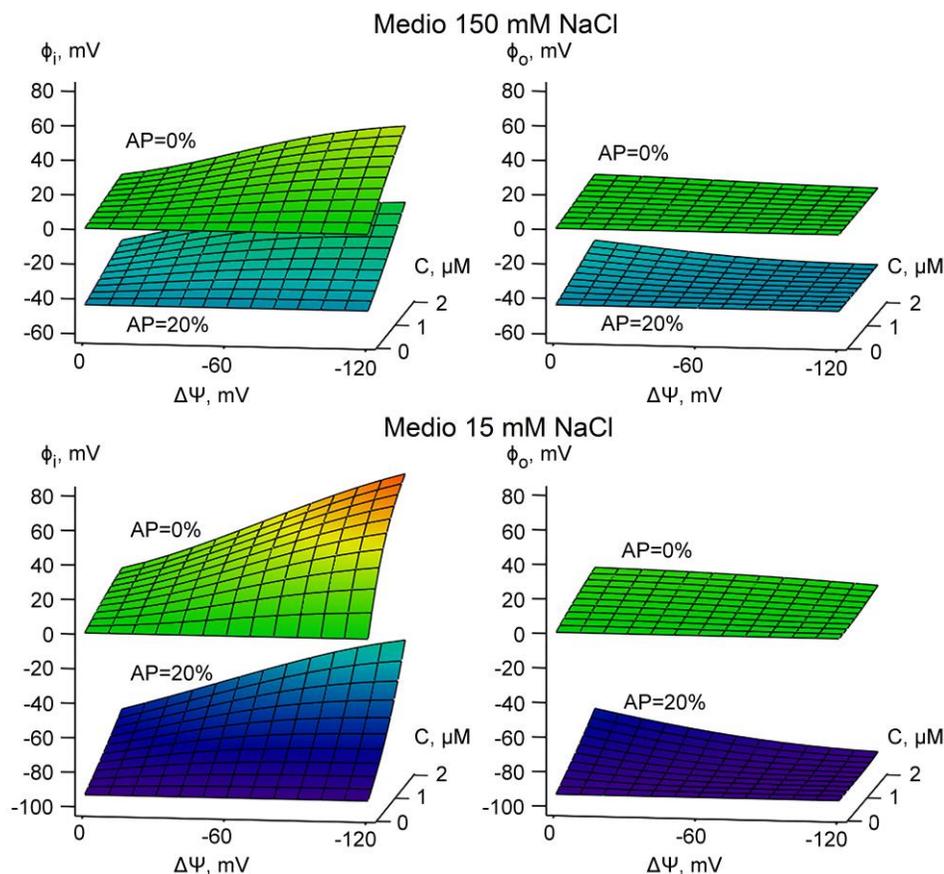


Fig. 6.7 Cambios dependientes del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) en los potenciales de superficie de las monocapas interna (ϕ_i) y externa (ϕ_o) de la membrana de los liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) y aniónicos ($AP=20\%$), de acuerdo al modelo D (Fig. 6.1D). Los cálculos fueron realizados a 0-2 μM DiSC₃(5) para 1 ml de una suspensión de liposomas a una concentración de 33 μM de fosfolípidos. Los medios acuosos interno y externo fueron considerados 150 mM NaCl o 15 mM NaCl.

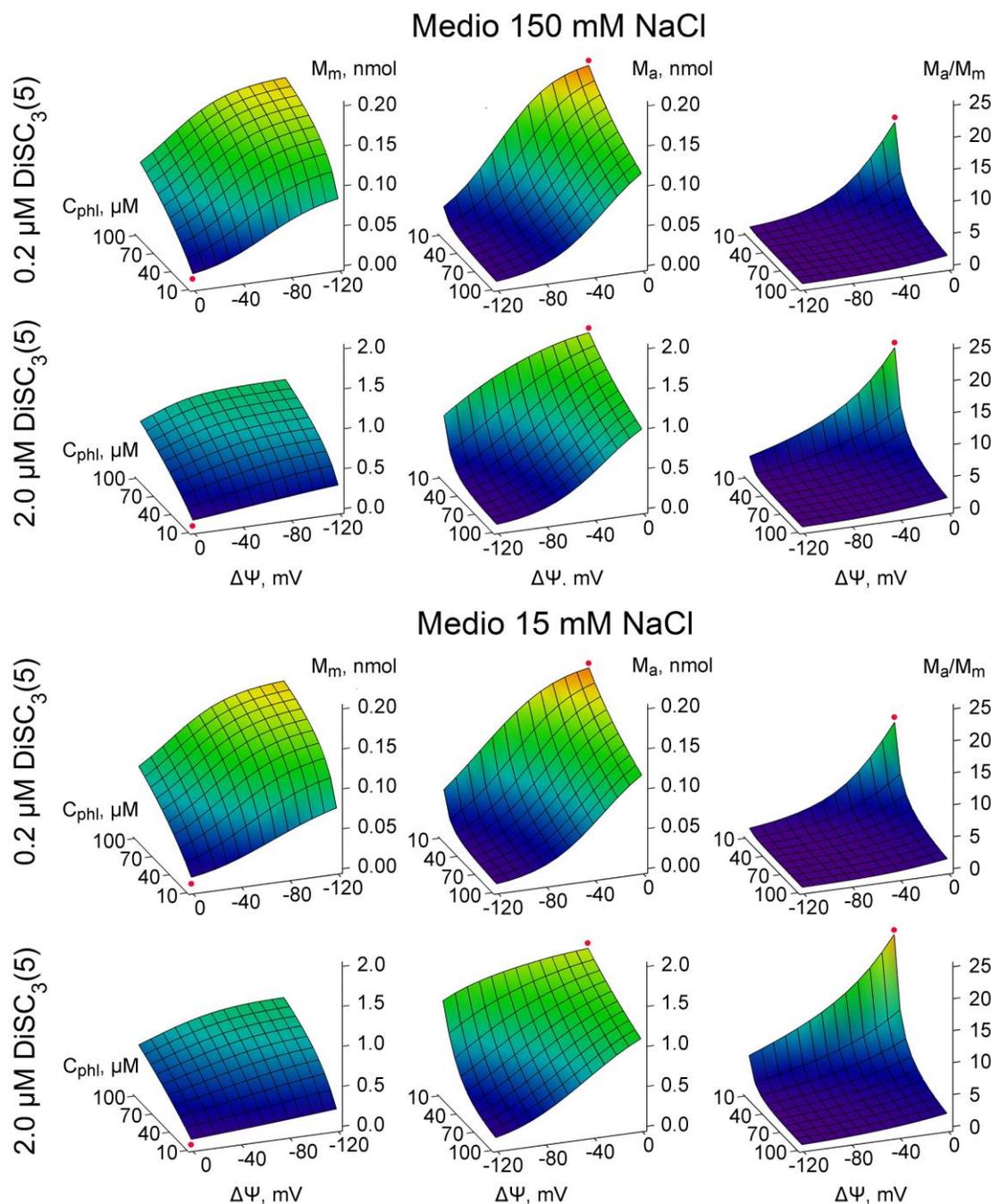


Fig. 6.8 Cambios dependientes del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) en las cantidades de monómeros DiSC₃(5) en la membrana (M_m) y en las fases acuosas (M_a , interna y externa), como también de la razón M_a/M_m en una suspensión de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros a una concentración (C_{phl}) de 10-100 μM . Los cálculos fueron realizados a 0.2 y 2.0 μM DiSC₃(5) para 1 ml de suspensión liposomal. Los medios acuosos interno y externo liposomales fueron considerados a 150 mM NaCl o 15 mM NaCl. Los puntos en las esquinas de las superficies corresponden a los valores mínimos para $\Delta\Psi$ y C_{phl} .

A $0.2 \mu\text{M}$ DiSC₃(5), la sensibilidad alta al voltaje de M_a fue extendida a concentraciones más bajas de liposomas (20-100 μM fosfolípidos) en ambos medios de fuerza iónica alta y baja (Fig. 6.8). Además, a $0.2 \mu\text{M}$ DiSC₃(5), la sensibilidad relativamente alta al voltaje fue también mostrada para el parámetro M_m (Fig. 6.8).

Por otra parte, la sensibilidad al voltaje de M_a y M_m para valores $\Delta\psi$ hasta de -30 a -40 mV fue más baja que para el rango entre -40 y -70 mV, aproximadamente. No obstante, la relación M_a/M_m mostró una sensibilidad más alta al voltaje a valores bajos de $\Delta\psi$, el cual fue claramente mostrado para concentraciones bajas de liposomas (10-30 μM fosfolípidos) a la concentración $0.2 \mu\text{M}$ de la sonda (Fig. 6.8).

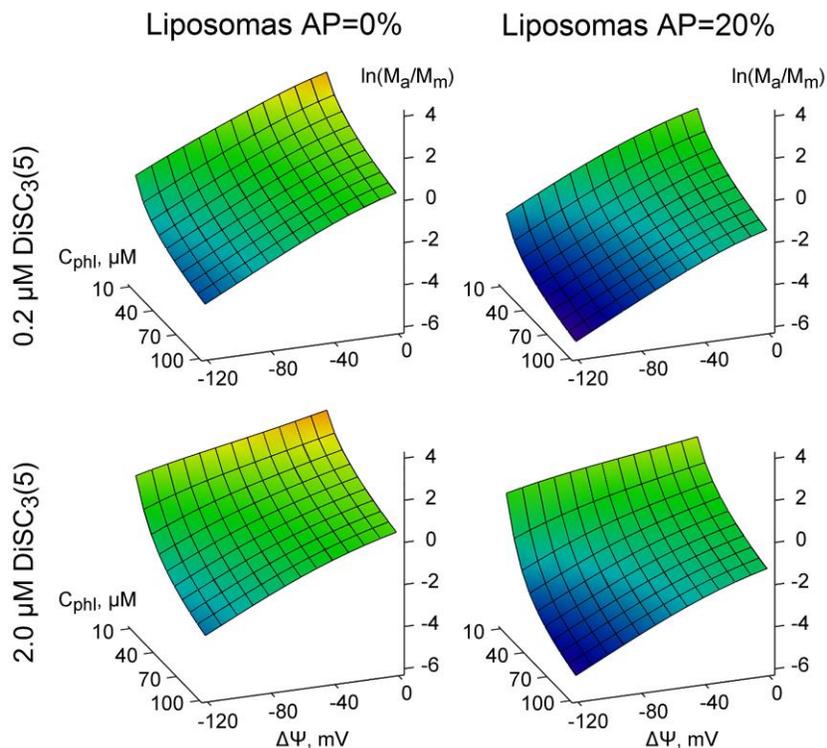


Fig. 6.9 Representación semi-logarítmica de las razones M_a/M_m como función del potencial transmembranal ($\Delta\psi$) para varias concentraciones de liposomas (C_{phl} , 10-100 μM de fosfolípidos) compuestos de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) y aniónicos ($AP=20\%$), de acuerdo al modelo D (Fig. 6.1D). Los cálculos fueron realizados a 0.2 y $2.0 \mu\text{M}$ DiSC₃(5) para 1 ml de suspensión liposomal. Los medios acuosos interno y externo liposomales fueron considerados a 150 mM NaCl.

Teniendo en cuenta los cambios recíprocos no-lineales dependientes de $\Delta\Psi$ en M_a y M_m (Figs. 2, 4-6, 8), resultantes en una disminución aparentemente exponencial en la relación M_a/M_m con un incremento en el valor de $\Delta\Psi$ (Fig. 6.8), se calculó la función logarítmica de la relación M_a/M_m para varias concentraciones de liposomas $AP=0\%$ y $AP=20\%$ a $0.2\ \mu\text{M}$ y $2.0\ \mu\text{M}$ DiSC₃(5) para un medio acuoso de $150\ \text{mM}$ NaCl. Este nuevo parámetro combinado mostró esencialmente una dependencia lineal sobre $\Delta\Psi$, inclusive para liposomas $AP=20\%$, especialmente a concentraciones relativamente bajas para liposoma y la sonda (Fig. 6.9).

6.5 Discusión

Varios modelos descritos para monitorear el potencial transmembranal con sondas fluorescentes cargadas se han basado en la distribución Nernstiana de una sonda a través de la membrana lipídica (Ivkov et al. 1984; Apell y Bersch 1987; Plášek y Hrouda 1991; Portele et al. 1997; Gerencser et al. 2012; Klapperstück et al. 2013). Con respecto a esto, el modelo más simple podría ser descrito por las Ecs. 6.1-6.9. Varios factores adicionales, tales como la carga superficial de la membrana (Haynes 1974; Krasne 1977; Krasne 1980b; Bunting et al. 1989; Zeng et al. 1999; Plášek et al. 2012), la fuerza iónica (McLaughlin et al. 1970; Haynes 1974; Krasne 1980b; Plášek et al. 2012), y los procesos de agregación de la sonda fluorescente (Sims et al. 1974; Ivkova et al. 1984; Cabrini y Verkman 1986a; Bunting et al. 1989), podrían también influir en este monitoreo.

En el presente estudio, usamos varios modelos computacionales (Fig. 6.1) para estimar paso a paso la posible contribución de cada uno de los factores mencionados sobre el monitoreo de $\Delta\Psi$ con sondas cargadas permeables. El análisis computacional fue realizado para el caso particular con la sonda DiSC₃(5), teniendo en cuenta sus propiedades ópticas y de agregación. Los cálculos fueron hechos para un rango de $\Delta\Psi$ desde $0\ \text{mV}$ a $-120\ \text{mV}$ y concentraciones de DiSC₃(5) no mayores que $2.0\ \mu\text{M}$, normalmente utilizadas en los experimentos (Salama et al. 1980; Deleers et al. 1984; Plášek y Hrouda 1991; Zeng et al. 1999; Chanturiya et al. 2004 y otros). La concentración de liposomas para la mayoría de los cálculos fue tomada como $33\ \mu\text{M}$ fosfolípidos, de acuerdo con un estudio experimental

(Zeng et al. 1999), y también fue cambiada dentro del rango de 10-100 μM de fosfolípidos. Para estimar los posibles efectos de la modulación del potencial superficial de la membrana, los liposomas fueron considerados formados sólo por fosfolípidos neutros ($AP=0\%$), y también conteniendo 10% ($AP=10\%$) o 20% ($AP=20\%$) de fosfolípidos aniónicos de una carga.

El análisis computacional del modelo A (Fig. 6.1A), descrito por las Ecs. 6.1-6.15, mostró claramente los cambios recíprocos dependientes de $\Delta\Psi$ en M_a y M_m , especialmente en el caso de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros (Fig. 6.2, $AP=0\%$). Puesto que las propiedades ópticas de DiSC₃(5) en la fase membrana son muy diferentes de aquellas de la fase acuosa (Sims et al. 1974; Ivkova et al. 1984; Cabrini y Verkman 1986a; Plášek y Hroudá 1991; Lemeshko 2014), la medición de M_a o M_m , o ambos simultáneamente, podría ser usada para monitorear el $\Delta\Psi$. Para monitorear el $\Delta\Psi$ en liposomas, compuestos de fosfolípidos neutros, la medición de la razón de las intensidades de fluorescencia de la sonda catiónica de cianina DiSC₃-(3) libre y ligada a la membrana, conocida por tener una baja tendencia para formar agregados no-fluorescentes, ha sido sugerida recientemente por algunos autores (Večeř et al. 1997; Plášek et al. 2012; Plášek y Gášková 2014).

Los datos de los cambios dependientes de $\Delta\Psi$ en M_a y M_m en una suspensión de liposomas $AP=0\%$, determinado para el modelo A a 0.2 μM DiSC₃(5) (Fig. 6.2, $AP=0\%$), fueron similares a aquellos que calculamos para el modelo de Ivkov et al. (1984) para las mismas condiciones (datos no mostrados). El modelo de Ivkov et al. (1984) fue basado en la aproximación de un perfil lineal de tres etapas de $\Delta\Psi$ a través de la membrana, considerando los potenciales de interfaz interno y externo como $-0.1\Delta\Psi$ y $+0.1\Delta\Psi$, respectivamente, mostrando así cambios dependientes de $\Delta\Psi$ desde los coeficientes de repartición aparente DiSC₃(5) para las interfaces de membrana correspondientes (Ivkov et al. 1984). Un perfil lineal de tres pasos de $\Delta\Psi$ a través de la membrana fue también considerado en un modelo de tres capacitores de Apell y Bersch (1987, y referencias allí) para el monitoreo $\Delta\Psi$ con la sonda aniónica Oxonol VI. Estos modelos consideraron vesículas de membrana para ser formadas sólo por fosfolípidos neutros. De acuerdo al modelo de Apell y Bersch (1987), los voltajes de los capacitores internos y externos fueron

modulados por la adsorción dependiente de $\Delta\Psi$ de la sonda a las correspondientes interfaces membrana-agua, afectando así los coeficientes de repartición de la sonda y la cantidad de sonda ligada a la membrana.

En comparación con los modelos de Ivkov et al. (1984) y Apell y Bersch (1987), el modelo A (Fig. 6.1A) relaciona directamente los coeficientes de partición a los potenciales superficiales correspondientes que dependen de la fuerza iónica y podrían ser modulados como un resultado de la adsorción de una sonda cargada a la membrana. De acuerdo a los datos M_a y M_m mostrados en la Fig. 6.2, para la suspensión de liposomas $AP=0\%$, uno puede notar que la razón M_a/M_m a altos valores de $\Delta\Psi$ fue significativamente más bajo para concentraciones de $0.2 \mu\text{M}$ que para $2.0 \mu\text{M}$ de $\text{DiSC}_3(5)$. Esto es consistente con valores altos de potencial superficial de la monocapa interna de la membrana, ϕ_i , a $2.0 \mu\text{M}$ $\text{DiSC}_3(5)$, proveído por la acumulación dependiente de $\Delta\Psi$ de cantidades altas de $\text{DiSC}_3(5)$ dentro de los liposomas (Fig. 6.3, $AP=0\%$). Un incremento en el potencial superficial positivo conduce a una disminución en el coeficiente de repartición efectivo Q_{mi}^* (Ec. 6.10). Así, concluimos que a $2.0 \mu\text{M}$ $\text{DiSC}_3(5)$ en la suspensión de liposomas $AP=0\%$, el potencial superficial interno ϕ_i , resultante de la adsorción de la sonda catiónica lipofílica hacia la monocapa interna de la membrana, es positivo y suficientemente alto a valores de $\Delta\Psi$ para disminuir notablemente la adsorción de $\text{DiSC}_3(5)$ en la membrana, debido al efecto de repulsión eléctrica (Krasne 1980b).

En comparación con los modelos de Ivkov et al. (1984) y Apell y Bersch (1987), el modelo A es aplicable no solo a los liposomas neutros, sino también a los liposomas que contienen fosfolípidos cargados. Los cálculos fueron realizados para liposomas $AP=10\%$ y $AP=20\%$ a $0.2 \mu\text{M}$ $\text{DiSC}_3(5)$, donde se demostró claramente un incremento significativo en M_m , en comparación con los neutros, liposomas $AP=0\%$ (Fig. 6.2). Esto fue debido a los potenciales superficiales negativos proveídos por fosfolípidos aniónicos, ϕ_i y ϕ_o , ambos iguales a -23.5 mV (Fig. 6.3, $AP=10\%$) y a -43.4 mV (Fig. 6.3, $AP=20\%$) a $\Delta\Psi=0$. Además, a valores relativamente altos de $\Delta\Psi$ y $2.0 \mu\text{M}$ de $\text{DiSC}_3(5)$, los valores negativos de ϕ_i podrían ser significativamente (Fig. 6.3, $AP=20\%$) o incluso completamente (Fig. 6.3,

$AP=10\%$) compensados, como un resultado de la adsorción del DiSC₃(5) a la monocapa interna de la membrana.

El fenómeno de agregación de DiSC₃(5) en las fases acuosa (Sims et al. 1974; Ivkova et al. 1983) y membrana (Krasne 1980b; Cabrini y Verkman 1986a, Faria et al. 1990) ha sido reportado en la literatura, como una disminución de la intensidad de la fluorescencia de las sondas de cianina (Sims et al. 1974; Waggoner et al. 1977; Vekshin 2013). En el presente estudio, el análisis computacional del modelo B (Fig. 6.1B) demostró que la agregación de la sonda en sólo el medio acuoso no influye esencialmente en las cantidades de M_m y M_a a $0.2 \mu\text{M}$ DiSC₃(5). Por otra parte, a $2.0 \mu\text{M}$ DiSC₃(5), la agregación en las fases acuosas causó una notable disminución dependiente de $\Delta\Psi$ en M_a , la cual se mostró más clara para el caso de liposomas $AP=0\%$, teniendo una afinidad más baja a las sondas catiónicas que los liposomas que contenían fosfolípidos negativos (Fig. 6.4 en comparación con la Fig. 6.2, para los modelos B y A, respectivamente).

La agregación de la sonda sólo en la fase membrana, de acuerdo al modelo C (Fig. 6.1C), afectó notablemente los cambios dependientes de $\Delta\Psi$ en M_m inclusive a $0.2 \mu\text{M}$ DiSC₃(5) (Fig. 6.5). El modelo C es esencialmente similar al modelo presentado por Bunting et al. (1989) para mitocondrias, donde la dimerización de la sonda sólo se consideró en la monocapa interna de la membrana interna mitocondrial y fue afectada por el potencial superficial interno, proveído por los lípidos aniónicos (fijados a -200 mV) y modulado adicionalmente por la sonda cargada acumulada en la matriz mitocondrial, afectando así el coeficiente de repartición de la sonda.

El comportamiento del modelo completo D (Fig. 6.1D), teniendo en cuenta la consideración de una posible agregación en ambos medios acuosos y membrana (Fig. 6.6), fue muy similar al modelo C (Fig. 6.5). El análisis computacional del modelo D para la suspensión de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros mostró una influencia relativamente pequeña de las agregaciones del DiSC₃(5) sobre M_a , especialmente a una concentración de $0.2 \mu\text{M}$ DiSC₃(5) (Fig. 6.6, $AP=0\%$). Estos resultados indican claramente que es mejor trabajar con la fluorescencia de M_a para monitorear el $\Delta\Psi$, lo cual es

consistente con la mayoría de trabajos experimentales que usan DiSC₃(5), aunque la medición de la fluorescencia de M_m para este propósito, como en algunas aproximaciones experimentales (Salama et al. 1980; Cabrini y Verkman 1986a; Cabrini y Verkman 1986b; Trip et al. 2012; Sorochkina et al. 2013), no puede ser descartada por lo menos para ciertas condiciones experimentales (Fig. 6.6, $AP=0\%$, y Fig. 6.8). Los cálculos también demostraron una influencia significativa de los fosfolípidos aniónicos en los cambios de M_a y M_m dependientes del $\Delta\Psi$, mientras en este caso la fracción en la membrana de DiSC₃(5), M_m , mostró una sensibilidad muy leve para $\Delta\Psi$ (Fig. 6.6, $AP=10\%$ y $AP=20\%$).

Los liposomas de 0.1 μm de diámetro, o cercanos a este tamaño, son comúnmente utilizados en trabajos experimentales (Ivkova et al. 1984; Sorochkina et al. 2013; Khailova et al. 2015; y otros). Las estimaciones realizadas aquí, de acuerdo al modelo completo D, mostraron que un incremento en el tamaño liposomal desde 0.1 μm a 1.0 μm , conservando la concentración de fosfolípidos, no influye esencialmente en el monitoreo del $\Delta\Psi$ midiendo con los monómeros en la fases acuosas M_a (Tablas 6.1 y 6.2). Los valores de M_a a $\Delta\Psi=-120$ mV fueron notablemente más altos para liposomas de 10.0 μm que para liposomas de 0.1 μm o 1.0 μm por la misma superficie liposomal (para la misma concentración 33 μM), debido a la cantidad menor de dímeros DiSC₃(5) formados.

Similarmente al modelo simple A (Fig. 6.1A), el modelo D (Fig. 6.1D) demostró potenciales superficiales negativos altos para liposomas $AP=20\%$, en comparación con liposomas neutros (Figs. 3 y 7, respectivamente), como también su modulación debido a la adsorción de DiSC₃(5) a la membrana, dependiente notablemente de la concentración de la sonda (Fig. 6.3 y 6.7), especialmente a fuerza iónica baja (Fig. 6.7). Estos cálculos son consistentes con los datos experimentales mostrando directamente la formación de potencial superficial en la membrana debido a la adsorción de sondas catiónicas permeables a la membrana (Haynes 1974; Krasne 1977; Krasne 1980b; Bunting et al. 1989; Plášek et al. 2012). La presencia de lípidos aniónicos en la membrana mostró que ésto favorece la incorporación de DiSC₃(5) (Zeng et al. 1999) debido a la atracción electrostática entre la membrana cargada negativamente y la sonda catiónica (Deleers et al. 1984).

Por otro lado, la adsorción de otras moléculas cargadas positivamente en la membrana, como péptidos policationicos, desfavorece la adsorción de DiSC₃(5) por la repulsión electrostática entre estas moléculas. Esto fue mostrado recientemente en Lemeshko (2014), donde la adición de péptido policationico en una suspensión de liposomas con DiSC₃(5) incrementó la intensidad de fluorescencia de la sonda en medio acuoso, justificado no por la disminución del potencial transmembranal, sino por el desplazamiento de la sonda desde la fase membrana hacia la fase acuosa por el péptido.

En general, el análisis computacional del modelo completo D mostró cambios recíprocos significativos M_a y M_m dependientes del $\Delta\Psi$ para liposomas neutros en un rango amplio de concentraciones de lípidos (10-100 μ M fosfolípidos) a fuerza iónica alta y baja (Fig. 6.8). El parámetro M_a demostró una sensibilidad al voltaje más alta que el parámetro M_m , el cual explica la medición de la fluorescencia M_a en la mayoría de los estudios experimentales diseñados para monitorear el $\Delta\Psi$. El rango de sensibilidad al voltaje M_a se extendió a valores más altos de $\Delta\Psi$ a concentraciones relativamente bajas de liposomas (Fig. 6.8).

El parámetro combinado, la razón M_a/M_m , exhibió una sensibilidad al voltaje más alta respecto a M_a o a M_m , y una disminución aparentemente exponencial con un incremento en el valor del $\Delta\Psi$ y con un incremento en la concentración liposomal (Fig. 6.8). Además, la función logarítmica de M_a/M_m , $\ln(M_a/M_m)$, mostró esencialmente una dependencia lineal en el $\Delta\Psi$, en -120 mV, especialmente a una concentración relativamente baja de DiSC₃(5) y de liposomas (Fig. 6.9). Esto quiere decir que la técnica de dos longitudes de onda para medir los cambios de fluorescencia de M_a y M_m en tiempo real, expresado como la función logarítmica de su razón (si el equipo lo permite), podría ser la manera más adecuada para monitorear el potencial transmembranal de vesículas de membrana. Para un fluorímetro menos sofisticado, uno podría usar la medición de sólo la fluorescencia de M_a , disminuyendo casi exponencialmente con un incremento en el valor del $\Delta\Psi$ (Figs. 6 y 8), o incluso mejor con la función logarítmica de los cambios de fluorescencia relativa como la relación $M_a/M_{a,0}$ (donde $M_{a,0}$ es M_a a $\Delta\Psi=0$), similar a lo usado por Plášek y Hroude (1991) en sus experimentos.

Muchos factores pueden influir en el monitoreo de M_a y M_m por medición de la fluorescencia. La dimerización de DiSC₃(5) y otras sondas de cianina en la fase membrana, que conducen a un *quenching* de la fluorescencia de la sonda, ha sido sugerida por varios autores (Bunting et al. 1989; Waggoner et al. 1977; Krasne 1980a; Krasne 1980b; Ivkova et al. 1983; Ivkova et al. 1984; Cabrini y Verkman 1986a; Cabrini y Verkman 1986b) y ha sido considerada en los modelos C y D. Por otra parte, de acuerdo a Clarke (1991), el *quenching* de fluorescencia en la fase membrana, por ejemplo para las sondas de Oxonol, ha sido atribuido al efecto de filtro interno, en comparación a una posible dimerización de la sonda. Aunque tanto el efecto del filtro interno, reportado por Clarke (1991), para las sondas de Oxonol, como el efecto de dimerización de la sonda, analizados con un modelo matemático de Cabrini y Verkman (1986b) y con nuestros modelos (Fig. 6.1C,D), podrían influir en el monitoreo de los cambios de M_a y M_m dependientes del $\Delta\Psi$. Los experimentos para monitorear monómeros de las sondas sensibles al potencial en las fase acuosa y/o membrana deberían desarrollarse más. El gran interés con este aspecto representa, por ejemplo, la sonda ampliamente utilizada TMRM que permite monitorear el potencial de membrana por la técnica de dos longitudes de onda (Scaduto y Grotyohann 1999), cancelando así la influencia del efecto del filtro interno sobre la medición.

Los modelos computacionales presentados aquí, además de predecir las condiciones experimentales óptimas tales como concentración de fosfolípidos, cantidad de fosfolípidos neutros y cargados, fuerza iónica del medio de incubación, y la concentración de sonda fluorescente; también permiten determinar las propiedades físicas y químicas de una sonda con el propósito de diseñar nuevas sensibles al potencial (Loew 2015).

Los modelos descritos, si se combinan con el modelo publicado anteriormente (Lemeshko 2014), podrían permitir estimar la incorporación dependiente del potencial de las sondas cargas permeables a la membrana en presencia de otras partículas cargadas, tales como iones divalentes (McLaughlin et al. 1971; Haynes 1974), oleato (Rokitskaya et al. 2010), palmitato (Belosludtsev et al. 2015), péptidos policatiónicos (Lemeshko 2014), u otros factores que modulan el potencial superficial de las monocapa interna y/o externa de la

membrana, posibilitando así el análisis computacional de los efectos sinérgicos correspondientes a la membrana.

7. PERMEABILIZACIÓN DE LIPOSOMAS CON PÉPTIDOS POLICATIÓNICOS EN FUNCIÓN DEL POTENCIAL TRANSMEMBRANAL Y DEL POTENCIAL SUPERFICIAL

7.1 Resumen

Para estudiar la actividad permeabilizadora de drogas en bicapas lipídicas se han diseñado modelos de membrana como los liposomas. Péptidos policationicos derivados de la protoxina Cry11Bb1 de *Bacillus thuringiensis* subespecie *medellin* ya han mostrado permeabilización de biomembranas de manera potencial-dependiente. En este trabajo se evaluó cómo depende la actividad permeabilizadora de estos péptidos de los parámetros eléctricos potencial transmembranal y potencial superficial utilizando liposomas. Nuestros resultados revelaron que la permeabilización de los liposomas con péptido también fue de manera potencial-dependiente, donde el péptido BTM-P4 mostró ser más activo que el péptido BTM-P1. También fueron evaluados los péptidos más cortos, BTM-P1CL y BTM-P4CL, los cuales fueron menos activos que los respectivos péptidos más largos BTM-P1 y BTM-P4. Cada uno de estos péptidos mencionados fueron más activos que sus isómeros tipo D (BTM-P1D, BTM-P4D, BTM-P1CD y BTM-P4CD, según el caso). Para mostrar el efecto del potencial superficial sobre la permeabilización de los liposomas con péptidos, se adicionó Mg^{2+} en la suspensión, donde la actividad de los péptidos policationicos más cortos se vio afectada por la competencia electrostática con este catión divalente. Los péptidos largos, BTM-P1 y BTM-P4, no fueron afectados por la presencia del Mg^{2+} debido a que son péptidos más grandes y más activos para las concentraciones que se trabajaron.

7.2 Introducción

Los péptidos policationicos son moléculas que hacen parte del sistema de defensa de los seres vivos los cuales atacan microorganismos patógenos como las bacterias (Hancock

2001). En los últimos años los péptidos han sido de gran interés por ser drogas antibióticas (Hancock y Lehrer 1998; Hancock y Patrzykat 2002; Findlay et al. 2010) que podrían complementar drogas antibióticas clásicas cuyos blancos han sido moléculas como ácidos nucleicos, proteínas y enzimas las cuales pueden mutar y hacer más resistente a los microorganismos patógenos (Guilhelmelli et al. 2013). Los péptidos policatiónicos se han caracterizado por permeabilizar la membrana celular de dichos patógenos (Shai 1999), interactuando con la bicapa lipídica (Bahar y Ren 2013), estructura inmutable (Peschel y Sahl 2006).

Ya se han hecho estudios con los péptidos BTM-P1 (Lemeshko et al. 2005; Segura et al. 2007; Arias et al. 2009; Lemeshko 2010; Lemeshko 2011; Lemeshko 2013) y BTM-P4 (Patente en Colombia 2016, Resolución 22123, Superintendencia de Industria y Comercio), derivados de la protoxina natural Cry11Bb1 de *Bacillus thuringiensis* subespecie *medellin*, cuya permeabilización en biomembranas ha mostrado ser potencial-dependiente.

Los péptidos policatiónicos BTM-P1 y BTM-P4 son tipo L, susceptibles a la proteólisis, pero se pueden diseñar péptidos de isomería tipo D, insensibles a las proteasas naturales (Welch et al. 2007). Ya se han realizado estudios comparativos de la actividad permeabilizadora entre los péptidos BTM-P1 y BTM-P1D en membranas (Lemeshko y Orduz, 2013). Por ejemplo, el péptido BTM-P1 no fue activo respecto al péptido BTM-P1D en homogeneizados de intestinos de larvas de mosquito debido a que el primero fue sensible a las proteasas del medio; por otra parte, el péptido BTM-P1 fue más activo que el péptido BTM-P1D en glóbulos rojos aislados y mitocondrias aisladas.

Los liposomas son modelos de membrana adecuados para estudiar la permeabilización de la bicapa lipídica con péptidos policatiónicos. El propósito de esta investigación fue evaluar la actividad permeabilizadora de algunos péptidos policatiónicos en liposomas teniendo en cuenta el efecto de algunos parámetros eléctricos como potencial transmembranal y potencial superficial. Se compararon las actividades entre péptidos tipo L y tipo D, según los parámetros eléctricos mencionados.

7.3 Materiales y métodos

7.3.1 Reactivos

Los péptidos fueron diseñados en nuestro Laboratorio y sintetizados por GenScript Corporation (NJ, USA): BTM-P1 (VAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS), BTM-P1D (vapiakylatalakwalkqgfaklks), BTM-P4 (IAPALIAVAPIAKYLATALAKWALKQGFAKLKS), BTM-P4D (iapaliavapiakylatalakwalkqgfaklks), BTM-P1CL (KYLATALAKWALKQGFAALK), BTM-P1CD (kylatalakwalkqgfaalk), BTM-P4CL (IAPALIAVAPIAKYLATALAKWALKQ) y BTM-P4CD (iapaliavapiakylatalakwalkq). Los reactivos, de alta pureza, fueron de Merck y Sigma. Los lípidos fueron de Avanti Polar Lipids, Inc.

7.3.2 Preparación de liposomas LUV

Los lípidos POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) y POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) fueron disueltos en cloroformo:metanol (2:1) separadamente, luego se mezclaron en frascos de vidrio en la proporción POPC:POPE (6:4, peso:peso). La mezcla fue secada por microevaporación rotatoria en presencia de nitrógeno gaseoso y succión al vacío por 6 horas tal como se expuso en el capítulo 2 con bicapa lipídica plana (Fig. 5.6).

Los lípidos secos en los frascos de vidrio se disolvieron en medio salino K_2SO_4 (50 mM K_2SO_4 , 5 mM HEPES a pH 7), hasta lograr una concentración final de 3.3 mM de lípidos, se agitó la suspensión a temperatura por 30 min para formar la suspensión de vesículas multilaminares, la cual se llevó luego al extruder con filtro de 100 nm y manteniéndose a 60°C, se realizaron 21 pasos de la muestra a través del filtro hasta lograr los liposomas LUV (large unilamellar vesicles) (Fig. 7.1). La suspensión final de liposomas LUV se mantuvo en la nevera a 5°C.

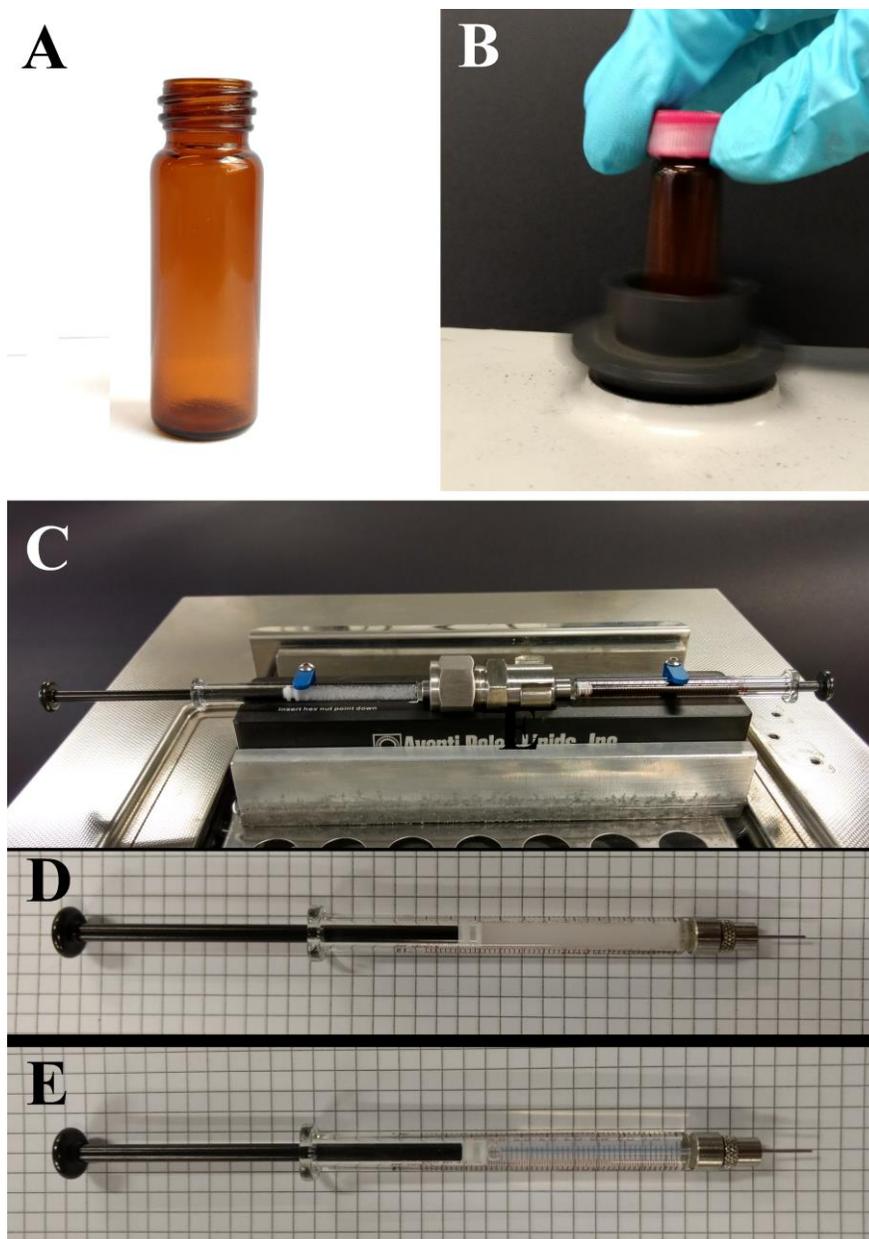


Fig. 7.1 Preparación de liposomas por extrusión (liposomas LUV). Una vez secos los lípidos por microevaporación rotatoria (A) se adiciona el medio K_2SO_4 (50 mM K_2SO_4 , 5 mM HEPES a pH 7) en el frasco de vidrio y se aplica agitación por 30 min (B). Luego se extrae el contenido con una de las jeringas de vidrio del equipo-extruder que luego se ensambla allí (C, jeringa de la izquierda) para realizar el proceso de extrusión con 21 pasos a través de un filtro de 100 nm tamaño de poro. Finalmente se obtienen los liposomas LUV de 100 nm de diámetro (C, jeringa de la derecha). Un indicador de la formación de los liposomas es que antes de la extrusión, la muestra es turbia (D) y después del proceso de extrusión dicha turbidez se reduce notablemente (E).

7.3.3 Generación de potencial transmembranal en liposomas LUV

Se añadieron 2.5 μL de liposomas LUV (desde 3.3 mM de lípidos, stock de lípidos), con medio acuoso interno 50 mM K_2SO_4 , 5 mM HEPES, pH 7 desde el recipiente donde se suspendieron con el mismo medio de K_2SO_4 , en 1 mL de medio de incubación salino Li_2SO_4 (50 mM Li_2SO_4 , 5 mM HEPES, pH 7) o en 1 mL de medio sacarosa (150 mM sacarosa, 5 mM HEPES, pH 7) con incubación previa (60 s) de 1 μM de $\text{DiSC}_3(5)$. Un minuto después se adicionó 1 μM valinomicina para generar potencial transmembranal por medio de la difusión de K^+ desde el medio acuoso interno ($[\text{K}^+]_i = 50 \text{ mM}$) hacia el medio acuoso externo ($[\text{K}^+]_o = 0.125 \text{ mM}$) (dilución 400 veces de liposomas y de su medio de incubación externo en stock; el potencial estimado es -156 mV, según ecuación de Nernst. Revisar Fig. 2.8 y ecuación 2.1).

7.4 Resultados

Se evaluaron algunos péptidos policatiónicos derivados de la protoxina natural Cry11Bb1. Para evaluar la interacción de los péptidos con la bicapa lipídica se usaron liposomas como modelos de membrana. Se utilizó la sonda $\text{DiSC}_3(5)$ para monitorear cambios del potencial transmembranal y evaluar el efecto del potencial superficial sobre la interacción péptido-membrana. En todos los experimentos se inició registrando sólo la fluorescencia de la sonda $\text{DiSC}_3(5)$ en medio salino, donde se observó un decaimiento inicial de esta en el tiempo, esto se debió a que parte de la sonda se adsorbió en las paredes de la cubeta del fluorímetro.

Para estudiar el efecto del potencial transmembranal sobre la actividad permeabilizadora de los liposomas, BTM-P1 y BTM-P4 fueron adicionados en la suspensión de liposomas con medio salino Li_2SO_4 en presencia (+) o en ausencia (-) de valinomicina (Fig. 7.2A y Fig. 7.2B). La adición de valinomicina al medio de incubación, posterior a la adición de liposomas, ocasionó una caída notable en la fluorescencia de la sonda $\text{DiSC}_3(5)$, indicando la generación de un potencial transmembranal el cual fue estable para nuestros experimentos según la curva control (Fig. 7.2A y 7.2B). La adición de péptido BTM-P1,

después de la adición de valinomicina, disipó inmediatamente un 25% del potencial transmembranal, seguido de una despolarización más lenta de la membrana (Fig. 7.2A, (+)valinomicina). Por otro lado, la adición de BTM-P1 en medio sin valinomicina aumentó el nivel de fluorescencia para DiSC₃(5) (Fig. 7.2A, (-)valinomicina). Para el péptido BTM-P4, la capacidad permeabilizadora fue mayor a lo observado con el péptido BTM-P1 a pesar de que se utilizó una concentración 5 veces menor (Fig. 7.2B). La adición de 0.2 μ M BTM-P4 disipó inmediatamente un 50% del potencial transmembranal, seguido de una despolarización más lenta (Fig. 7.2B (+)valinomicina). En el medio sin valinomicina, la adición de BTM-P4 provocó un incremento en la fluorescencia de DiSC₃(5) (Fig. 7.2B, (-)valinomicina), dos veces superior a lo observado con BTM-P1.

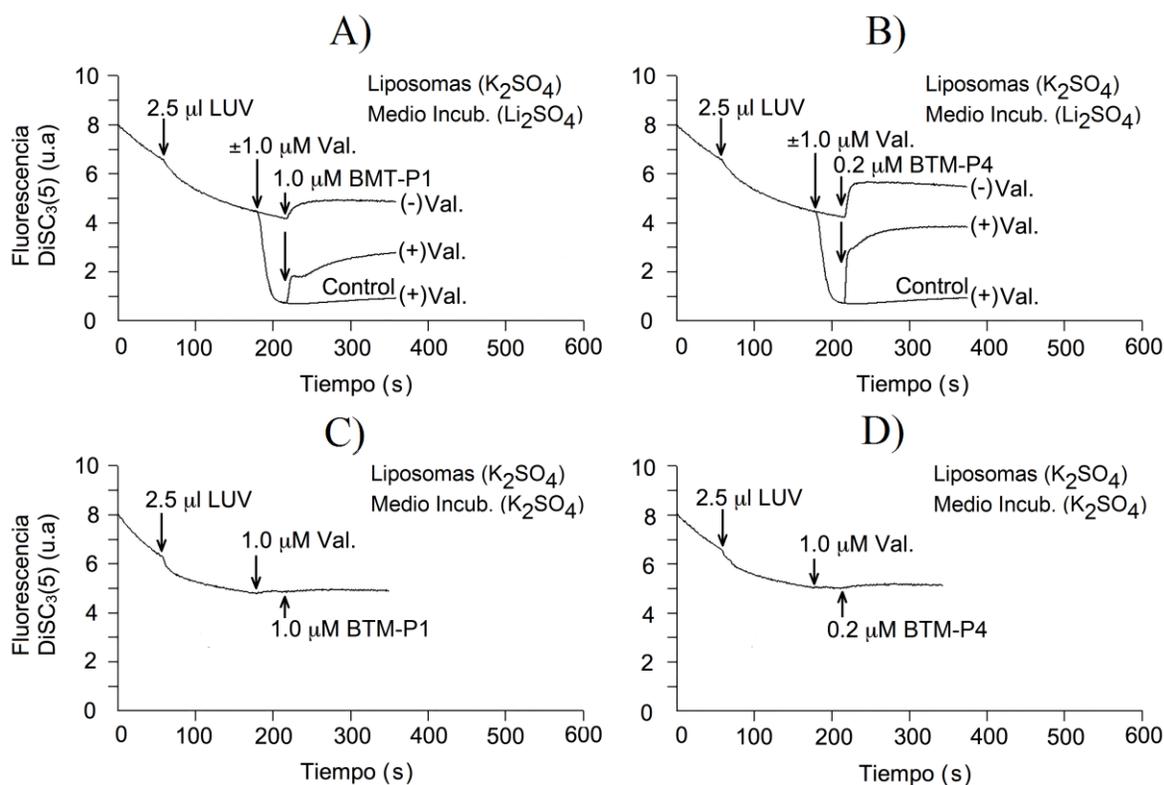


Fig. 7.2 Permeabilización potencial-dependiente de liposomas con péptidos policationicos. 2.5 μ L de liposomas LUV (8.25 μ M lípidos, concentración final) de POPC:POPE (6:4) cargados con medio K₂SO₄. Se evaluaron los péptidos BTM-P1 (A y C) y BTM-P4 (B y D) en presencia (+) y ausencia (-) de 1 μ M valinomicina en medio Li₂SO₄ (A y B) o en presencia de 1 μ M valinomicina en medio K₂SO₄ (C y D). Fue utilizado 1 μ M DiSC₃(5) en la suspensión.

Para mostrar la influencia del péptido sobre la fluorescencia de DiSC₃(5) en la membrana, se hicieron experimentos en ausencia de potencial transmembranal. Para ello los liposomas fueron suspendidos en el medio de incubación con la misma sal y búfer de su medio acuoso interno, es decir 50 mM K₂SO₄, 5 mM HEPES, pH 7. La adición de valinomicina y péptido no afectó la fluorescencia de DiS₃C(5) (Fig. 7.2C y 7.2D).

La actividad permeabilizadora potencial-dependiente de los péptidos BTM-P1 y BTM-P4 fue comparada con sus respectivos isómeros tipo D (BTM-P1D y BTM-P4) y con péptidos más cortos e isómeros (BTM-P1CL, BTM-P4CL, BTM-P1CD y BTM-P4CD) (Fig. 7.3). La actividad del péptido BTM-P1D fue menor a la actividad de BTM-P1; por otra parte la actividad del péptido corto BTM-P1CL manifestó aproximadamente un 75% de actividad menor respecto a BTM-P1 (Fig. 7.3A). La actividad del isómero tipo D para el péptido más corto, BTM-P1CD, fue menor respecto a la actividad del péptido BTM-P1CL (Fig. 7.3A).

La actividad permeabilizadora de BTM-P4 fue mayor a la actividad de BTM-P4D (Fig. 7.3B). Los péptidos más cortos BTM-P4CL y BTM-P4CD fueron menos activos respecto al péptido BTM-P4, donde la actividad permeabilizadora de BTM-P4CL fue aproximadamente un 25% más alta con respecto a la de BTM-P4CD (Fig. 7.3B).

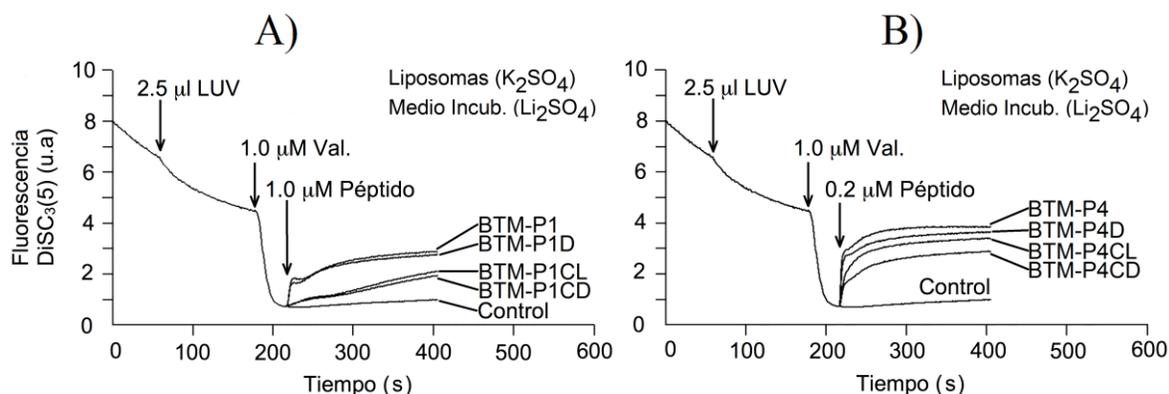


Fig. 7.3 Permeabilización de liposomas de manera potencial-dependiente con péptidos policatiónicos. (A) Péptidos BTM-P1, BTM-P1D, BTM-P1CL y BTM-P1CD; y (B) péptidos BTM-P4, BTM-P4D, BTM-P4CL y BTM-P4CD. Se adicionaron 2.5 μL de liposomas LUV (8.25 μM lípidos, concentración final) cargados con medio K₂SO₄ y suspendidos en medio Li₂SO₄. Fue utilizado 1 μM DiSC₃(5) en la suspensión.

La actividad permeabilizadora potencial-dependiente del péptido BTM-P4 en liposomas, fue evaluada en función de la concentración del péptido y la cantidad de liposomas presentes en la suspensión (Fig. 7.4). A una cantidad fija de liposomas (2.5 μL de liposomas LUV), la actividad permeabilizadora potencial-dependiente de BTM-P4 fue proporcional a su concentración (Fig. 7.4A). Por otra parte, mostramos que con 2.5 μL de liposomas adicionados a 1 mL de medio acuoso, la sensibilidad para monitorear cambios de potencial transmembranal fue aceptable respecto a cantidades mayores de liposomas (Fig. 7.4B).

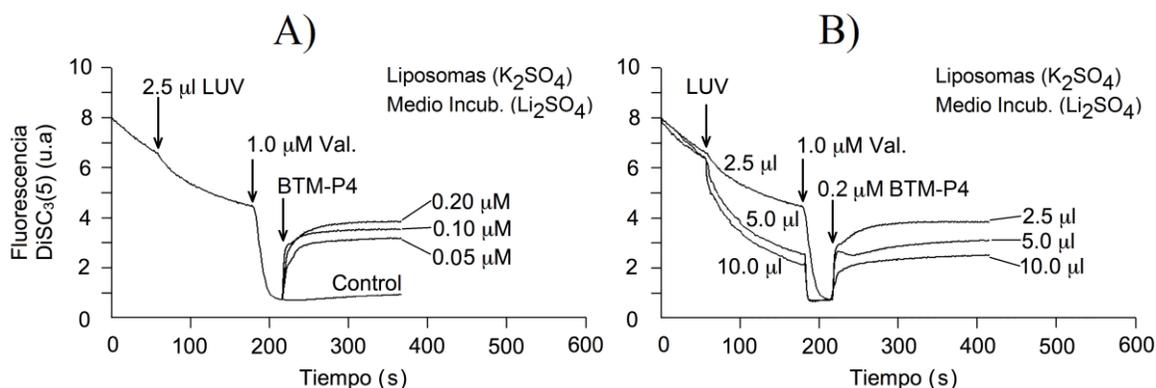


Fig. 7.4 Permeabilización potencial-dependiente de liposomas LUV con el péptido BTM-P4. (A) Dependencia de la permeabilización según la concentración del péptido y (B) según la cantidad de liposomas adicionados en el medio. Los liposomas LUV, cargados con medio K_2SO_4 , se adicionaron en medio Li_2SO_4 en presencia de 1 μM DiSC₃(5).

Con el fin de cambiar el potencial superficial de membrana y observar algún efecto sobre la actividad permeabilizadora de los péptidos pasamos de un medio de incubación de fuerza iónica alta (medio salino Li_2SO_4) a un medio de fuerza iónica baja (medio sacarosa) (Fig. 7.5). Para este caso con medio sacarosa, la caída de la fluorescencia de DiSC₃(5), después de la adición de los liposomas, fue mayor respecto a lo observado en medio salino (comparar Fig. 7.5 con Fig. 7.2). Por otro lado, el incremento de la fluorescencia de DiSC₃(5) fue mayor en medio de fuerza iónica baja respecto al medio de fuerza iónica alta, después de la adición del péptido en presencia (+) o en ausencia (-) de valinomicina (comparar Fig. 7.5 con Fig. 7.2).

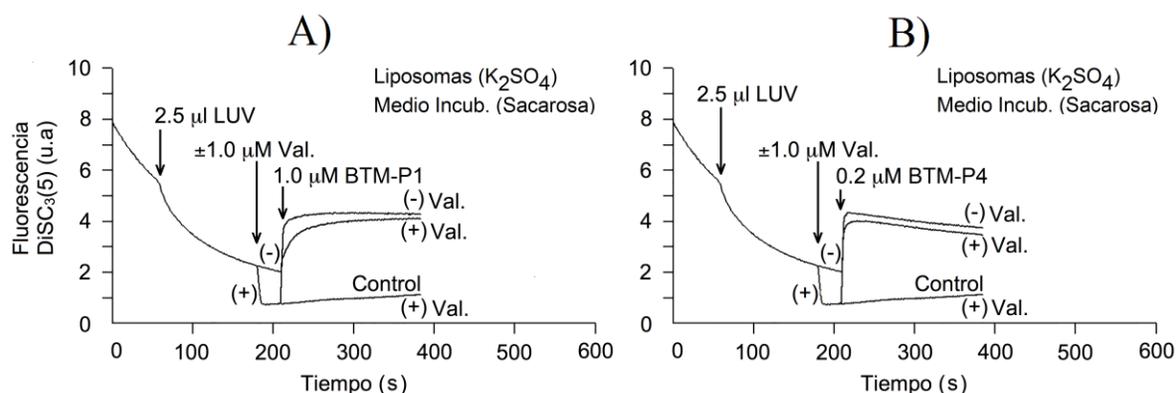


Fig. 7.5 Permeabilización potencial-dependiente de liposomas con los péptidos A) BTM-P1 y B) BTM-P4 en medio sacarosa. Se adicionaron 2.5 μL (8.25 μM lípido, concentración final) liposomas LUV (mezcla POPC:POPE (6:4), cargados con medio K_2SO_4) en medio sacarosa con 1 μM DiSC₃(5).

Para mostrar de otra forma algún efecto del potencial superficial sobre la interacción péptido-membrana, se adicionó a la suspensión de liposomas sin valinomicina, péptidos en presencia del catión divalente Mg^{2+} (Fig. 7.6). Las curvas obtenidas con los péptidos en medio sin Mg^{2+} sirvieron como control (Fig. 7.6A y Fig. 7.6C). La adición de 1 mM de Mg^{2+} en el medio sacarosa incrementó la fluorescencia de DiSC₃(5) alrededor de un 14% o 10% de fracción del incremento observado inmediatamente después de la adición de BTM-P1 o BTM-P4, respectivamente, en control (Fig. 7.6B y Fig. 7.6D). La adición de los péptidos BTM-P1 y BTM-P4 (incluyendo sus péptidos tipo D) después de Mg^{2+} , llevó a un incremento de la fluorescencia de DiSC₃(5) que llegó a ser comparable a lo observado en medio sin Mg^{2+} (control); pero esto no ocurrió con los péptidos más cortos BTM-P1CL y BTM-P4CL (incluyendo sus péptidos tipo D) donde los incrementos fueron un 50% menor aproximadamente.

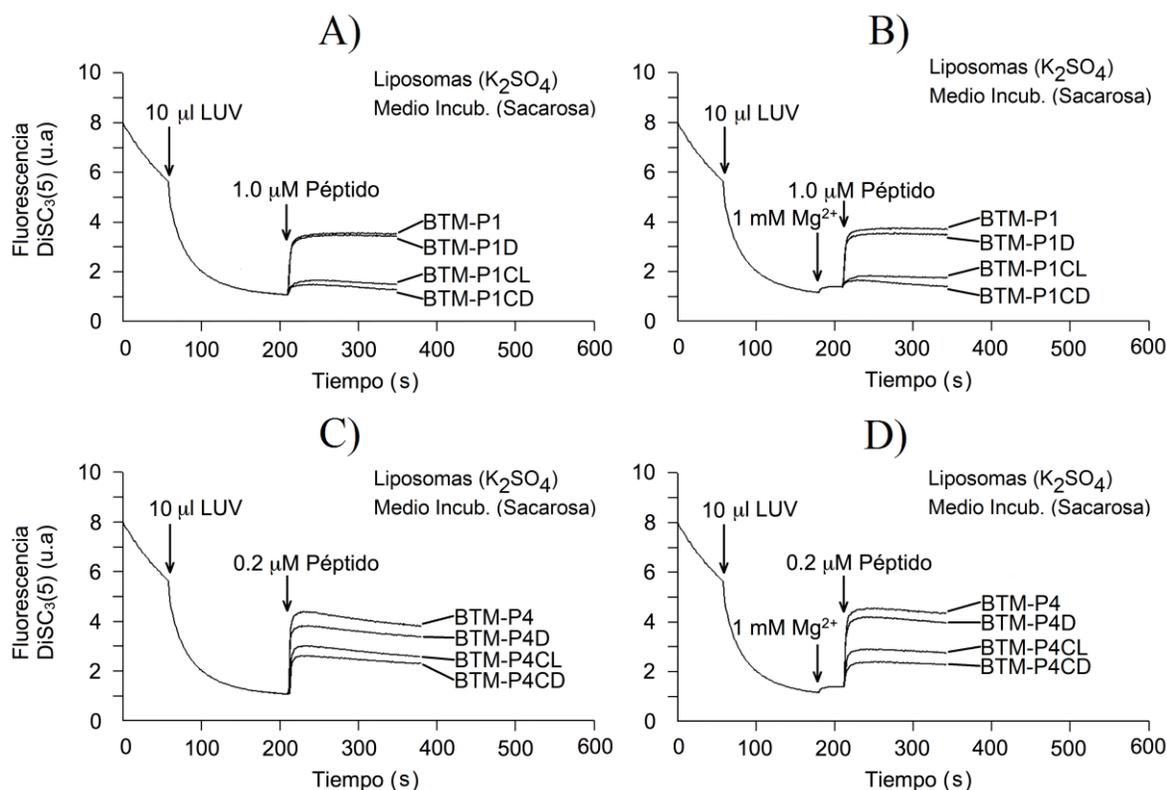


Fig. 7.6 Evaluación del efecto del catión divalente Mg^{2+} sobre la interacción péptido-membrana. Se adicionaron 2.5 μ L liposomas LUV (8.25 μ M lípido, concentración final) cargados con medio K_2SO_4 en medio sacarosa con 1 μ M $DiSC_3(5)$ en ausencia (A y C) y presencia (B y D) de 1 mM $MgCl_2$.

En general, los resultados mostraron que los péptidos permeabilizaron los liposomas de manera potencial-dependiente, donde BTM-P4 mostró ser más activo que BTM-P1, y los péptidos cortos fueron menos activos que sus respectivos péptidos largos (BTM-P1 y BTM-P4). Al pasar de medio de fuerza iónica alta a fuerza iónica baja, el mecanismo permeabilizador potencial-dependiente de los péptidos se mantiene. Se compararon las actividades permeabilizadoras entre los péptidos tipo L y tipo D, donde los tipo D fueron menos activos que los tipo L.

7.5 Discusión

Los péptidos policatiónicos BTM-P1 y BTM-P4, provenientes de la proxotina natural Cry11Bb1, han mostrado actividad permeabilizadora de manera potencial-dependiente en mitocondrias y glóbulos rojos (Lemeshko et al. 2005; Segura et al. 2007; Arias et al. 2009;

Lemeshko 2010; Lemeshko 2011; Lemeshko 2013; Orduz y Lemeshko 2016), pero no se tenían datos con liposomas.

Fue mostrado que los péptidos BTM-P1 y BTM-P4 disipan el potencial transmembranal generado artificialmente en liposomas con valinomicina (por permeabilización potencial-dependiente) (Fig. 7.2A y Fig. 7.2B). Dicha disipación fue de manera bifásica, primero una fase rápida y luego una fase más lenta, esto se monitoreó mediante un incremento rápido en la fluorescencia de DiSC₃(5) y luego un incremento más lento (Fig. 7.2A y Fig. 7.2B). La disipación bifásica se justificaría de la siguiente forma: la primera fase (fase rápida) es por la permeabilización inmediata de la membrana, lo cual justifica la actividad permeabilizadora potencial-dependiente de los péptidos, el incremento rápido de la fluorescencia es por el desplazamiento inmediato de monómeros DiSC₃(5) desde la membrana hacia el medio acuoso; pero la segunda fase (fase lenta), adicional a una despolarización lenta, podría ser por la disociación de los dímeros DiSC₃(5) en la membrana a monómeros fluorescentes que luego pasarían hacia el medio acuoso (Cabrini y Verkman 1986b).

De manera separada fue evaluado el efecto de los péptidos sobre liposomas en ausencia de valinomicina (Fig. 7.2A y Fig. 7.2B), lo cual mostró un incremento en la fluorescencia de DiSC₃(5) después de la adición de los péptidos BTM-P1 y BTM-P4. Este incremento en la fluorescencia ya había sido mostrado previamente y justificado como un desplazamiento de los monómeros de DiSC₃(5) desde la membrana hacia el medio acuoso debido a la adsorción del péptido policationico BTM-P1 en liposomas de PC:PG (9:1), por la competencia electrostática entre las moléculas del péptido y DiSC₃(5) (Lemeshko 2014).

Se preparó la suspensión de liposomas con el mismo medio salino K₂SO₄ dentro y fuera de las vesículas, ningún efecto sobre la fluorescencia de DiSC₃(5) se observó después de la adición valinomicina, lo cual confirmó la no generación de un potencial transmembranal (Fig. 7.2C y 7.2D), pero la adición posterior de BTM-P1 o BTM-P4 tampoco provocó un incremento en la fluorescencia de DiSC₃(5) como si sucedió cuando los liposomas se suspendieron en el medio Li₂SO₄ (Fig. 7.2A y 7.2B). No se descarta la generación de un

potencial transmembranal por una posible permeabilidad de la membrana para el K^+ que podría afectar la distribución de la sonda DiSC₃(5) entre los medios acuosos y la membrana.

La actividad permeabilizadora potencial-dependiente de los péptidos BTM-P1 y BTM-P4 (péptidos tipo L) en liposomas fue comparada con sus isómeros tipo D (BTM-P1D y BTM-P4D) y con otros péptidos más cortos (BTM-P1CL y BTM-P4CL), estos últimos también comparados con sus respectivos isómeros tipo D (BTM-P1CD y BTM-P4CD) (Fig. 7.3). Ya se había mostrado que el péptido BTM-P1D es más activo que el péptido BTM-P1, según estudios en homogeneizados de intestinos de larvas de mosquito, puesto que los péptidos tipo D no son susceptibles a las proteasas presentes en el medio (Lemeshko y Orduz 2013). Por otra parte, las actividades permeabilizadoras de los péptidos BTM-P1 y BTM-P1D fueron también comparadas en suspensiones de mitocondrias y glóbulos rojos aislados, donde BTM-P1 mostró ser más activo que su isómero tipo D (Lemeshko y Orduz 2013), este hecho también fue mostrado aquí en este trabajo con liposomas (Fig. 7.3A). La diferencia de las actividades entre péptidos tipo L y tipo D también fue mostrada con los péptidos BTM-P4 y BTM-P4D, donde se observó una mayor diferencia (Fig. 7-3B). Los péptidos cortos BTM-P1CL y BTM-P4CL fueron aún menos activos a lo observado con los péptidos BTM-P1D y BTM-P4D, respectivamente (Fig. 7.3A y Fig. 7.3B). Por otra parte, los péptidos cortos BTM-P1CD y BTM-P4CD fueron menos activos que sus respectivos isómeros tipo L (BTM-P1CL y BTM-P4CL) (Fig. 7.3). Alguna diferencia estructural entre los péptidos tipo L y tipo D, o alguna interacción estereo-específica entre los péptidos y los lípidos de la bicapa lipídica podría justificar la diferencia de las actividades permeabilizadoras entre los L y D, pero se requeriría profundizar esto con otros estudios para soportar dichos argumentos.

Fue mostrado que la actividad permeabilizadora potencial-dependiente del péptido BTM-P4 en una suspensión de liposomas es proporcional a su concentración (Fig. 7.4A). El perfil bifásico de la disipación del potencial transmembranal por la adición de péptido se mantuvo para las tres concentraciones de péptido que se utilizaron (es decir 0.05, 0.10 y 0.20 μ M BTM-P4).

La sensibilidad para monitorear los cambios de potencial transmembranal, usando la sonda DiSC₃(5), dependió de la cantidad de liposomas presentes en la suspensión (Fig. 7.4B). En nuestro modelo computacional sobre la distribución de la sonda DiSC₃(5) de acuerdo a los cambios de potencial transmembranal, publicado recientemente (Alvarez-Bustamante y Lemeshko 2016) y descrito en el capítulo 6 de esta tesis, se mostró que el incremento de liposomas (en otras palabras, incremento de fosfolípidos) en la suspensión provocó la disminución de la sensibilidad de la sonda DiSC₃(5) para registrar los cambios de potencial transmembranal. En una suspensión de liposomas, la sonda DiSC₃(5) se reparte en el medio acuoso y en la membrana, siendo la concentración en las membranas hasta cuatro órdenes de magnitud superior respecto a la concentración en medio acuoso (Ivkova et al. 1987); por lo tanto, trabajar con pocos liposomas (2.5 μ l de liposomas, por ejemplo) conllevaría a una saturación de DiSC₃(5) en la membrana, pero si la cantidad es superior (10 μ l o más), más sonda podría ser absorbida en la membrana desde el medio acuoso, esto se observa en nuestros resultados cuando la fluorescencia de DiSC₃(5) en medio acuoso decae más después de adicionar más cantidad de liposomas. Es por ello, que después de la adición de valinomicina se mostró que la caída de la fluorescencia de DiSC₃(5) respecto al tiempo fue más baja a 2.5 μ l de liposomas, la adsorción de la sonda catiónica en la membrana, generaría una densidad de carga superficial mayor respecto a los otros casos (5.0 y 10 μ l de liposomas), lo cual generaría un potencial superficial mayor que repele la sonda catiónica no adsorbida en la membrana (Fig. 7.4B). Después de la adición del péptido BTM-P4, la recuperación de la fluorescencia de DiSC₃(5) (por disipación del potencial) correspondió según la sensibilidad modulada por la cantidad de liposomas en la suspensión.

Para evaluar el efecto del potencial superficial sobre la permeabilización de los liposomas con péptido, se cambió la fuerza iónica del medio de incubación de los liposomas. Se adicionaron los péptidos BTM-P1 y BTM-P4 en liposomas cargados con medio K₂SO₄ y suspendidos en medio con sacarosa (Fig. 7.5). Después de la adición de los liposomas, los resultados revelaron una caída mayor en la fluorescencia de DiSC₃(5) en medio con sacarosa respecto a lo observado en medio con Li₂SO₄, esto ya había sido observado previamente en otra preparación de liposomas y reportado recientemente en otro trabajo

(Lemeshko 2014). Los péptidos fueron adicionados en presencia (+) y en ausencia de valinomicina (-), donde el péptido BTM-P4 mostró ser 5 veces más activo que el péptido BTM-P1 (Fig. 7.4). En medio de fuerza iónica baja (medio con sacarosa) y en ausencia de valinomicina, se observó un incremento mayor de la fluorescencia de DiSC₃(5) después de la adición de péptido (Fig. 7.5) respecto a lo observado con medio de fuerza iónica alta (medio con Li₂SO₄, Fig. 7.2A y 7.2B). Esto muestra que existe una competencia electrostática entre la sonda DiSC₃(5) y el péptido policatiónico, la cual se manifiesta significativamente en medio de fuerza iónica baja. Cuando se incorpora el péptido en la membrana el campo eléctrico de repulsión electrostática entre el péptido y la sonda es mayor en fuerza iónica baja, lo que justificaría un incremento mayor de la fluorescencia de DiSC₃(5) después de la adición del péptido en ausencia de valinomicina. Este hecho también fue mostrado por Lemeshko (2014) usando liposomas SUV (PC:PG, 9:1).

Para mostrar de otra forma el efecto del potencial superficial se adicionó el catión divalente Mg²⁺ a los liposomas que encapsularon medio salino (medio K₂SO₄) y que se suspendieron en medio sacarosa (Fig. 7.6). Se sabe que los cationes divalentes como Mg²⁺ pueden ser adsorbidos en la membrana y cambiar la carga eléctrica superficial (Träuble y Eibl 1974; Haynes y Staerk 1974). Según nuestros resultados, la adición de Mg²⁺ provocó un incremento de la fluorescencia de DiSC₃(5), el Mg²⁺ desplazaría la sonda catiónica adsorbida desde la membrana hacia el medio acuoso debido a la competencia electrostática entre ellas (Fig. 7.6B y 7.6D). En presencia de Mg²⁺ la recuperación de la fluorescencia después de la adición de los péptidos BTM-P1 y BTM-P4, y sus isómeros tipo D, fue comparable a lo observado en medio sin Mg²⁺; pero para los péptidos cortos y sus respectivos isómeros tipo D, la recuperación de la fluorescencia fue menor, posiblemente porque al ser péptidos más pequeños son más susceptibles a la competencia electrostática con el Mg²⁺. Es bien sabido que los cationes divalentes afectan la interacción péptido-membrana por el apantallamiento electrostático generado por los cationes (MacKinnon y Miller 1989; MacKinnon et al. 1989); por otra parte, se ha demostrado que la presencia de cationes divalentes como Mg²⁺ y Ca²⁺ puede proteger cultivos celulares contra la actividad permeabilizadora de los péptidos policatiónicos (Sahalan et al. 2013; Sugiarto y Yu 2007), por lo tanto, la concentración efectiva del péptido debe aumentar para destruir a las células

en presencia de estos cationes divalentes. El efecto del potencial superficial sobre la actividad permeabilizadora de los péptidos BTM-P1 y BTM-P4 (y sus isómeros tipo D) se podría observar si se trabajara a concentraciones más bajas, ya que tenemos antecedentes con bicapa lipídica plana, donde la adición de Mg^{2+} afectó la concentración efectiva de BTM-P1 para permeabilizar la membrana (ver capítulo 5, Fig. 5.9).

Para los péptidos policatiónicos evaluados en este trabajo, se muestra que la actividad permeabilizadora de estos en membranas es potencial-dependiente, y que dicha actividad se altera cuando se modula el potencial superficial por ejemplo adicionando Mg^{2+} en una suspensión de liposomas. El efecto de la fuerza iónica para modular el potencial superficial mostró la competencia electrostática que existe entre los péptidos y la sonda DiSC₃(5) adsorbida en la membrana.

8. CONCLUSIONES GENERALES

- 8.1. Fue implementada la técnica para evaluar la permeabilización potencial-dependiente de la bicapa lipídica plana con péptidos policatiónicos. Para ello, fue desarrollada una técnica novedosa de perforación eléctrica de láminas de Teflón, en cuyas perforaciones se forma la bicapa lipídica. Las perforaciones logradas usando uno de los dos electrodos con líquido, fueron de bordes finos, regulares y sin quemaduras, lo cual permitió formar la bicapa lipídica relativamente estable.
- 8.2. Se demostró que la permeabilización de la bicapa lipídica plana con los péptidos policatiónicos BTM-P1 y BTM-P4 depende del signo y del valor del potencial eléctrico aplicado a la membrana. La actividad permeabilizadora del péptido BTM-P4 fue significativamente superior a la actividad de BTM-P1.
- 8.3. La actividad permeabilizadora potencial-dependiente del péptido policatiónico anticancerígeno P7-5 fue más alta que la actividad del péptido P7-4.
- 8.4. En experimentos con el péptido BTM-P1 se demostró el efecto del potencial superficial de membrana, modulado por la adsorción del catión divalente Mg^{2+} , sobre la permeabilización potencial-dependiente de la bicapa lipídica plana.
- 8.5. Se diseñó un modelo computacional para el monitoreo del potencial transmembranal en suspensión de liposomas con la sonda catiónica DiSC₃(5). El modelo ha permitido definir las condiciones experimentales más adecuadas para monitorear el potencial transmembranal en función de la concentración de liposomas en la suspensión y la carga superficial de membrana.
- 8.6. Fue estudiada la permeabilización de liposomas con péptidos policatiónicos con o sin potencial de membrana. Los péptidos evaluados fueron BTM-P1 y BTM-P4, y sus respectivos fragmentos menos activos, BTM-P1CL y BTM-P4CL. EL péptido BTM-P4 fue significativamente más activo que el péptido BTM-P1.

- 8.7. La permeabilización de liposomas con los péptidos evaluados fue notablemente potencial-dependiente. Además, se mostró la influencia del potencial superficial sobre la interacción péptido-membrana y la permeabilización de liposomas.

- 8.8. El método desarrollado de perforación eléctrica de la lámina de Teflón, para la técnica de la bicapa lipídica plana, puede tener varias aplicaciones industriales. Los detalles del método se encuentran especificados en las reivindicaciones de la patente solicitada ante la Superintendencia de Industria y Comercio (Número de Radicado 13016117, Gaceta 701) y en la solicitud PCT con número de publicación internacional WO 2014/118698.

APÉNDICE

A.1 Programación del microcontrolador PIC16F877 para su implementación en el generador de pulsos programables del aparato de perforación eléctrica

El generador de pulsos programable del aparato de perforación eléctrica construido en este trabajo de tesis doctoral, cuyo “corazón” del circuito (ver Fig. 4.3) fue el microcontrolador PIC16F877 programado con el software Proton IDE versión 1.0.4.6. A continuación se muestra las rutinas, en lenguaje BASIC, para la programación del microcontrolador:

Programa del PIC hecho en lenguaje basic.

```
' Read channel 0 of on-board ADC and display the results
Config HS_OSC , WDT_OFF , PWRTE_ON , BODEN_OFF , LVP_OFF , CP_OFF , DEBUG_OFF
```

```
Device = 16F877A      ' Microncontrolador usado: 16F877A
XTAL = 20             ' El hardware utiliza un cristal de 20 MHz
```

```
' Declaraciones sobre las conexiones a los puertos del LCD
```

```
LCD_DTPIN = PORTD.4
LCD_RSPIN = PORTD.2
LCD_ENPIN = PORTD.3
LCD_INTERFACE = 4    ' 4-bit Interface
LCD_LINES = 2
LCD_TYPE = ALPHANUMERIC
```

```
Output PORTC.1
Output PORTC.2
```

```
WATCHDOG = OFF
ALL_DIGITAL = TRUE
PORTB_PULLUPS = TRUE
```

' Definición de variables y su respectivo tipo de dato usando la instrucción Dim

```
Dim Col      As Word      ' Variable de 8-bit (0 a 255)
Dim Row      As Word      ' Variable de 8-bit (0 a 255)
Dim Key      As Word      ' Variable de 8-bit (0 a 255)
Dim TECLA    As Word      ' Variable de 8-bit (0 a 255)
Dim n        As Word      ' Variable de 16-bit (0 a 65535)
Dim t        As Word      ' Variable de 16-bit (0 a 65535)
Dim a        As Word      ' Variable de 16-bit (0 a 65535)
Dim repita   As Word      ' Variable de 16-bit (0 a 65535)
Dim i        As Word      ' Variable de 8-bit (0 a 255)
Dim j        As Word      ' Variable de 8-bit (0 a 255)
Dim k        As Word      ' Variable de 8-bit (0 a 255)
Dim n_in[7] As Word      ' Variable de 8-bit (0 a 255)
Dim t_in[7] As Word      ' Variable de 8-bit (0 a 255)
Dim a_in[7] As Word      ' Variable de 8-bit (0 a 255)
Dim repita_in[7] As Word ' Variable de 8-bit (0 a 255)
```

'Etiqueta que controla el mensaje de inicio después de encender el equipo principal:

```
Cls                'Limpia la pantalla del LCD y ubica el cursor en la línea 1 en la posición 1
DelayMS 200        'Esperar 0.2 segundos
Print At 1,1," IGNITION COIL"    'Imprimir en la pantalla " IGNITION COIL"
Print At 2,1, " BIOPHYSICS "    'Imprimir en la pantalla " BIOPHYSICS"
DelayMS 1500       'Esperar 1.5 segundos
```

```
While 1=1
  GoSub iniciar0
  GoSub iniciar1
  If t<65535 Then
    If t>0 Then
      GoSub iniciar2
      DelayMS 500
      GoSub iniciar3
    Else
      Cls
      Print At 1,1, "INGRESAR t"
```

```

    DelayMS 1500
    Cls
EndIf
'
If biuni<5 Then
    If t>0 Then
        Cls
        Print At 1,1, "EN PROCESO...."
        DelayMS 1000
        GoSub unipolar1
        Cls
        Print At 1,2, "EL PROCESO HA"
        Print At 2,4, "FINALIZADO"
        DelayMS 3000
        GoSub iniciar4
    Else
        Cls
        Print At 1,1,"ERROR"
        DelayMS 1000
        Print At 2,1," De nuevo "
        DelayMS 1000
    EndIf
Else
    Cls
    Print At 1,1, "ERROR t<65535ms"
    DelayMS 1000
    Print At 2,1,"De nuevo"
    DelayMS 1000
EndIf

Wend

' Subrutina para obtener una orden del teclado
Getkey:
    DelayMS 50                                ' Rebote

Getkeyu:
    ' Espere a que todas las teclas estén listas

```

```

PORTB = 0                                ' Todos los pines de salida del puerto B están en nivel
bajo
TRISB = $F0
PORTB_PULLUPS =TRUE                      ' Inferior 4 pines de salida, superior 4 pines de entrada
If (PORTB >> 4) <> $0F Then Getkeyu      ' Si cualquiera de las teclas baja, conecte el circuito

DelayMS 50                                ' Rebote

Getkeyp:
' Esperar pulsación de tecla
For Col = 0 To 3                          ' 4 columnas en el teclado
  PORTB = 0                                ' Todos los pines de salida en bajo
  TRISB = (DCD Col) ^ $FF                  ' Ajusta un pin de la columna a la salida
  Row = PORTB >> 4                          ' Leer fila
  If Row <> $0F Then Gotkey                 ' Si cualquier tecla se presiona, salir
Next
GoTo Getkeyp                              ' Ninguna tecla se presiona, ir a buscar de nuevo

Gotkey: ' Cambio de fila y columna al número de la tecla 1-16
  Key = (Col * 4) + (NCD (Row ^ $0F))
  Select Key
  Case 1 : Key=10
  Case 2 : Key=11
  Case 3 : Key=13
  Case 4 : Key=14
  Case 5 : Key=15
  Case 6 : Key=9
  Case 7 : Key=6
  Case 8 : Key=3
  Case 9 : Key=0
  Case 10: Key=8
  Case 11: Key=5
  Case 12: Key=2
  Case 13: Key=12
  Case 14: Key=7
  Case 15: Key=4
  Case 16: Key=1
EndSelect

```

Return

'FUNCIONES

'INICIAR 0 Etiqueta que va a la otra etiqueta numero_pulsos

iniciar0:

GoSub numero_pulsos

Return

'INICIAR 1

iniciar1:

Cls

Print At 1,1, " DURACION PULSO "

Print At 2,1, " unidades ms"

DelayMS 1500

GoSub duracion_pulsos

Return

'INICIAR 2

iniciar2:

DelayMS 1000

GoSub tiempo_entre_pulsos

Return

'INICIAR 3

iniciar3:

Cls

Print At 1,1, " PULSO UNIPOLAR"

'Print At 2,1, "b=1;p=2;n=3;d=4"

DelayMS 1500

'GoSub bip_unip_unin

'GoSub unipolar

Return

'INICIAR 4

iniciar4:

Cls

Print At 1,1, " ¿REPETIR?"

```
Print At 2,1, "Si=1; No=2"
```

```
DelayMS 1500
```

```
GoSub repeticion
```

```
Return
```

```
' Etiqueta numero_pulsos ----> Sirve para programar el número de pulsos a enviar
```

```
numero_pulsos:
```

```
Cls
```

```
i=0
```

```
j=0
```

```
Print At 1,1, "Numero de Pulsos"
```

```
Print At 2,1, "N="
```

```
While i<=6
```

```
  GoSub Getkey
```

```
  TECLA=Key
```

```
  If TECLA<10 Then
```

```
    i=i+1
```

```
      j=j+1
```

```
    Let n_in[i]=TECLA
```

```
      Print At 2,j+2,@TECLA
```

```
      DelayMS 300
```

```
  EndIf
```

```
  If i=1 Then
```

```
    n=n_in[1]
```

```
  EndIf
```

```
  If i=2 Then
```

```
    n=10*n_in[1]+n_in[2]
```

```
  EndIf
```

```
  If i=3 Then
```

```
    n=100*n_in[1]+10*n_in[2]+n_in[3]
```

```
  EndIf
```

```
  If i=4 Then
```

```
    n=1000*n_in[1]+100*n_in[2]+10*n_in[3]+n_in[4]
```

```
  EndIf
```

```
  If i=5 Then
```

```
    n=10000*n_in[1]+1000*n_in[2]+100*n_in[3]+10*n_in[4]+n_in[5]
```

```
  EndIf
```

```
  If i=6 Then
```

```

    GoTo numero_pulsos
        n=0
    EndIf
    If TECLA=14 Then
        Return
    EndIf
    If TECLA=12 Then
        n=0
        GoTo numero_pulsos
    EndIf
Wend

```

duracion_pulsos:

```

Cls
i=0
j=0
Print At 1,1, "Tiempo en ms"
Print At 2,1, "ms="
While i<=6
    GoSub Getkey
    TECLA=Key
    If TECLA<10 Then
        i=i+1
        j=j+1
        Let t_in[i]=TECLA
        Print At 2,j+3,@TECLA
        DelayMS 300
    EndIf
    If i=1 Then
        t=t_in[1]
    EndIf
    If i=2 Then
        t=10*t_in[1]+t_in[2]
    EndIf
    If i=3 Then
        t=100*t_in[1]+10*t_in[2]+t_in[3]
    EndIf
    If i=4 Then

```

```

        t=1000*t_in[1]+100*t_in[2]+10*t_in[3]+t_in[4]
    EndIf
    If i=5 Then
        t=10000*t_in[1]+1000*t_in[2]+100*t_in[3]+10*t_in[4]+t_in[5]
    EndIf
    If i=6 Then
        GoTo duracion_pulsos
        t=0
    EndIf
    If TECLA=14 Then
        Return
    EndIf
    If TECLA=12 Then
        t=0
        GoTo duracion_pulsos
    EndIf
Wend

```

```

tiempo_entre_pulsos:
Cls
i=0
j=0
Print At 1,1, "T entre pulsos"
Print At 2,1, "ms="
While i<=6
    GoSub Getkey
    TECLA=Key
    If TECLA<10 Then
        i=i+1
        j=j+1
        Let a_in[i]=TECLA
        Print At 2,j+3,@TECLA
        DelayMS 300
    EndIf
    If i=1 Then
        a=a_in[1]
    EndIf

```

```

If i=2 Then
    a=10*a_in[1]+a_in[2]
EndIf
If i=3 Then
    a=100*a_in[1]+10*a_in[2]+a_in[3]
EndIf
If i=4 Then
    a=1000*a_in[1]+100*a_in[2]+10*a_in[3]+a_in[4]
EndIf
If i=5 Then
    a=10000*a_in[1]+1000*a_in[2]+100*a_in[3]+10*a_in[4]+a_in[5]
EndIf
If i=6 Then
    GoTo duracion_pulsos
    a=0
EndIf
If TECLA=14 Then
    Return
EndIf
If TECLA=12 Then
    a=0
    GoTo tiempo_entre_pulsos
EndIf
Wend

'bip_unip_unin:
repeticion:
Cls
i=0
j=0
Print At 1,1, " Si=1; No=2"
Print At 2,1, " ESCOJA="
While i<=2
    GoSub Getkey
    TECLA=Key
    If TECLA<3 Then
        i=i+1
        j=j+1
    
```

```

        Let repita_in[i]=TECLA
    Print At 2,j+8,@TECLA
        DelayMS 300
EndIf
    If TECLA=1 Then
        repita=repita_in[1]
        GoTo unipolar_repet
'
        Goto iniciar4
    EndIf
    If TECLA=2 Then
        repita=repita_in[2]
'
        biuni=0
'
        Return
        GoTo principal
    EndIf
    If TECLA=14 Then
        Return
    EndIf
    If TECLA=12 Then
'
        biuni=0
        GoTo repeticion
    EndIf
Wend

```

unipolar1:

```

    For k=1 To n
    Print At 2,1,"PULSO #= " ,@k
    High PORTC.2
    DelayMS t
    Low PORTC.2
    DelayMS a
    Next
' If repita=repita_in[1] then
' GoTo iniciar4
' Endif
' If repita=repita_in[2] then
' Goto principal
' Endif

```

```

' If repita=0 then
  Return
' Endif

unipolar_repet:
  For k=1 To n
    Print At 2,1,"PULSO #= ",@k
    High PORTC.2
    DelayMS t
    Low PORTC.2
    DelayMS a
  Next
  If repita=repita_in[1] Then
    GoTo iniciar4
  EndIf
  If repita=repita_in[2] Then
    GoTo principal
  EndIf
' If repita=0 Then
' Return
' EndIf

```

A.2 Manual para la programación de pulsos (o descargas eléctricas) desde el equipo generador de pulsos programable

El equipo generador de pulsos programable (Fig. A.1) permite controlar la apertura y cierre del interruptor electrónico (MOSFET) del circuito de conmutación donde está el transformador elevador de voltaje que produce las descargas eléctricas. Sobre el MOSFET se aplican pulsos cuadrados cuyo ancho, espacio entre pulsos y número de pulsos se programan.



Fig. A.1 Panel frontal del equipo generador de pulsos programable. El usuario puede programar pulsos cuadrados cuyo ancho, espacio entre pulsos y número de pulsos es ajustable utilizando el teclado matricial y observando los datos ingresados en la pantalla LCD. Para encender el equipo sólo se presiona el interruptor que está en la parte trasera del equipo, inmediatamente el LED se encenderá, la iluminación de la pantalla LCD se puede controlar con la perilla que aparece en el panel. El usuario en cualquier caso puede interrumpir la actividad del equipo presionando el botón “Reset”.

Para utilizar el equipo generador de pulsos programable se debe llevar a cabo los siguientes pasos:

1. Encienda el equipo utilizando el interruptor que se encuentra en la parte trasera de este.
2. Una vez encendido en la pantalla LCD del equipo aparecerá el mensaje de introducción: **“IGNITION COIL BIOPHYSICS”**.
3. Luego aparece el mensaje: **“Numero de Pulsos, N= ”**. Ingrese el número de pulsos equivalente al número de descargas eléctricas que desea aplicar sobre la lámina orgánica, presione la tecla **“#”** para aceptar o la tecla **“*”** para cancelar y modificar el número.
4. Una vez ingresado y aceptado el número de pulsos aparecerá el mensaje: **“Tiempo en ms, ms= ”** el cual corresponde al ancho o duración del pulso. Ingrese 3 ms, ni más ni menos. Presione la tecla **“#”** para aceptar o la tecla **“*”** para cancelar y modificar el número.
5. Después de programar la duración del pulso aparecerá el mensaje: **“T entre pulsos, ms”** que corresponde al tiempo de separación entre los pulsos cuadrados. Ingrese cualquier valor siendo el mínimo de 3 ms y el máximo 65535 ms. Presione la tecla **“#”** para aceptar o la tecla **“*”** para cancelar y modificar el número.

6. Después de dar aceptar en la programación del tiempo entre pulsos, en el equipo aparecerá en la pantalla LCD el mensaje “**EN PROCESO. . . ., PULSO #= __**” el cual indica que las descargas están ocurriendo y a un número determinado de pulsos eléctricos.
7. Una vez terminado el proceso de descargas eléctricas aparece el mensaje “**.REPETIR?, Si=1, No=2**” donde el usuario deberá presionar la tecla “**1**” si desea repetir el proceso de descarga eléctrica usando el mismo régimen programado, o presionar la tecla “**2**” si desea programar otro régimen de descargas eléctricas.

A.3 Diseño y programación del software de adquisición de datos utilizando Labview y manual de operación

Para observar el voltaje aplicado a través de la bicapa lipídica plana (BLP) y los registros de la corriente eléctrica a través de esta fue diseñada la aplicación “BLM-Registrador” en Labview cuyo panel frontal se muestra en la Fig. A.2. Con esta aplicación es posible hacer offset de las señales obtenidas desde nuestro sistema de adquisición de datos NI USB-6281 (National Instruments) y filtro de ruido sobre la señal de corriente. El voltaje aplicado sobre BLP desde un generador de señales se visualiza en la pantalla negra superior (panel superior) y la corriente a través de la BLP en la pantalla negra inferior (panel inferior); se debe tener en cuenta que el sistema de adquisición de datos registra voltaje, por ende se debe hacer la conversión manualmente según el preamplificador que usamos cuyo circuito fue un amplificador de transimpedancia (1pA/1mV).

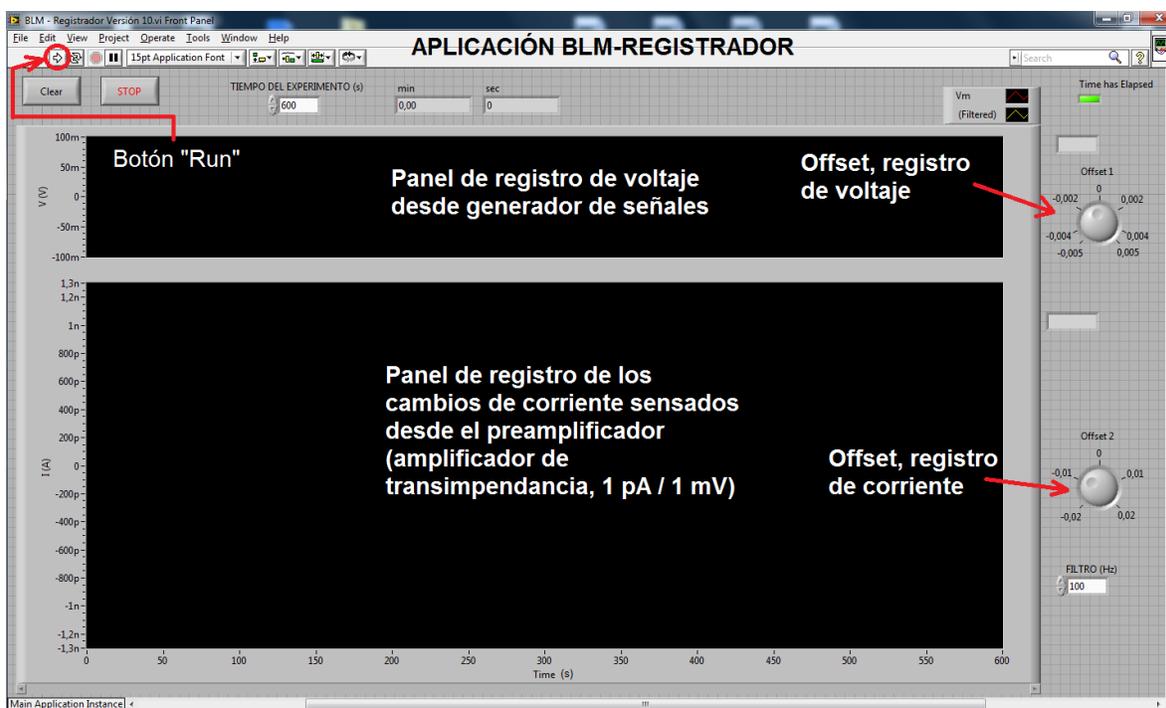


Fig. A.2 Panel frontal de la aplicación BLM-Registrador diseñado en Labview 2010 para visualizar los datos de voltaje y corriente a través de la bicapa lipídica plana (BLP). La aplicación consta de dos paneles, uno para registrar el voltaje aplicado a la BLP desde un generador de señales, y el otro para registrar los cambios de corriente a través de la BLP, teniendo en cuenta que la señal proviene desde un preamplificador cuyo circuito es un amplificador de transimpedancia cuyo factor de conversión corriente a voltaje fue $1\text{pA}/1\text{mV}$. La aplicación permite hacer ajustes de offset y filtro de ruido, además permite programar el rango de tiempo que el experimentador quiere visualizar.

La programación de la aplicación “BLM-Registrador” se muestra en la Fig. A.3; los detalles del bloque de programación “Gentr Add Attribs” perteneciente a “BLM-Registrador” se muestran en la Fig. A.4, la función desde este bloque o subprograma es controlar que el tiempo de adquisición del NI USB-6281 no se desfase del tiempo real del usuario.

Para utilizar la aplicación “BLM-Registrador”, se debe tener apagado el generador de señales y el amplificador de la estación de trabajo de bicapa lipídica plana (Fig. 5.2). El sistema de adquisición de datos debe estar encendido y se debe dar clic al botón “Run” en la aplicación (ver Fig. A.2) para iniciar el registro; aparecerá una ventana de Windows que le preguntará si desea guardar los datos, para este caso, dar clic en cancelar. El sistema de adquisición y la aplicación “BLM-Registrador” iniciarán el registro, y con las perillas de

“Offset” ajustar a cero las señales en ambos paneles; una vez realizado esto, dar clic en el botón STOP (ver Fig. A.2).

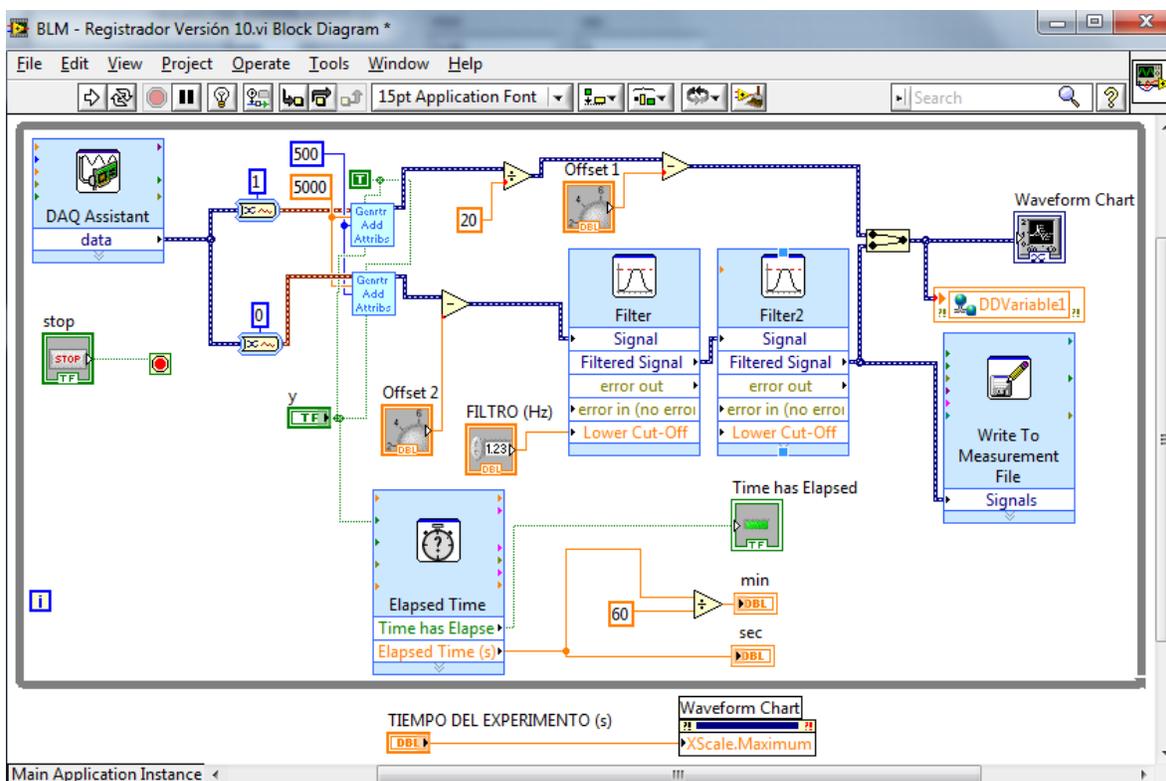


Fig. A.3 Diagrama de bloques para la programación de la aplicación “BLM-Registrador” con Labview. Los detalles del bloque “Gentr Add Attribs” se muestran en la Fig. A.4.

Para visualizar las señales eléctricas y almacenar los datos de corriente eléctrica es importante que la bicapa lipídica esté montada y toda la instrumentación alrededor de esta esté apagada, excepto el sistema de adquisición de datos. Dar clic en el botón “Run” (ver Fig. A.2), aparecerá una ventana de Windows para guardar el registro, seleccione la carpeta de almacenamiento del registro y escriba un nombre para el archivo, la aplicación mostrará las señales de corriente y voltaje en tiempo real con valor cero. Encienda el amplificador primero y luego el generador de señales (con el valor de voltaje que desea trabajar) desde la estación de trabajo de bicapa lipídica plana (Fig. 5.2). Es posible que el usuario requiera hacer algunos ajustes y visualizar algunos registros que luego puede descartar dando clic en el botón “Clear” (ver Fig. A.2, parte superior izquierda), la aplicación borrará los registros y empezará desde cero segundos conservando el nombre de archivo original. Una vez

tomado el registro, apagar primero el amplificador y luego el generador de señales, y dar clic en el botón STOP (ver Fig. A.2, parte superior izquierda) de la aplicación para detener la adquisición de datos.

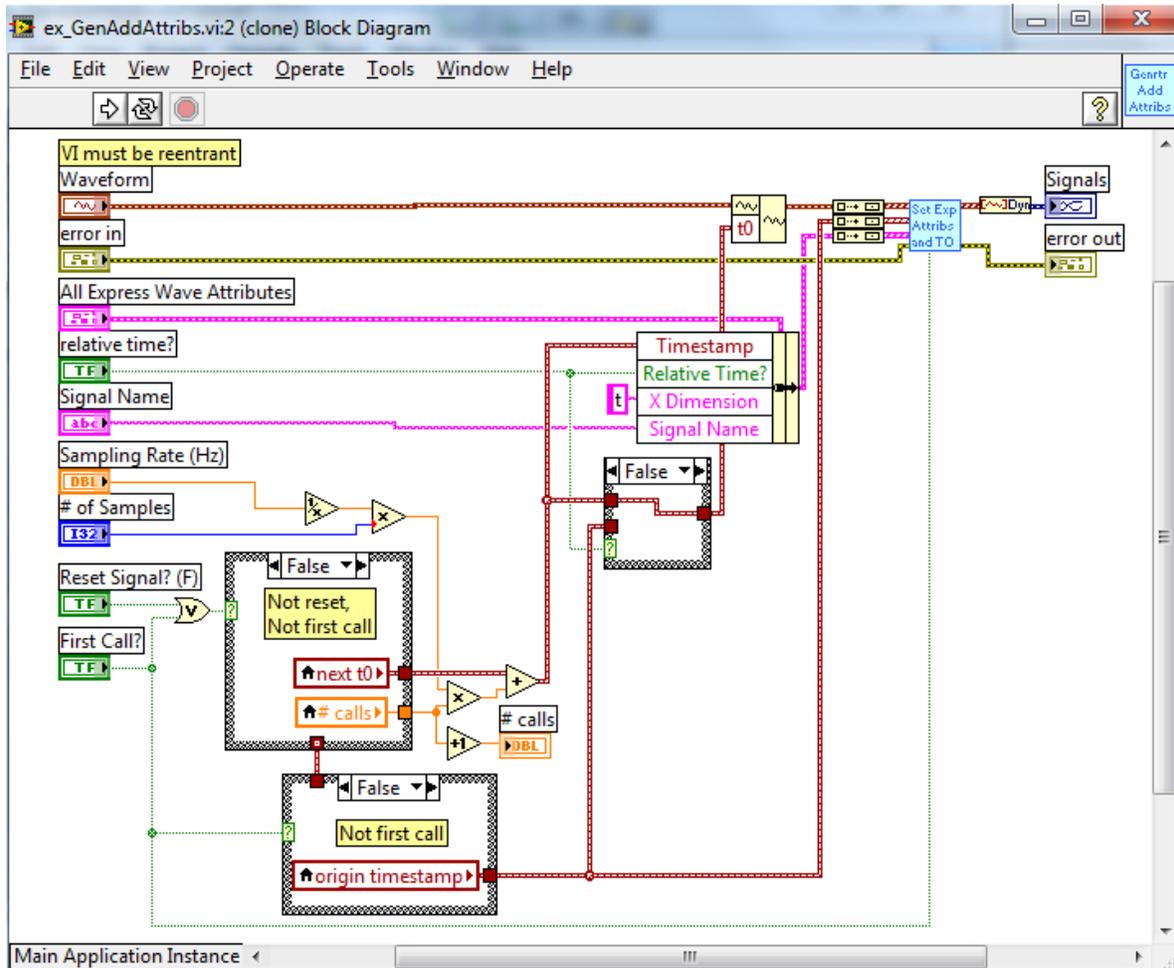


Fig. A.4 Subprograma o bloque “Gentr Add Attribs” perteneciente al bloque de programación de la aplicación “BLM-Registrador”. La función de este subprograma es asegurar que no se desfase el tiempo de adquisición de datos con el tiempo real del usuario.

Los datos de corriente eléctrica que fueron almacenados desde la aplicación “BLM-Registrador” se pueden visualizar y analizar desde la aplicación “Lector-BLM” también programado en Labview 2010 y cuyo panel frontal se muestra en la Fig. A.5.

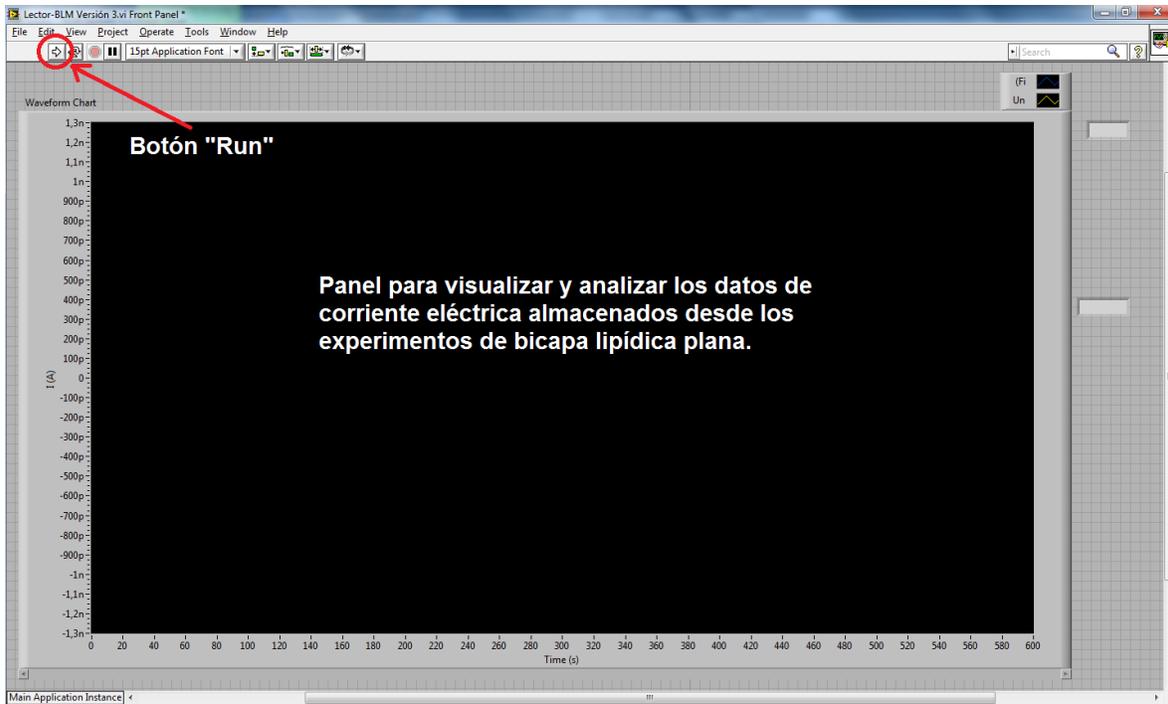


Fig. A.5 Aplicación “Lector-BLM” para visualizar los registros de corriente eléctrica en experimentos de bicapa lipídica plana.

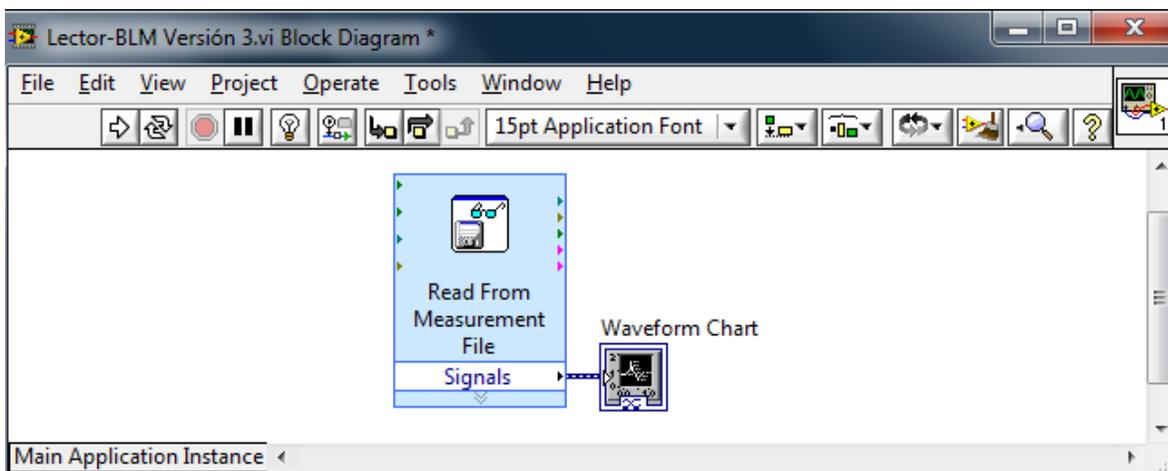


Fig. A.6 Diagrama de bloques de la programación de la aplicación “Lector-BLM”.

Los detalles de la programación en Labview de la aplicación “Lector-BLM” se muestran en la Fig. A.6. Desde el bloque “Read From Measurement File” se puede seleccionar la carpeta donde fueron almacenados los registros para abrirlos fácilmente, para ello se debe dar clic derecho con el mouse y aparecerá una ventana donde el usuario podrá seleccionar la carpeta. Una vez seleccionada la carpeta volvemos al panel frontal de la aplicación

“Lector-BLM” y damos clic en el botón “Run” (ver Fig. A.5), aparecerá una ventana de Windows donde el usuario seleccionará el archivo de registro que desea visualizar para analizar. La aplicación permite ajustar el rango de tiempo y el rango de corriente dando doble clic en los extremos de cada eje y escribir manualmente el valor. Con la aplicación es posible guardar una imagen del registro en formato BMP, para ello se da clic derecho sobre el panel y seleccionar en la siguiente secuencia Export >> Export Simplified Image; aparecerá una ventana de Windows denominada “Export Simplified Image” donde el usuario podrá escoger la carpeta donde desee guardar la imagen.

Listado de figuras

Figura	Página
Fig. 2.1 Estructuras de péptidos antimicrobianos.	5
Fig. 2.2 Modelos de permeabilización de membrana	7
Fig. 2.3 Estructura de los fosfolípidos	8
Fig. 2.4 Formas de lípidos y organización supramolecular (polimorfismo).	9
Fig. 2.5 Principios de la técnica bicapa lipídica plana (BLP)	10
Fig. 2.6 Clasificación de vesículas de membrana según su tamaño y laminaridad . .	11
Fig. 2.7 Etapas para la producción de liposomas LUV o SUV.	12
Fig. 2.8 Mecanismo para generar potencial transmembranal en liposomas.	13
Fig. 2.9 Representación esquemática de la doble capa eléctrica que rodea una partícula en medio acuoso.	14
Fig. 4.1 Esquemas del aparato de perforación eléctrica construido en nuestro Laboratorio	18
Fig. 4.2 Circuito de conmutación del aparato de perforación eléctrica	19
Fig. 4.3 Circuito del generador de pulsos cuadrados programable	20
Fig. 4.4 Circuitos de otras fuentes de voltaje	21
Fig. 4.5 Sistema de perforación eléctrica de láminas orgánicas desarrollado en el Laboratorio	22
Fig. 4.6 Forma de las descargas eléctricas en presencia y ausencia de una lámina orgánica.	23
Fig. 4.7 Perforaciones formadas en láminas de Teflón blanco y transparente utilizando la configuración de electrodos metal-metal.	24
Fig. 4.8 Correlación entre el tamaño de las perforaciones y el número de descargas eléctricas aplicadas sobre algunas láminas orgánicas	25
Fig. 4.9 Perforaciones en Teflón transparente, polietileno y vinilo que fueron hechas usando las configuraciones de electrodos metal-metal, metal-aire, metal-electrolito y metal-agua a diferentes números de pulsos	26
Fig. 4.10 Variación del tamaño de las perforaciones según la frecuencia de las descargas eléctricas	27

Fig. 4.11 Fijación de sustancias en los bordes de perforaciones formadas con descargas eléctricas en láminas orgánicas.	29
Fig. 4.12 Perforaciones realizadas en láminas de Teflón transparente y Teflón blanco pintadas con pintura luminiscentes después de la aplicación de descargas eléctricas	30
Fig. 5.1 Esquema de una estación de trabajo para experimentos con bicapa lipídica plana (BLP)	38
Fig. 5.2 Estación de trabajo para experimentos con bicapa lipídica plana (BLP) instalado en nuestro Laboratorio	39
Fig. 5.3 Montaje para bicapa lipídica plana (BLP)	40
Fig. 5.4 Cubeta doble de Teflón	41
Fig. 5.5 Seguimiento de la formación de la bicapa lipídica plana (BLP).	42
Fig. 5.6 Preparación de los lípidos para experimentos con bicapa lipídica plana	43
Fig. 5.7 Registro de la corriente eléctrica a través de la bicapa lipídica plana antes y después de la adición de 0.2 μ M BTM-P4CD	45
Fig. 5.8 Permeabilización potencial-dependiente de bicapa lipídica plana (BLP) con los péptidos BTM-P1 y BTM-P4	46
Fig. 5.9 Permeabilización potencial-dependiente de la bicapa lipídica plana con el péptido BTM-P1 en medio salino con magnesio.	47
Fig. 5.10 Permeabilización potencial-dependiente de la bicapa lipídica plana (BLP) con los péptidos anticancerígenos P7-4 y P7-5.	48
Fig. 6.1 Modelos para la distribución potencial-dependiente de la sonda catiónica DiSC ₃ (5) entre las fases acuosas interna (<i>in</i>) y externa (<i>out</i>) de vesículas de membrana, como también entre la fases acuosas y las correspondientes monocapas de la membrana.	55
Fig. 6.2 Modelos de distribución potencial-dependiente en las cantidades de los monómeros DiSC ₃ (5) en la fase membrana (M_m) y en las fases acuosas (M_a , interna y externa) de una suspensión de liposomas compuesta de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) y aniónicos a ($AP=10\%$ o $AP=20\%$), de acuerdo al modelo A (Fig. 6.1A)	64
Fig. 6.3 Cambios dependientes del potencial transmembranal ($\Delta\psi$) en los potenciales superficiales de las monocapas interna (ϕ_i) y externa (ϕ_o) de la	

membrana de los liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) y aniónicos ($AP=10\%$ o $AP=20\%$), de acuerdo al modelo A (Fig. 6.1A)	66
Fig. 6.4 Cambios dependientes del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) en las cantidades de monómeros DiSC ₃ (5) en la membrana (M_m) y en las fases acuosas (M_a , interna y externa), como de los dímeros en la fases acuosas (D_a , interna y externa) de una suspensión de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) y aniónicos ($AP=10\%$ o $AP=20\%$), de acuerdo al modelo B (Fig. 6.1B)	67
Fig. 6.5 Cambios dependientes del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) en las cantidades de monómeros DiSC ₃ (5) en la membrana (M_m) y en las fases acuosas (M_a , interna y externa), como también de dímeros DiSC ₃ (5) en la fase membrana (D_m) de una suspensión de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) y aniónicos ($AP=10\%$ o $AP=20\%$), de acuerdo al modelo C (Fig. 6.1C)	68
Fig. 6.6 Cambios dependientes del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) en las cantidades de monómeros DiSC ₃ (5) en la membrana (M_m) y en las fases acuosas (M_a , interna y externa), como también de dímeros DiSC ₃ (5) en la membrana (D_m) y en la fases acuosas (D_a , interna y externa) de una suspensión de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) y aniónicos ($AP=10\%$ o $AP=20\%$), de acuerdo al modelo D (Fig. 6.1D)	69
Fig. 6.7 Cambios dependientes del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) en los potenciales de superficie de las monocapas interna (ϕ_i) y externa (ϕ_o) de la membrana de los liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) y aniónicos ($AP=20\%$), de acuerdo al modelo D (Fig. 6.1D).	72
Fig. 6.8 Cambios dependientes del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) en las cantidades de monómeros DiSC ₃ (5) en la membrana (M_m) y en las fases acuosas (M_a , interna y externa), como también de la razón M_a/M_m en una suspensión de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros a una concentración (C_{phl}) de 10-100 μM	73
Fig. 6.9 Representación semi-logarítmica de las razones M_a/M_m como función del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) para varias concentraciones de liposomas (C_{phl} , 10-100 μM de fosfolípidos) compuestos de fosfolípidos neutros ($AP=0\%$) y aniónicos ($AP=20\%$), de acuerdo al modelo D (Fig. 6.1D).	74
Fig. 7.1 Preparación de liposomas por extrusión (liposomas LUV)	86

Fig. 7.2 Permeabilización potencial-dependiente de liposomas con péptidos policatiónicos	88
Fig. 7.3 Permeabilización de liposomas de manera potencial-dependiente con péptidos policatiónicos.	89
Fig. 7.4 Permeabilización potencial-dependiente de liposomas LUV con el péptido BTM-P4.	90
Fig. 7.5 Permeabilización potencial-dependiente de liposomas con los péptidos A) BTM-P1 y B) BTM-P4 en medio sacarosa	91
Fig. 7.6 Evaluación del efecto del catión divalente Mg^{2+} sobre la interacción péptido-membrana.	92
Fig. A.1 Panel frontal del equipo generador de pulsos programable	111
Fig. A.2 Panel frontal de la aplicación BLM-Registrador diseñado en Labview 2010 para visualizar los datos de voltaje y corriente a través de la bicapa lipídica plana (BLP).	113
Fig. A.3. Diagrama de bloques para la programación de la aplicación “BLM-Registrador” con Labview.	114
Fig. A.4 Subprograma o bloque “Gentr Add Attribs” perteneciente al bloque de programación de la aplicación “BLM-Registrador”.	115
Fig. A.5 Aplicación “Lector-BLM” para visualizar los registros de corriente eléctrica en experimentos de bicapa lipídica plana	116
Fig. A.6 Diagrama de bloques de la programación de la aplicación “Lector-BLM” .	116

Listado de tablas

Tabla	Página
<p>Tabla 6.1 Influencia del tamaño de los liposomas sobre la cantidad de monómeros DiSC₃(5) en las fases acuosas (M_a, interna y externa) según el potencial transmembranal $\Delta\Psi$ en una suspensión de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP\%=0$) o aniónicos ($AP\%=20$). Se utilizaron 33 μM de fosfolípidos y 0.2 μM de DiSC₃(5) para los cálculos</p>	72
<p>Tabla 6.2 Influencia del tamaño de los liposomas sobre la cantidad de monómeros DiSC₃(5) en las fases acuosas (M_a, interna y externa) según el potencial transmembranal $\Delta\Psi$ en una suspensión de liposomas compuestos de fosfolípidos neutros ($AP\%=0$) o aniónicos ($AP\%=20$). Se utilizaron 33 μM de fosfolípidos y 2.0 μM de DiSC₃(5) para los cálculos</p>	73

LISTA DE PUBLICACIONES

Alvarez-Bustamante JA, Lemeshko VV (2016) Computational models for monitoring the trans-membrane potential with fluorescent probes: the DiSC3(5) case. *Eur Biophys J* 45(8):815-830. (Artículo).

Lemeshko VV, Alvarez JA (2012) Electrical aspects of membrane permeabilization by new polycationic peptides derived from the Cry11Bb protoxin. *Biophys J* 102(3): 656a. (Abstract).

Lemeshko VV, Alvarez JA (2013) Synergistic cell permeabilization by external electrical pulses and new anticancer peptides designed on the basis of the Cry11Bb protoxin. *Biophys J* 104(2), Suppl.1: 599a. (Abstract).

Lemeshko VV, Alvarez JA (2013) Computational model for monitoring of the membrane potential with the fluorescent probe DiSC3(5). *FASEB J* 27:802.1. (Abstract).

Solicitud de Patente (Estado: Bajo examen de fondo)

Lemeshko VV, Alvarez-Bustamante JA (2013) Método y aparato para la perforación eléctrica de láminas. Número de solicitud 13-016117, Gaceta 701. Superintendencia de Industria y Comercio, Colombia.

Lemeshko VV, Alvarez-Bustamante JA (2014) Método y aparato para la perforación eléctrica de láminas. Número de solicitud PCT/IB2014/058604, Número de publicación WO2014118698 A1.

Presentaciones en Congresos

Alvarez-Bustamante JA, Lemeshko VV (2013) Un modelo simple para monitorear potencial transmembranal en liposomas con la sonda de fluorescencia DiSC₃(5). V Congreso Internacional de Formación y Modelación en Ciencias Básicas, Medellín-Antioquia, Colombia. (Ponencia).

Álvarez-Bustamante JA, Lemeshko VV (2014) Aparato Y herramientas para la perforación eléctrica fina de láminas orgánicas. IV Congreso Nacional de Ingeniería Física, Cauca-Popayán, Colombia. (Póster).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez-Bustamante JA, Lemeshko VV (2016) Computational models for monitoring the trans-membrane potential with fluorescent probes: the DiSC3(5) case. *Eur Biophys J* 45(8):815-830

Apell HJ, Bersch B (1987) Oxonol VI as an optical indicator for membrane potentials in lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 903(3):480-494

Arias M, Orduz S, Lemeshko VV (2009) Potential-dependent permeabilization of plasma membrane by the peptide BTM-P1 derived from the Cry11Bb1 protoxin. *Biochim Biophys Acta* 1788(2):532-537

Aspedon A, Groisman EA (1996) The antibacterial action of protamine: evidence for disruption of cytoplasmic membrane energization in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* 142 (Pt 12):3389-3397

Bahar AA, Ren D (2013) Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)* 6(12):1543-1575

Belokoneva OS, Villegas E, Corzo G, Dai L, Nakajima T (2003) The hemolytic activity of six arachnid cationic peptides is affected by the phosphatidylcholine-to-sphingomyelin ratio in lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1617(1-2):22-30

Belosludtsev KN, Belosludtseva NV, Agafonov AV, Penkov NV, Samartsev VN, Lemasters JJ, Mironova GD (2015) Effect of surface-potential modulators on the opening of lipid pores in liposomal and mitochondrial inner membranes induced by palmitate and calcium ions. *Biochim Biophys Acta* 1848(10 Pt A):2200-2205

Bullock JO, Armstrong SK, Shear JL, Lies DP, McIntosh MA (1990) Formation of ion channels by colicin B in planar lipid bilayers. *J Membr Biol* 114(1):79-95

Bunting JR, Phan TV, Kamali E, Dowben RM (1989) Fluorescent cationic probes of mitochondria. Metrics and mechanism of interaction. *Biophys J* 56(5):979-993

Cabrini G, Verkman AS (1986a) Mechanism of interaction of the cyanine dye diS-C3-(5) with renal brush-border vesicles. *J Membr Biol* 90(2):163-175

Cabrini G, Verkman AS (1986b) Potential-sensitive response mechanism of diS-C3-(5) in biological membranes. *J Membrane Biol* 92(2):171-182

Chanturiya AN, Basañez G, Schubert U, Henklein P, Yewdell JW, Zimmerberg J (2004) PB1-F2, an influenza A virus-encoded proapoptotic mitochondrial protein, creates variably sized pores in planar lipid membranes. *J Virol* 78(12):6304-6312

Chanturiya A (2013) Quick start on BLM technique. Eastern Scientific LLC, second edition

Clarke RJ (1991) Binding and diffusion kinetics of the interaction of a hydrophobic potential-sensitive dye with lipid vesicles. *Biophys Chem* 39(1):91-106

Cohen LB, Salzberg BM (1978) Optical measurement of membrane potential. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 83:35-88

Cooper RA (1978) Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *J Supramol Struct* 8(4):413-430

De Araújo Lopes SC, dos Santos Giuberti C, Ribeiro Rocha TG, dos Santos Ferreira D, Leite EA, Oliveira MC (2013) Chapter 4: Liposomes as carriers of anticancer drugs - from “cancer treatment - conventional and innovative approaches”. Publisher: InTech

Deleers M, Servais JP, de Laveleye F, Wulfert E (1984) Effect of lipid composition changes on carbocyanine dye fluorescent response. *Biochem Biophys Res Commun* 123(1):178-185

Dubal DP, Lee SH, Kim JG, Kim WB, Lokhande CD (2012) Porous polypyrrole clusters prepared by electropolymerization for a high performance supercapacitor. *J Mater Chem* 22:3044-3052

Duclohier H (2002) How do channel- and pore-forming helical peptides interact with lipid membranes and how does this account for their antimicrobial activity? *Mini Rev Med Chem* 2(4):331-342

Duclohier H (2006) Bilayer lipid composition modulates the activity of dermaseptins, polycationic antimicrobial peptides. *Eur Biophys J* 35(5):401-409

Ehrenberg B, Montana V, Wei MD, Wuskell JP, Loew LM (1988) Membrane potential can be determined in individual cells from the Nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J* 53(5):785-794

Epand RM, Vogel HJ (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta*. 1462(1-2):11-28

Epand RM, Walker C, Epand RF, Magarvey NA (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochim Biophys Acta* 1858(5):980-987

Epps DE, Wolfe MK, Groppi V (1994) Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol (Dibac4(3)) in model systems and cells. *Chem Phys Lipids* 69(2):137-150

Escribá PV, Ozaita A, Ribas C, Miralles A, Fodor E, Farkas T, García-Sevilla JA (1997) Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions: nonlamellar-prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(21):11375-80

Faria JL, Berberan-Santos M, Prieto MJ (1990) A comment on the localization of cyanine dye binding to brush-border membranes by the fluorescence quenching of n-(9-anthroyloxy) fatty acid probes. *Biochim Biophys Acta* 1026(1):133-134

Finberg RW, Moellering RC, Tally FP, Craig WA, Pankey GA, Dellinger EP, West MA, Joshi M, Linden PK, Rolston KV, Rotschafer JC, Rybak MJ (2004) The importance of bactericidal drugs: future directions in infectious disease. *Clin Infect Dis* 39(9):1314-1320

Findlay B, Zhanel GG, Schweizer F (2010) Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold. *Antimicrob Agents Chemother* 54(10):4049-4058

Gallucci E, Meleleo D, Micelli S, Picciarelli V (2003) Magainin 2 channel formation in planar lipid membranes: the role of lipid polar groups and ergosterol. *Eur Biophys J* 32(1):22-32

Gaspar D, Veiga AS, Castanho M (2013) From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Front Microbiol* 4(294):1-16

Gerencser AA, Chinopoulos C, Birket MJ, Jastroch M, Vitelli C, Nicholls DG, Brand MD (2012) Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *J Physiol* 590(12):2845-2871

Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Del Prete MS, Scalise G (1999) Antimicrobial activity of polycationic peptides. *Peptides* 20(11):1265-1273

Goldberg IH, Friedman PA (1971) Antibiotics and nucleic acids. *Annu Rev Biochem* 40:775-810

Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, Derengowski L da S, Silva-Pereira I, Kyaw CM (2013) Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol* 4(353):1-12

Hancock RE, Lehrer R (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* 16(2):82-88

Hancock RE (2001) Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infect Dis* 1:156–163

Hancock RE, Patrzykat A (2002) Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2(1):79-83

Hanke W, Shulue WR, Sattelle DB (1993). *Planar lipid bilayers: methods and applications (Biological Techniques Series)*. Copyright © 1993 Elsevier Ltd. ISBN: 978-0-12-322995-3

Haynes DH, Staerk H (1974) 1-Anilino-8-naphthalenesulfonate: a fluorescent probe of membrane surface structure, composition and mobility. *J Membr Biol* 17(3):313-340

Haynes DH (1974) 1-Anilino-8-naphthalenesulfonate: a fluorescent indicator of ion binding electrostatic potential on the membrane surface. *J Membrane Biol* 17(3):341-366

Hollmann A, Martínez M, Noguera ME, Augusto MT, Disalvo A, Santos NC, Semorile L, Maffía PC (2016) Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide-membrane interactions of three related antimicrobial peptides. *Colloids Surf B Biointerfaces* 141:528-536

Hrynevich SV, Pekun T, Waseem T, Fedorovich SV (2015) Influence of glucose deprivation on membrane potentials of plasma membranes, mitochondria and synaptic vesicles in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res* 40(6):1188-1196

Ivashchuk-Kienbaum YA (1996) Monitoring of the membrane potential in proteoliposomes with incorporated cytochrome-c oxidase using the fluorescent dye indocyanine. *J Membrane Biol* 151(3): 247-259

Ivkov VG, Pechatnikov VA, Ivkova MN (1984) Redistribution of positively charged probes in membrane suspension under the action of transmembrane potential. *Gen Physiol Biophys* 3(1):19-30

Ivkova MN, Pechatnikov VA, Ivkov VG (1983) The behavior of the fluorescent probe diS-C3-(5) in membrane and aqueous media. *Gen Physiol Biophys* 2(6):473-486

Ivkova MN, Pechatnikov VA, Ivkov VG (1984) Mechanism of fluorescent response of the probe diS-C3-(5) to transmembrane potential changes in a lecithin vesicle suspension. *Gen Physiol Biophys* 3(2):97-117

Ivkova MN, Pechatnikov VA, Gracheva OA, Pechatnikova EV, Ivkov VG (1987) Interaction of the voltage-sensing fluorescent probe diS-C3-(5) with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *Gen Physiol Biophys* 6(1):45-55

Jackson LC, Machado LA, Hamilton ML (1998) Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica* 8(1):13-27

Jenssen H, Hamill P, Hancock RE (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 19(3):491-511

Jenssen H (2009). Therapeutic approaches using host defence peptides to tackle herpes virus infections. *Viruses* 1(3):939-964

Kay RE, Walwick ER, Gifford CK (1964) Spectral changes in a cationic dye due to interaction with macromolecules. I. Behavior of dye alone in solution and the effect of added macromolecules. *J Phys Chem* 68 (7):1896-1906

Khailova LS, Nazarov PA, Sumbatyan NV, Korshunova GA, Rokitskaya TI, Dedukhova VI, Antonenko YN, Skulachev VP (2015) Uncoupling and toxic action of alkyltriphenylphosphonium cations on mitochondria and the bacterium *Bacillus subtilis* as a function of alkyl chain length. *Biochemistry (Mosc)* 80(12):1589-1597

Klapperstück T, Glanz D, Hanitsch S, Klapperstück M, Markwardt F, Wohlrab J (2013) Calibration procedures for the quantitative determination of membrane potential in human cells using anionic dyes. *Cytometry A* 83(7):612-626

Klymchenko AS, Stoeckel H, Takeda K, Mély Y (2006) Fluorescent probe based on intramolecular proton transfer for fast ratiometric measurement of cellular transmembrane potential. *J Phys Chem B* 110(27):13624-13632

Koo SP, Bayer AS, Kagan BL, Yeaman MR (1999) Membrane permeabilization by thrombin-induced platelet microbicidal protein 1 is modulated by transmembrane voltage polarity and magnitude. *Infect Immun* 67(5):2475-2481

Koolman J, Roehm KH (2005) *Color atlas of biochemistry*. Second edition, Thieme.

Krasne S (1977) Cyanine dye-induced electrical and fluorescence effects in neutral and negative bilayer membranes. *Biophys J* 17:214a

Krasne S (1980a) Interactions of voltage-sensing dyes with membranes. I. Steady-state permeability behaviors induced by cyanine dyes. *Biophys J* 30(3):415-439

Krasne S (1980b) Interactions of voltage-sensing dyes with membranes. II. Spectrophotometric and electrical correlates of cyanine-dye adsorption to membranes. *Biophys J* 30(3):441-462

Lemeshko VV, Arias M, Orduz S (2005) Mitochondria permeabilization by a novel polycation peptide BTM-P1. *J Biol Chem* 280(16):15579-15586

Lemeshko VV (2010) Potential-dependent membrane permeabilization and mitochondrial aggregation caused by anticancer polyarginine-KLA peptides. *Arch Biochem Biophys* 93(2):213-220

Lemeshko VV (2011) Permeabilization of mitochondria and red blood cells by polycationic peptides BTM-P1 and retro-BTM-P1. *Peptides* 32(10):2010-2020

Lemeshko VV (2013) Electrical potentiation of the membrane permeabilization by new peptides with anticancer properties. *Biochim Biophys Acta* 1828(3):1047-1056

Lemeshko VV, Alvarez JA (2013) Computational model for monitoring of the membrane potential with the fluorescent probe DiSC₃(5). *FASEB J* 27:802.1

Lemeshko VV, Orduz S (2013) Electrical hypothesis of toxicity of the Cry toxins for mosquito larvae. *Biosci Rep* 33(1):125-136

Lemeshko VV (2014) Competitive interactions of amphipathic polycationic peptides and cationic fluorescent probes with lipid membrane: experimental approaches and computational model. *Arch Biochem Biophys* 545:167-178

Loew LM (2015) Design and use of organic voltage sensitive dyes. *Adv Exp Med Biol* 859:27-53

MacKinnon R, Miller C (1989) Functional modification of a Ca²⁺-activated K⁺ channel by trimethyloxonium. *Biochemistry* 28(20):8087-8092

MacKinnon R, Latorre R, Miller C (1989) Role of surface electrostatics in the operation of a high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Biochemistry* 28(20):8092-8099

Mader JS, Hoskin DW (2006) Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs* 15(8):933-946

- Malvern (2007) Zetasizer nano user manual. Malvern Instruments Ltd, Malvern
- McLaughlin SG, Szabo G, Eisenman G, Ciani SM (1970) Surface charge and the conductance of phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 67(3):1268-1275
- McLaughlin SG, Szabo G, Eisenman G (1971) Divalent ions and the surface potential of charged phospholipid membranes. *J Gen Physiol* 58(6):667-687
- McLaughlin S, Harary H (1974) Phospholipid flip-flop and the distribution of surface charges in excitable membranes. *Biophys J* 14(3):200-208
- McLaughlin S, Wang J, Gambhir A, Murray D (2002) PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31:151-175
- Menestrina G, Ropele M (1989) Voltage-dependent gating properties of the channel formed by E. coli hemolysin in planar lipid membranes. *Biosci Rep* 9(4):465-473
- Mishra A, Behera RK, Behera PK, Mishra BK, Behera GB (2000) Cyanines during the 1990s: A Review. *Chem Rev* 100(6):1973-2012
- Morizane S, Gallo RL (2012) Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis. *J Dermatol* 39(3):225-230
- Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC (1962) Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* 194:979-980
- Mueller P, Rudin DO (1963) Induced excitability in reconstituted cell membrane structure. *J Theor Biol* 4(3):268-280

Orduz S, Lemeshko VV (2016) Péptido policationico como agente ionofórico, antimicrobiano antitumoral e insecticida. Superintendencia de Industria y Comercio, Resolución 22123

Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H, Tzur A (2012) JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis* 3:e430.

Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA (2011) Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 50(2):98-115

Peschel A, Sahl HG (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 4(7):529-536

Plášek J, Hrouda V (1991). Assessment of membrane potential changes using the carbocyanine dye, diS-C3-(5): synchronous excitation spectroscopy studies. *Eur Biophys J* 19(4):183-188

Plášek J, Gášková D, Lichtenberg-Fraté H, Ludwig J, Höfer M (2012) Monitoring of real changes of plasma membrane potential by diS-C3(3) fluorescence in yeast cell suspensions. *J Bioenerg Biomembr* 44(5):559-569

Plášek J, Gášková D (2014) Complementary methods of processing diS-C3(3) fluorescence spectra used for monitoring the plasma membrane potential of yeast: their pros and cons. *J Fluoresc* 24(2):541-547

Portele A, Lenz J, Höfer M (1997) Estimation of membrane potential $\Delta\psi$ in reconstituted plasma membrane vesicles using a numerical model of oxonol VI distribution. *J Bioenerg Biomembr* 29(6):603-609

Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents* 24(6):536-547

Rokitskaya TI, Sumbatyan NV, Tashlitsky VN, Korshunova GA, Antonenko YN, Skulachev VP (2010) Mitochondria-targeted penetrating cations as carriers of hydrophobic anions through lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1798(9):1698-1706

Sahalan AZ, Aziz ABA, Lian HH, Ghani MKA (2013) Divalent Cations (Mg^{2+} , Ca^{2+}) protect bacterial outer membrane damage by polymyxin B. *Sains Malays* 42(3):301-306

Salama G, Johnson RG, Scarpa A (1980) Spectrophotometric measurements of transmembrane potential and pH gradients in chromaffin granules. *J Gen Physiol* 75(2):109-140

Scaduto RC, Grotyohann LW (1999) Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J* 76(1):469-477

Schweizer F (2009) Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *Eur J Pharmacol* 625(1-3):190-194

Segura C, Guzmán F, Salazar LM, Patarroyo ME, Orduz S, Lemeshko V (2007) BTM-P1 polycationic peptide biological activity and 3D-dimensional structure. *Biochem Biophys Res Commun* 353(4):908-914

Shai Y (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 15 1462(1-2):55-70

Sims PJ, Waggoner AS, Wang CH, Hoffman JF (1974) Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* 13(16):3315-3330

Skulachev VP (1988) Membrane bioenergetics. Berlin: Springer-Verlag.

Solaini G, Sgarbi G, Lenaz G, Baracca A (2007) Evaluating mitochondrial membrane potential in cells. *Biosci Rep* 27(1):11-21

Sorensen OE, Borregaard N, Cole AM (2008) Antimicrobial peptides in innate immune responses. *Contrib Microbiol* 15:61-77

Sorochkina AI, Kovalchuk SI, Omarova EO, Sobko AA, Kotova EA, Antonenko YN (2013) Peptide-induced membrane leakage by lysine derivatives of gramicidin A in liposomes, planar bilayers, and erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1828(11):2428-2435

Stoilova TB, Dutseva EA, Pashkovskaia AA, Sychev SV, Koval'chuk SI, Sobko AA, Egorova NS, Kotova EA, Antonenko IuN, Surovoi AYu, Ivanov VT (2007) Ion channels of various types induced in lipid membranes by gramicidin a derivatives carrying a cationic sequence at their C-termini. *Bioorg Khim* 33(5):511-519

Sugiarto H, Yu PL (2007) Effects of cations on antimicrobial activity of ostricacins-1 and 2 on *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* 1056MRSA. *Curr Microbiol* 55(1):36-41

Tenson T, Mankin A (2006) Antibiotics and the ribosome. *Mol Microbiol* 59(6):1664-1677

Tipping E, Ketterer B, Christodoulides L (1979) Interactions of small molecules with phospholipid bilayers. Binding to egg phosphatidylcholine of some uncharged molecules (2-acetylaminofluorene, 4-dimethylaminoazobenzene, oestrone and testosterone) that bind to ligandin and aminoazo-dye-binding protein A. *Biochem J* 180(2):319-326

Tomov TC (1986) Pyronin G as a fluorescent probe for quantitative determination of the membrane potential of mitochondria. *J Biochem Biophys Methods* 13(1):29-38

Toner M, Vaio G, McLaughlin A, McLaughlin S (1988) Adsorption of cations to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* 27(19):7435-7443

Toyomizu M, Okamoto K, Akiba Y, Nakatsu T, Konishi T (2002) Anacardic acid-mediated changes in membrane potential and pH gradient across liposomal membranes. *Biochim Biophys Acta* 1558(1):54-62

Träuble H, Eibl H (1974) Electrostatic effects on lipid phase transitions: membrane structure and ionic environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 71(1):214-219

Trip H, Mulder NL, Lolkema JS (2012) Improved acid stress survival of *Lactococcus lactis* expressing the histidine decarboxylation pathway of *Streptococcus thermophilus* CHCC1524. *J Biol Chem* 287(14):11195-11204

Van Swaay D, de Mello A (2013) Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab Chip* 13(5):752-767

Večeř J, Heřman P, Holoubek A (1997) Diffusion membrane potential in liposomes: setting by ion gradients, absolute calibration and monitoring of fast changes by spectral shifts of diS-C3(3) fluorescence maximum. *Biochim Biophys Acta* 1325(2):155-164

Vekshin NL (2013) On measurement of mitochondrial transmembrane potential with fluorescent probes. *Biophysics* 58(6):845-850

Waggoner AS, Wang CH, Tolles RL (1977) Mechanism of potential-dependent light absorption changes of lipid bilayer membranes in the presence of cyanine and oxonol dyes. *J Membrane Biol* 33:109-140

Wang Y, Chi EY, Schanze KS, Whitten DG (2012) Membrane activity of antimicrobial phenylene ethynylene based polymers and oligomers. *Soft Matter* 8:8547-8558

Wax RG, Lewis K, Salyers AA, Harry Taber H (2002) Bacterial resistance to antimicrobials. CRC Press; Second edition.

Welch BD, VanDemark AP, Heroux A, Hill CP, Kay MS (2007) Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(43):16828-16833

West W, Pearce S (1965) The Dimeric State of Cyanine Dyes. *J Phys Chem* 69(6):1894-1903

White SH (1972) Analysis of the torus surrounding planar lipid bilayer membranes. *Biophys J* 12(4):432-445

Wilmes M, Stockem M, Bierbaum G, Schlag M, Götz F, Tran DQ, Schaal JB, Ouellette AJ, Selsted ME, Sahl HG (2014) Killing of staphylococci by θ -defensins involves membrane impairment and activation of autolytic enzymes. *Antibiotics (Basel)* 3(4):617-631

Woodford N and Ellington MJ (2007) The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect* 13(1):5-18

Wu M, Maier E, Benz R, Hancock RE (1999) Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38(22):7235-7242

Xu C, Loew LM (2003) The effect of asymmetric surface potentials on the intramembrane electric field measured with voltage-sensitive dyes. *Biophys J* 84(4):2768-2780

Ytzhak S, Wuskell JP, Loew LM, Ehrenberg B (2010) Lipid composition affects the rate of photosensitized dissipation of cross-membrane diffusion potential on liposomes. *J Phys Chem B* 114(31):10097-10104

Zakharian E (2013) Recording of ion channel activity in planar lipid bilayer experiments. *Methods Mol Biol.* 2013;998:109-118

Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415(6870):389-395

Zeng Y, Han X, Gross RW (1999) Phospholipid-subclass-specific partitioning of lipophilic ions in membrane-water systems. *Biochem J* 338 (Pt 3):651-658