Capítulo 4

Estudio de la susceptibilidad a la peroxidación de liposomas de lípidos de retina. Efecto de sonicación, medio e iniciador de reacción.

4.1. Introducción

Diversos aspectos de la morfología, fisiología y bioquímica de la retina han sido ampliamente estudiados, aunque en el área de bioquímica y metabolismo de los lípidos aún quedan interrogantes por responder. Los lípidos son constituyentes cuantitativamente muy importantes de la retina y su metabolismo es fundamental en la fisiología de la misma, especialmente en las células fotorreceptoras.

Organización celular de retina de vertebrados. La retina de vertebrados es un tejido delgado (0.1 a 0.3 mm de espesor) ubicado en la parte posterior interna del ojo (**Figura 4.1**). Es una extensión periférica del sistema nervioso central. Su organización celular consta de 6 tipos celulares neuronales: células fotorreceptoras (bastones y conos), células bipolares, células horizontales, células amacrinas, células interplexiformes y células ganglionares (**Figura 4.2**). Las células neuronales se encuentran rodeadas por células gliales conocidas como células de Muller. Funcionalmente, la retina está dividida en dos capas: la externa (sensorial), que contiene las células fotorreceptoras, y la interna (neural), que contiene el resto de células retinianas. Histológicamente, la retina se divide en 10 capas que incluyen los núcleos de las diferentes células y las conexiones sinápticas entre ellas (Fliesler y Anderson, 1983).

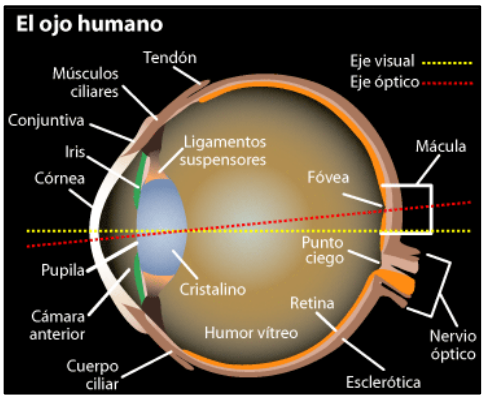

Figura 4.1. Esquema de corte del ojo (Tomada de www.gusgsm.com)

Irrigación sanguínea retiniana. La irrigación está determinada por dos sistemas circulatorios independientes: 1) el sistema coroidal (ubicado entre la esclerótica y células pigmentarias) conformado por una red de capilares fenestrados que nutren las capas retinianas más externas. El epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la membrana de Bruch forman la barrera hemato-retiniana externa. La barrera hemato-retiniana interna está constituida

principalmente por las células endoteliales. La presencia de uniones estrechas entre las células del EPR y del endotelio vascular es esencial para el control estricto del transporte de líquidos y solutos a través de la barrera hemato-retiniana, así como para prevenir la entrada de moléculas tóxicas y componentes del plasma en la retina (Strauss, 2005). El segundo sistema circulatorio proviene de la arteria retiniana y provee de nutrientes a todos los componentes de la retina neural. Los capilares que nutren la retina interna no son fenestrados y el intercambio pasivo de material se restringe a moléculas pequeñas, iones y gases (Fliesler y Anderson, 1983).

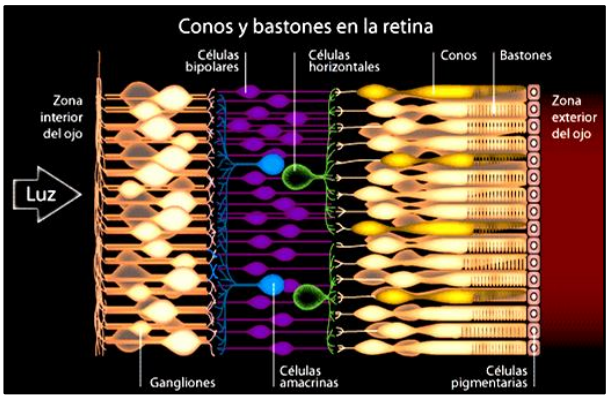

Figura 4.2. Esquema de corte de retina (Tomada de www.gusgsm.com)

Composición lipídica de retina. La retina posee la concentración de lípidos y fosfolípidos más alta que la de cualquier otro tejido ocular. Los lípidos constituyen el 20% de su peso seco, de los cuales, las 2/3 partes son fosfolípidos. En general, la relación entre lípidos no polares y fosfolípidos en este tejido se encuentra en el rango entre 0,3 y 0,5. Fosfatidilcolina (40-50 %) y fosfatidiletanolamina (30-35 %) constituyen los principales fosfolípidos, encontrándose en menor proporción fosfatidilserina (5-10 %), fosfatidilinositol (3-6 %) y esfingomielina (2-8 %). Ácido fosfatídico y cardiolipina se encuentran en muy baja proporción (Fliesler y Anderson, 1983). El 50% de los ácidos grasos de la retina son no saturados. Un 25% de sus ácidos grasos lo constituye el ácido docosahexenoico (DHA, 22:6 n-3), un ácido graso de 22 carbonos y 6 dobles enlaces.

Importancia de los lípidos en la función retiniana normal. Estudios comparativos de una amplia variedad de membranas biológicas con respecto a su composición molecular y actividad biológica sugirieron que elevado contenido de fosfolípidos y PUFAs y bajo contenido en colesterol son características de membranas “metabólicamente activas”, tales como

membrana mitocondrial y de cloroplastos, en contraste con las “metabólicamente inactivas”, como mielina de los nervios (Fleischer y Rouser, 1965; O´Brien, 1967). Basándonos en este sistema de clasificación y la composición lipídica previamente descripta, es razonable pensar en la retina como un tejido rico en membranas “metabólicamente activas”. Esta composición lipídica particular determina una gran fluidez de las membranas imprescindible para llevar a cabo las funciones normales de la retina. La función principal de la retina es absorber fotones de luz e iniciar la excitación visual. La absorción de fotones ocurre en los segmentos externos de las células fotorreceptoras iniciándose una reacción de isomerización *cis-trans* de 11-*cis*-retinaldehído que se encuentra covalentemente unido a la porción proteica del pigmento visual (rodopsina). La composición lipídica de la membrana afecta también la movilidad lateral y rotacional de rodopsina (cambios conformacionales producidos por efecto de la luz), al igual que su orientación dentro de la membrana, regeneración, propiedades espectroscópicas y estabilidad térmica (Fliesler y Anderson, 1983).

Papel de la peroxidación lipídica en las patologías retinianas. Existe abundante evidencia que señala que la peroxidación lipídica daña las membranas fotorreceptoras retinianas. Claramente, las membranas presentes en la retina son sustratos ideales para las reacciones de peroxidación. Los fosfolípidos que forman parte de estas membranas contienen la concentración de PUFAs más elevada comparada con cualquier otro sistema de membranas estudiado. Su principal PUFA, el DHA, es especialmente susceptible a la peroxidación lipídica. Además, la retina posee el mayor consumo de oxígeno por peso que cualquier otro tejido y mantiene una tensión de oxígeno elevada, lo que puede resultar tóxico para este tejido (Stone y col, 1979; Winkler y col, 1999).

Existen datos que indican que la peroxidación lipídica produce alteraciones morfológicas de la retina. Los daños observados son típicamente: núcleos picnóticos, disrupción de la morfología de membranas con formación de vesículas, degeneración macular, aumento de gránulos de lipofucsina en epitelio pigmentado, entre otros (Fliesler y Anderson, 1983). Se ha comprobado que los niveles de peróxidos lipídicos en la retina están elevados en condiciones patológicas que involucran a radicales libres, mientras que el contenido de DHA decae significativamente. Además, biomoléculas tales como proteínas o aminolípidos, pueden ser modificados covalentemente por productos de descomposición lipídica (Catalá, 2009). Estas alteraciones morfológicas pueden encontrarse en patologías retinianas tales como: glaucoma, cataratas, retinopatía diabética, inflamación ocular, degeneración retiniana, etc (Nau-Staudt y col, 2001; Ueda y col, 1996).

El elevado contenido de fosfolípidos de la retina hace posible la preparación de liposomas a partir de sus lípidos. Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, es decir, contienen una región polar (o cabeza del fosfolípido) constituida por el fosfato cargado y las sustituciones del mismo, y una cola no polar constituida por cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas. Los ácidos grasos esterifican al glicerol en las posiciones sn-1 y sn-2 y el grupo fosfato en la posición sn-3. Por lo general, el C-1 del glicerol se encuentra esterificado por un ácido graso saturado y el C-2 por un ácido graso no saturado (Berg y col, 2002). Los fosfolípidos en medios acuosos tienden a minimizar el contacto con el agua de las cadenas hidrocarbonadas, de naturaleza lipofílica formando estructuras que exponen las regiones polares al medio acuoso manteniendo aisladas las regiones no polares. De esta manera es posible obtener membranas liposomales. Esta habilidad espontánea del sistema para evolucionar desde un estado desordenado a estructuras definidas y ordenadas, responde a la necesidad de disminuir la función G (energía libre de Gibbs; Larsson, 1994).

Estudios de peroxidación sobre membranas modelo, tales como liposomas de lípidos de retina, son útiles para avanzar en el conocimiento sobre aspectos que no pueden ser estudiados directamente en membranas biológicas. Para estudiar el proceso de peroxidación lipídica en la retina, evitando la complejidad de este sistema biológico, se analizó el proceso sobre liposomas preparados con lípidos aislados de retina bovina.

En el presente capítulo el objetivo fue:

- ✓ Determinar el efecto del medio de reacción y del iniciador sobre la peroxidación lipídica de diferentes tipos de liposomas preparados con lípidos de retina bovina

La peroxidación de liposomas sonicados (LS) y sin sonicar (LNS) fue iniciada con Fe^{2+} y Fe^{3+}. Los medios de reacción empleados fueron agua, solución fisiológica (NaCl 0,15 M) y buffer Tris (20 mM, pH 7,4). Para seguimiento de la reacción se determinó el aumento de absorbancia a 234 nm (dienos conjugados) y la producción de sustancias reactivas al TBA (ver **Anexo**).

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Materiales

El proceso de peroxidación se estudió en diferentes tipos de liposomas preparados a partir de lípidos de retinas bovinas. Para ello, se obtuvieron ojos bovinos donados por Frigorífico Gorina (La Plata, Buenos Aires). Para la extracción de lípidos se utilizaron solventes de calidad cromatográfica: cloroformo (U.V.E.), metanol (Mallinckrodt). Los iniciadores de reacción fueron reactivos de alta pureza: $FeSO_4$ (Fluka) y $FeCl_3$ (Anhedra). Los demás reactivos utilizados fueron también de alta calidad: NaCl (Cicarelli), TBA (Fluka), Trizma base (Sigma), BHT (Sigma).

Para la obtención de retinas y, posteriormente, de lípidos se empleó un homogeneizador Ultraturrax X25. Para producir liposomas sonicados se empleó un sonicador Sonics vibra cell, Modelo VCX 750 (750 W, 20kHz). En la determinación de dienos conjugados y TBARS se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800.

4.2.2. Métodos y técnicas

4.2.2.1. Obtención de homogeneizados de retina bovina

Los ojos fueron enucleados en el frigorífico (Frigorífico Gorina) y transportados al laboratorio donde se obtuvieron las retinas. Con todos los tubos y soluciones en baño de hielo, se removieron las córneas, lentes y humor vítreo bajo luz roja. La copa del ojo fue invertida y con chorros de solución fisiológica se desprendió la retina dejándola caer cuidadosamente en un vaso de precipitados. Aproximadamente cuarenta retinas se homogeneizaron en solución de NaCl 0,15 M (1 ml/retina) durante 120 seg (en ciclos alternados de 20 seg) en baño de hielo con un homogeneizador Ultraturrax X25 a 7000 rpm (Guajardo y col, 2002).

4.2.2.2. Extracción de lípidos

Los lípidos totales de los homogeneizados de retina se extrajeron con cloroformo: metanol (2:1, v/v) (Folch y col, 1957), en una relación de una parte de muestra a 5 partes de mezcla extractiva. A la mezcla se agregó un 20 % de su volumen de agua destilada, se agitó y se dejó decantar a baja temperatura para permitir la separación de dos fases: una superior metanólica acuosa y una inferior clorofórmica. La fase superior fue desechada y la inferior almacenada a -22 °C

4.2.2.3. Preparación de liposomas

La fase clorofórmica conteniendo lípidos totales de retina se evaporó en baño de agua a 50 °C bajo corriente de nitrógeno hasta sequedad y se sometió a vacío para eliminar trazas de cloroformo. El film formado por los lípidos secos fue resuspendido en solución fisiológica (NaCl 0,15 M) y agitado con ayuda de un vórtex para obtener LNS (C_f= 2 mg lípido/ml). LS se prepararon en baño de hielo empleando un sonicador de punta. La sonicación se realizó al 75% de la frecuencia máxima, hasta que la suspensión alcanzó la mínima densidad óptica (Gal y col, 2003).

4.2.2.4. Determinación de tamaño de liposomas por dispersión dinámica de luz (Dinamic Light Scattering, DLS)

Para determinar el tamaño de los liposomas se midió la función de correlación G(q,t) de la intensidad de luz dispersa a 90° con un fotogoniómetro (ALV/CGS-5022F) acoplado a un correlador digital de tiempo múltiple (o múltiple τ) (ALV-5000/EPP), que cubre un rango de tiempo de 10^{-6}-10^{-3} segundos. La fuente de luz empleada fue un láser de helio-neón con una longitud de onda de 633 nm operando a 22 mW. Cada función de correlación fue analizada con el ajuste por cumulantes que brinda un coeficiente de difusión medio aparente (D) y la dispersión (δD) de este valor (Koppel, 1972).

G(q,t) corresponde al módulo de "vector de dispersión", esto es, el módulo de la diferencia entre el momento lineal de la luz dispersada (vector k') y el momento lineal de la luz incidente (vector k). El vector k' forma un ángulo Θ (ángulo de dispersión) con respecto al vector k. τ corresponde al tiempo de retardo. CONTIN es un software desarrollado por Provencher para resolver el llamado "problema inverso de dispersión". Normalmente, cada partícula (en este caso liposoma) dispersa la luz según su tamaño, su índice de refracción con respecto al solvente, etc. El problema inverso consiste en extraer información del coeficiente de difusión traslacional a partir de medidas experimentales de luz dispersada. El radio hidrodinámico se obtiene a partir del coeficiente de difusión por la fórmula de Stokes-Einstein. Los radios hidrodinámicos promedio se analizaron mediante la transformada inversa de Laplace (con software CONTIN).

Las mediciones se realizaron a 25 °C empleando 80 µl de LS y LNS (2 mg/ml lípidos) en agua, solución fisiológica y buffer Tris-HCl 20 mM (V_f= 2 ml). La C_f de lípidos es ≈0,1 mM, considerando un PM promedio de fosfolípidos ≈ 800 g/mol.

4.2.2.5. Determinación espectrofotométrica de dienos y trienos conjugados

Liposomas de lípidos de retina sonicados y no sonicados ($C_f \approx$ 0,1 mM de lípidos) fueron incubados durante 180 min a temperatura ambiente en cubetas de cuarzo de 1 cm x 1 cm. La reacción de peroxidación fue iniciada por Fe^{2+} o Fe^{3+} (C_f= 25 μM) llevando a volumen final (2 ml) con agua, solución fisiológica (NaCl 0,15 M) o buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4.

Para analizar la producción de dienos y trienos conjugados durante la peroxidación de liposomas, se registraron los espectros de absorción cada un minuto, entre 200 y 300 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UV 1800. El aumento de absorción a 234 nm (debido a formación de dienos conjugados) y a 270 nm (trienos conjugados) se graficó en función del tiempo durante 180 min. La velocidad inicial de reacción se determinó como la pendiente de la recta con la que se ajustó el rango lineal de la curva ΔAbs en función del tiempo. El tiempo de retardo (fase *lag*) se define como el tiempo transcurrido hasta el inicio de la fase lineal de la curva ΔAbs en función del tiempo (Sargis y Subbaiah, 2003).

4.2.2.6. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Alícuotas de 150 μl de mezcla de reacción (preparadas de la misma manera que en el ítem 4.2.2.5) fueron tomadas a distintos tiempos (0, 15, 30, 60, 120 y 180 min) mezclándose con 10 μl de BHT (0,1% p/v en etanol) para evitar peroxidación adicional durante la incubación. Se agregaron 850 μl de TBA (0,37 % p/v en HCl 0,25 N) y las muestras se incubaron durante 30 minutos a 75 °C. Finalizado este lapso, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se agregó 1 ml de agua y se determinó la absorbancia a 532 nm. Velocidad inicial de reacción y tiempo de retardo en el inicio de la reacción fueron calculados de la misma manera que para dienos y trienos conjugados.

4.3. Resultados

Determinación de tamaño de liposomas por dispersión dinámica de luz (Dinamic Light Scattering, DLS)

Los radios hidrodinámicos promedio de los liposomas determinados por análisis DLS se presentan en la **tabla 4.1**. Los datos obtenidos por dispersión dinámica de luz se traducen a valores de radios hidrodinámicos mediante el método de cumulantes. Para distribuciones de tamaño que no son muy anchas (PI < 0.30) el método de cumulantes provee valores medios apropiados del radio hidrodinámico. Sólo las muestras sonicadas fueron analizadas con este método. Se seleccionaron hasta tres muestras representativas y se promediaron (resultados expresados en la **tabla 4.1** como valores puntuales). LNS mostraron una distribución multimodal de tamaño cuando se analizaron mediante transformada inversa de Laplace (CONTIN), un resultado que es compatible con el alto valor del índice de polidispersidad del ajuste por cumulantes (PI > 0.4). Por esta razón los valores se expresaron como un rango y no como un valor puntual.

Los radios hidrodinámicos para LNS en diferentes medios acuosos, cubrieron un rango amplio presentando una distribución de tamaños con máximos centrados entre 190 y 320 nm. Por otra parte, los resultados para LS dan, a partir del método de cumulantes, radios hidrodinámicos del orden de 76,4 a 83,3 nm, mostrando, como era de esperar, una influencia significativa del sonicado sobre el tamaño de los mismos. Es claro que los LNS poseen radios hidrodinámicos mayores que los sonicados.

Tabla 4.1. Radios hidrodinámicos de liposomas sonicados y no sonicados en los diferentes medios acuosos obtenidos por dispersión dinámica de luz.

Liposomas	Medio acuoso	Radio hidrodinámico [nm]	Índice de polidispersidad (PI)
Sonicados	Agua	76,4	0,31
	NaCl	83,3	0,27
	Tris-HCl	83,3	0,27
No sonicados	Agua	190 – 225	0,44
	NaCl	260 - 320	0,45
	Tris-HCl	200 - 240	0,43

Los valores de radio hidronámico informados para liposomas sonicados son un promedio de tres determinaciones.

Peroxidación de liposomas sonicados y no sonicados de lípidos de retina en diferentes medios acuosos empleando Fe^{2+} como iniciador de reacción.

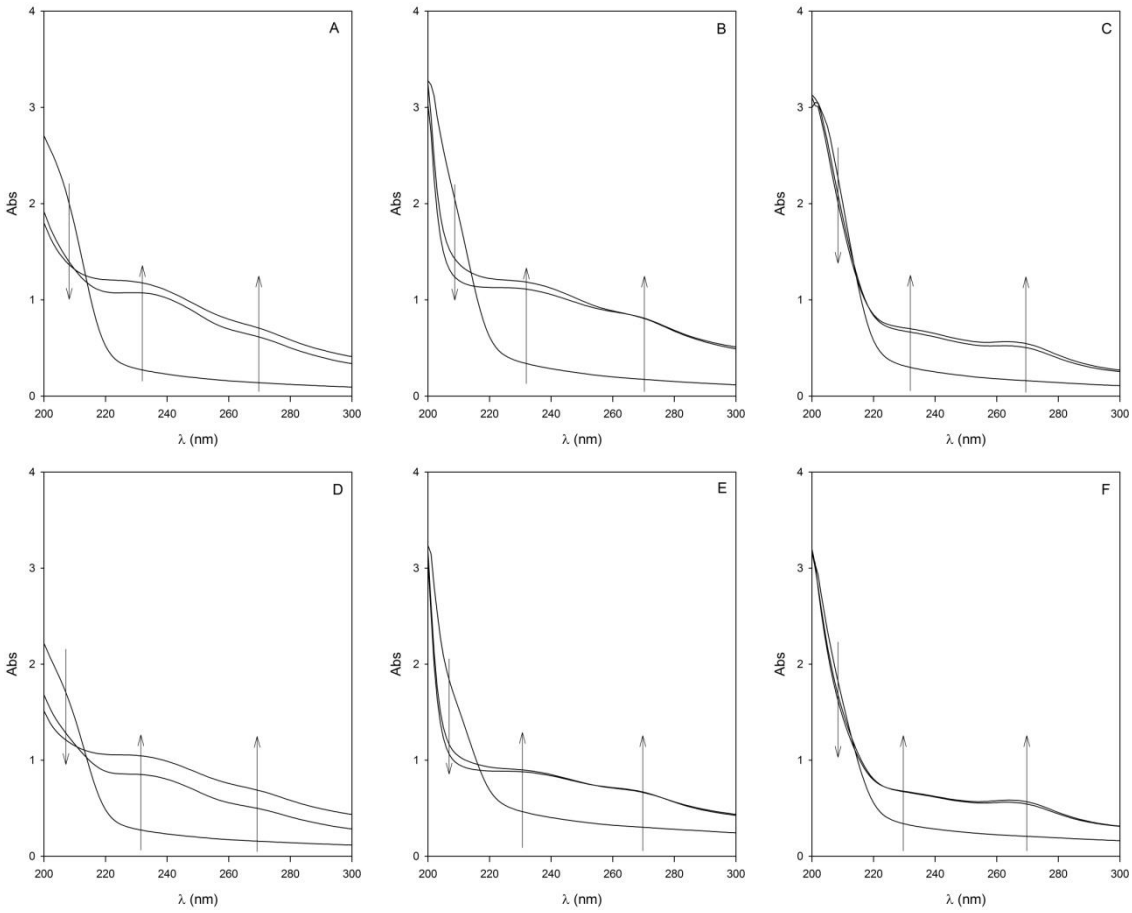

Figura 4.3. Evolución temporal (0, 90 y 180 min) de los espectros de absorción de liposomas peroxidados con Fe^{2+} como iniciador de la reacción. Liposomas sonicados en A) agua, B) solución fisiológica, C) buffer Tris. Liposomas no sonicados en D) agua, E) solución fisiológica, F) buffer Tris

La **figura 4.3** muestra los cambios en los espectros de absorbancia de liposomas peroxidados con Fe^{2+} en los diferentes medios acuosos. LS y LNS presentaron tanto en agua como en solución fisiológica una disminución de la absorbancia entre 200 y 215 nm notoria. La disminución de absorbancia en este rango corresponde a la pérdida del enlace metilénico entre los dobles enlaces (lípidos no peroxidados) debido a la formación de dienos conjugados. Esta disminución fue mucho menor cuando la reacción se lleva a cabo en buffer Tris-HCl. Entre 230 - 240 nm y 260 - 280 nm se observaron aumentos de absorbancia en forma de “hombros” que son mayores en agua y solución fisiológica que en buffer.

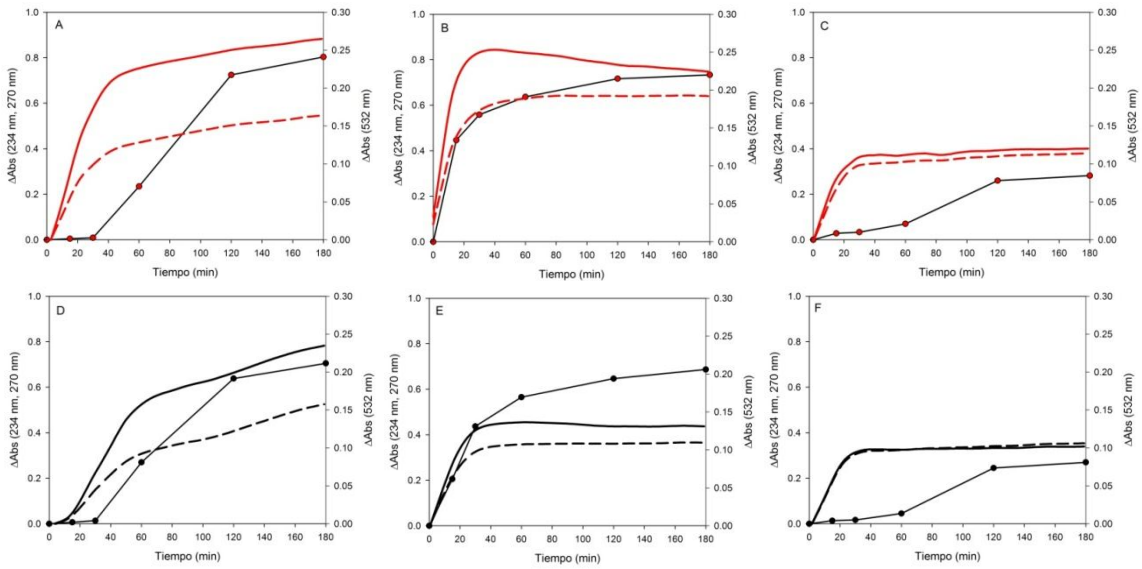

Figura 4.4. Producción de TBARS (puntos), **dienos conjugados** (línea continua) **y trienos conjugados** (línea discontinua) **en función del tiempo de reacción con Fe^{2+} como iniciador**. Liposomas sonicados en A) agua, B) solución fisiológica, C) buffer Tris. Liposomas no sonicados en D) agua, E) solución fisiológica, F) buffer Tris

La **figura 4.4** representa la variación de absorbancia en función del tiempo de reacción a 234 nm (debida a formación de dienos conjugados) y a 270 nm (generada por trienos conjugados) durante la peroxidación iniciada por Fe^{2+}. En los mismos gráficos se incluye la formación de TBARS.

En la peroxidación de LS en agua (**figura 4.4 A**) se observó un tiempo de retardo de 30 minutos en la formación de TBARS y un valor máximo de absorbancia a 532 nm de 0,24 DO. La formación de dienos conjugados mostró un tiempo de retardo de 7 minutos, una fase inicial rápida (V_0= 2,07 DO/h) hasta los 40 min de reacción, a partir de los cuales la velocidad disminuyó, se mantuvo constante y positiva hasta el fin del tiempo de reacción (ver datos cinéticos en **Tabla 4.2**). La formación de trienos conjugados mostró la misma tendencia que dienos conjugados aunque su producción fue menor.

LS peroxidados en solución fisiológica (**Figura 4.4.B**) generaron una producción inmediata de TBARS (tiempo de retardo= 0 min) y alcanzaron un valor máximo de absorbancia de 0,23 DO, valor similar al obtenido cuando la reacción se llevó a cabo en agua. La velocidad inicial de reacción (V_0=4,8 DO/h) según la formación de dienos conjugados, duplicó a la obtenida en agua. A partir de los 30 min de reacción la absorbancia a 234 nm disminuyó en forma constante. La absorbancia a 270 nm también aumentó con una velocidad inicial superior

a la observada en agua y se hace máxima alrededor de los 30 min. A partir de allí se mantuvo constante.

La presencia de buffer Tris-HCl (**Figura 4.4.C**) como medio de reacción determinó el mayor tiempo de retardo en la aparición de TBARS (60 min) y el menor valor máximo de Abs_{532} alcanzado (0,09 DO). La velocidad de formación de dienos conjugados fue la mínima (V_0= 1,20 DO/h) comparada con las obtenidas en agua y solución fisiológica. La absorbancia a 234 nm alcanzó su valor máximo a los 30 minutos y a partir de allí se mantuvo constante. Los valores de absorbancia a 234 nm fueron similares a los obtenidos a 270 nm.

La peroxidación de LNS en agua (**Figura 4.4.D**) mostró un tiempo de retardo para la producción de TBARS de 30 minutos y un valor de $Abs_{máx}$ a 532 nm de 0,21 DO. La formación de dienos conjugados mostró un tiempo de retardo de 16 min y una velocidad inicial de 0,7 DO/h que se mantuvo hasta los 60 min. A partir de entonces la velocidad disminuyó y se mantuvo constante y positiva. Trienos conjugados mostraron la misma tendencia que dienos pero su producción fue inferior.

Los LNS en solución fisiológica (**Figura 4.4.E**) produjeron TBARS sin tiempo de retardo y alcanzaron un valor final de Abs_{532} similar al obtenido en agua (0,21 DO). La formación de dienos conjugados presentó menor tiempo de retardo (2 min) que en agua. La velocidad inicial de formación de dienos conjugados (1,35 DO/h) fue superior a la observada en agua. Esta velocidad se mantuvo hasta los 30 min y a partir de allí la absorbancia no varió en el tiempo. El valor final de Abs_{234} (0,44 DO) fue inferior al observado en agua.

LNS en buffer Tris-HCl (**Figura 4.4.F**) mostraron el mayor retardo en la producción de TBARS y el menor valor final de Abs_{532} (0,08 DO) comparando estos resultados con los obtenidos en agua y solución fisiológica. Si bien el inicio de la producción de dienos conjugados fue inmediato y la velocidad de formación fue superior a la del agua, el valor de Abs_{234} fue el menor de los tres medios de reacción.

Teniendo en cuenta el efecto de la sonicación deducimos que los liposomas sonicados fueron más susceptibles a la peroxidación iniciada por Fe^{2+} que los liposomas no sonicados. Esto se observó sobre todo en solución fisiológica y en agua, mientras que en buffer Tris-HCl no se observaron diferencias significativas en cuanto a la susceptibilidad de los diferentes liposomas. Solución fisiológica resultó ser el medio en que la peroxidación lipídica fue más eficiente. En este orden le siguió el agua y en último lugar buffer Tris-HCl.

Peroxidación de liposomas sonicados y no sonicados de lípidos de retina en diferentes medios acuosos empleando Fe^{3+} como iniciador de reacción.

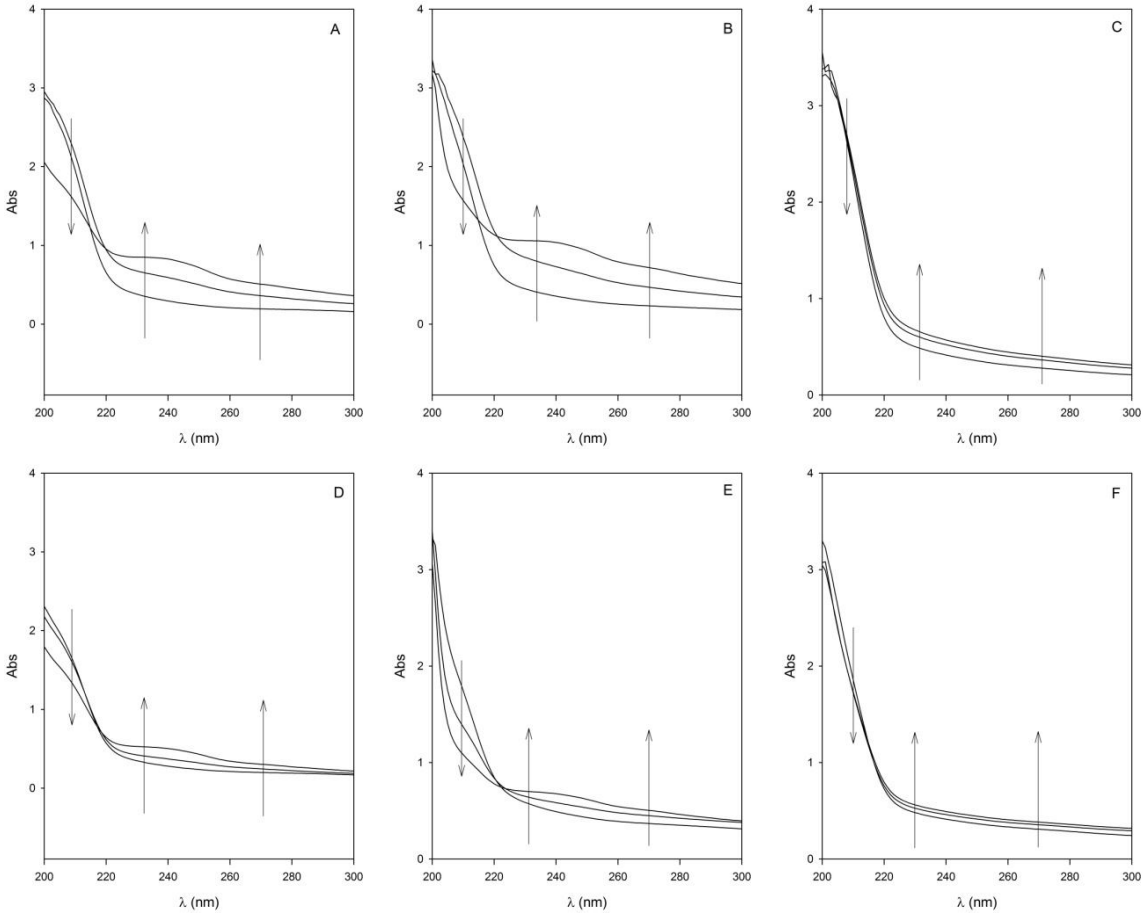

Figura 4.5. Evolución temporal (0, 90 y 180 min) de los espectros de absorción de liposomas peroxidados con Fe^{3+} como iniciador de la reacción. Liposomas sonicados en A) agua, B) solución fisiológica, C) buffer Tris. Liposomas no sonicados en D) agua, E) solución fisiológica, F) buffer Tris

La **figura 4.5** muestra los cambios producidos en los espectros de absorbancia de liposomas peroxidados con Fe^{3+} en los diferentes medios acuosos. Al igual que con Fe^{2+}, LS y LNS presentaron tanto en agua como en solución fisiológica una disminución notoria de la absorbancia entre 200 y 215 nm. Esta disminución no resultó tan evidente en buffer Tris-HCl. Entre 230 - 240 nm y 260 - 280 nm se observaron aumentos de absorbancia en forma de "hombros" que fueron mayores en agua y solución fisiológica que en buffer.

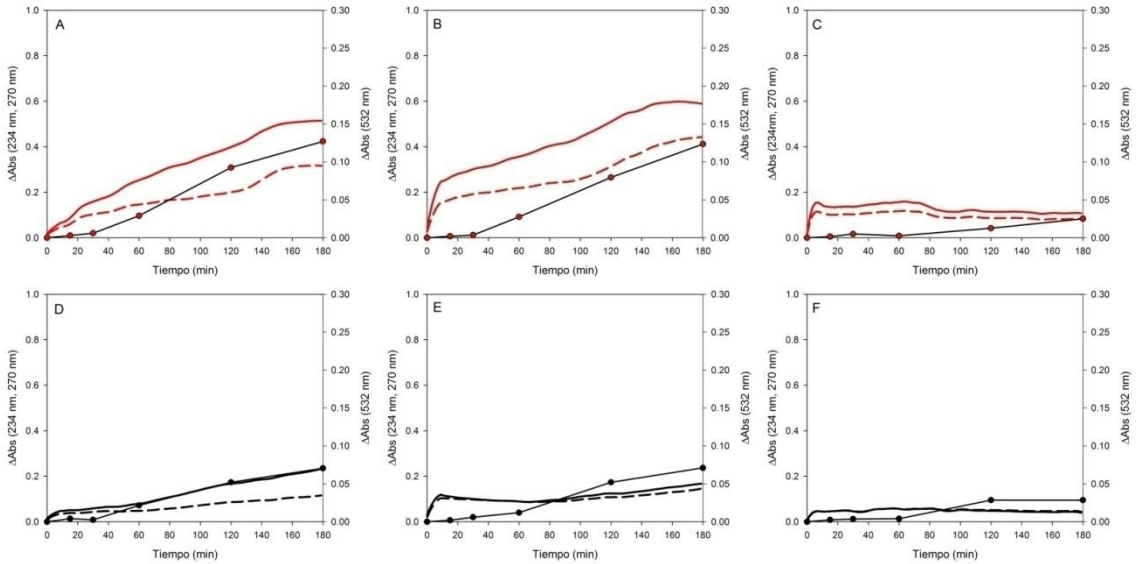

Figura 4.6. **Producción de TBARS** (puntos), **dienos conjugados** (línea continua**) y trienos conjugados** (línea discontinua) **en función del tiempo de reacción con Fe^{3+} como iniciador**. Liposomas sonicados en A) agua, B) solución fisiológica, C) buffer Tris. Liposomas no sonicados en D) agua, E) solución fisiológica, F) buffer Tris

En la **figura 4.6** se observan la producción de TBARS junto a la de dienos y trienos conjugados en función del tiempo, empleando Fe^{3+} como iniciador de reacción. Comparando las **figuras 4.6 A-C** (liposomas sonicados) se observa que el mayor tiempo de retardo para la producción de TBARS se dio en buffer, siendo de 60 min, mientras que en agua y solución fisiológica fue de 30 min. El valor máximo alcanzado de Abs_{532} fue 0,13 y 0,12 en agua y solución fisiológica, respectivamente, mientras que en buffer fue 0,03. Aunque la mayor velocidad de formación de dienos conjugados se observó en buffer, la reacción en forma global estuvo fuertemente inhibida como se observa según el valor máximo alcanzado de Abs_{234}= 0,11. En agua y solución fisiológica estos valores fueron 0,51 y 0,59 respectivamente.

Las **figuras 4.6 D-F** muestran las mismas tendencias observadas en LS aunque los LNS presentan mucho menor producción de dienos conjugados y TBARS.

Si comparamos los iniciadores de reacción, Fe^{2+} fue un iniciador de peroxidación mucho más eficiente que Fe^{3+} cualquiera sea el medio acuoso de reacción o el tipo de liposoma empleado.

Tabla 4.2. Datos cinéticos de la peroxidación lipídica de liposomas de lípidos de retina sonicados y no sonicados, empleando Fe^{2+} y Fe^{3+} como iniciadores de reacción.

		LIPOSOMAS SONICADOS						**LIPOSOMAS NO SONICADOS**					
		TBARS			**DIENOS CONJUGADOS**			**TBARS**			**DIENOS CONJUGADOS**		
		Agua	NaCl	Tris	Agua	NaCl	Tris	Agua	NaCl	Tris	Agua	NaCl	Tris
Fe^{2+}	Tiempo retardo (min)	30	0	60	7	0	0	30	0	60	16	2	0
	Velocidad. inicial (D.O./h)	0.22	0.54	0.06	2.07	4.8	1.20	0.13	0.26	0.06	0.73	1.35	0.87
	Valor máximo (D.O.)	0.24	0.22	0.08	0.88	0.75	0.40	0.21	0.21	0.08	0.78	0.44	0.34
Fe^{3+}	Tiempo retardo (min)	30	30	60	0	0	0	30	60	60	0	0	0
	Velocidad. inicial (D.O./h)	0.06	0.05	0.01	0.23	3	3.75	0.03	0.04	0.03	0.27	0.84	0.55
	Valor máximo (D.O.)	0.13	0.12	0.03	0.51	0.59	0.11	0.07	0.07	0.03	0.23	0.17	0.04

Los valores informados son promedios de tres determinaciones. NaCl: solución fisiológica NaCl 0,15 M; Tris: buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4.

4.4. Discusión

En el presente capítulo buscamos implementar un sistema modelo de peroxidación cuyo comportamiento se asemeje más al de una membrana biológica que simples soluciones de lípidos en cloroformo. Para ello estudiamos liposomas formados con lípidos de un tejido altamente susceptible a la peroxidación como lo es la retina. Las membranas biológicas presentes en retina son indudablemente sistemas complejos. Para evitar esta complejidad y las reacciones colaterales que se darían en retinas enteras, utilizamos un sistema modelo de membranas simplificado formado por sus lípidos dispersos en forma de liposomas. En este tipo de sistemas es posible monitorear la reacción de peroxidación modificando las condiciones en los que ésta se desarrolla. Vesículas de fosfolípidos son frecuentemente empleadas como sistemas modelo para estudiar los principios físicos del comportamiento biológico de las membranas.

El tamaño de los liposomas en los distintos medios acuosos fue estudiado por dispersión dinámica de luz (DLS), una técnica que permite determinar los radios hidrodinámicos de las partículas suspendidas. Con esta técnica también se obtuvo el índice de polidispersidad que es un parámetro que indica la distribución de los diámetros de las partículas en sistemas coloidales. Cuanto menor es su valor, la distribución de diámetros de partículas es más estrecha, por lo que las partículas muestran una mayor uniformidad de tamaño (Ruozi y col, 2005). Según los resultados obtenidos por esta técnica concluimos que, como era de esperarse, los LS fueron más pequeños que los LNS y presentaron una distribución de tamaño más uniforme. Los LNS presentaron distribuciones bi- y hasta tri-modales.

En sistemas compartimentalizados tales como liposomas, es de suponer que los inductores de formación de radicales libres, como Fe^{2+} y Fe^{3+} empleados en nuestro estudio, se localizan en el medio externo y deben alcanzar las cadenas de PUFAs inmersas en la bicapa lipídica para poder iniciar la reacción de lipoperoxidación. Por lo tanto, para que la reacción pueda iniciarse, los iones de metales de transición junto con el oxígeno deberían ingresar a la bicapa lipídica. Una mayor permeabilidad al agua de la bicapa puede claramente, colaborar con este proceso. Muchos estudios físicos sobre la estructura de las bicapas fosfolipídicas propusieron que el empaque de las cadenas acídicas depende en parte del radio de curvatura de las vesículas (Talbot y col, 1997; Korstanje y col, 1989). Los LS poseen un radio hidrodinámico que oscila entre 76,4 y 83,3 nm, lo que determina que debido a su gran curvatura poseen una exposición de las cadenas acídicas al agua mayor que la de LNS (Rh=190-320 nm). Sumado a este efecto, los LNS sólo exponen al medio pro-oxidante su capa lipídica

más externa (Schnitzer y col, 2007). Li y colaboradores (2000) demostraron que las diferencias en la peroxidación de cada tipo de liposoma no se deben a artefactos del proceso de sonicado sino a las propiedades estructurales de los liposomas, donde los liposomas pequeños presentan un área superficial disponible, una curvatura y un empaque de ácidos grasos muy diferente a la observada en vesículas más planares. Nuestros resultados sustentan esta hipótesis dado que ninguno de los tipos de liposomas analizados produjo niveles detectables de TBARS antes del agregado del iniciador. Sin embargo, la sensibilidad del ensayo de TBARS no es necesariamente suficiente para detectar niveles de productos de descomposición de LOOHs que sí pueden ser suficientes para promover la reacción de peroxidación.

Los dienos conjugados se forman durante la reorganización de los dobles enlaces que se produce durante la peroxidación de PUFAs. Los TBARS son productos derivados de la ruptura de estos ácidos grasos peroxidados. Entre las diferentes condiciones de trabajo empleadas la mayor y más rápida producción de TBARS se obtuvo en solución fisiológica y agua, mientras que en buffer Tris-HCl 20 mM la cantidad de TBARS producida fue notablemente disminuida y retardada. La formación de dienos conjugados también se encontró disminuida en buffer con respecto a agua y solución fisiológica. Fischer y colaboradores (1979) demostraron que buffer Tris forma complejos con iones metálicos lo que explicaría la menor disponibilidad del pro-oxidante y por lo tanto, la menor peroxidación lipídica observada en este medio. Aikens y Dix (1992) analizaron el efecto de la fuerza iónica sobre la peroxidación lipídica iniciada por HOO• y ROO•. Las mayores velocidades de peroxidación lipídica en solución fisiológica se atribuyen a cambios en la fuerza iónica de la solución antes que a reacciones de interacción específica con los iones. La formación de dienos conjugados, en los primeros pasos de la reacción, introduce un grupo hidroperoxilo relativamente polar en el medio hidrofóbico de la bicapa (Buettner, 1993). Esto puede alterar la localización de los lípidos en la bicapa. Más aún, la degradación de los hidroperóxidos resulta en la escisión de las cadenas hidrocarbonadas. Los fragmentos resultantes se particionan entre el medio acuoso y la bicapa. Los efectos específicos de la peroxidación lipídica incluyen cambios en el empaquetamiento de los lípidos de membrana, lo que modifica todas sus propiedades físicas medibles.

El ión ferroso puede promover la peroxidación lipídica por la formación de radicales hidroxilos en reacciones Fenton, ruptura de hidroperóxidos lipídicos preformados o generación de H_2O_2 consumida por la reacción Fenton (Pazos y col, 2006). Casi todos los lípidos contienen al menos trazas de peróxidos. Estudios de oxidación lipídica en sistemas coloidales acuosos sugieren que, durante la propagación, la interacción entre hidroperóxidos lipídicos (LOOH) y

metales de transición es la causa más común de inestabilidad oxidativa (Frankel, 1998; Fukuzawa y col, 1993; Mei y col, 1998). Si los peróxidos son removidos, el hierro no induce peroxidación. Se propusieron dos vías a través de las cuales ocurriría la iniciación dependiente de LOOH (Nacka y col, 2001): (a) escisión de LOOH por Fe^{3+} y subsecuente abstracción de hidrógeno por LOO• (reacciones 1 y 2)

$$Fe^{3+} + LOOH \rightarrow Fe^{2+} + LOO\bullet + H^{+} \quad (1)$$

$$LOO\bullet + LH \rightarrow LOOH + L\bullet \quad (2)$$

y (b) ruptura de LOOH por Fe^{2+}generando radicales alcoxilo (reacciones 3 y 4)

$$Fe^{2+} + LOOH \rightarrow Fe^{3+} + LO\bullet + OH^{-} \quad (3)$$

$$LO\bullet + LH \rightarrow L\bullet + LOH \quad (4)$$

Muchos estudios han investigado la oxidación inducida por hierro en liposomas y se han descripto diferentes cinéticas de oxidación. El pro-oxidante más usual en experimentos *in vitro* a pH neutro es el hierro no hemínico, siendo el ión ferroso mucho más potente que el férrico (Ottolenghi, 1959; Thiele y Huff, 1960). Si el hierro no es agregado deliberadamente al sistema, el hierro presente como contaminante de los reactivos utilizados puede ser suficiente para actuar como catalizador. En algunos estudios se observó una fase de retardo (fase *lag*) sin acumulación de productos de peroxidación. Se hipotetizó que este retardo es el tiempo necesario para alcanzar una relación óptima 1:1 entre Fe^{2+} y Fe^{3+} requerida para iniciar la oxidación (Djuric y col, 2001). En algunos estudios se observó que la peroxidación iniciada por Fe^{2+} presentó dos fases: una fase rápida que se produce en corto tiempo seguida de una fase lenta de oxidación (Moyzuraityte y col, 2006a; Moyzuraityte y col, 2006b; Genot y col, 1994). Sin embargo, el mecanismo de oxidación en esas dos fases no fue clarificado. Nuestros resultados, observados en agua y buffer Tris, concuerdan con estas observaciones dado que las fases de retardo son evidentes y sustentarían la hipótesis de que es necesario llegar a un equilibrio entre Fe^{2+} y Fe^{3+} para dar inicio a la reacción.

Mozuraityte y colaboradores (2008) propusieron un ciclo de reciclado entre Fe^{2+} y Fe^{3+} en la peroxidación de liposomas. En ese estudio concluyeron que el Fe^{2+} produce una escisión de peróxidos preformados generando radicales alcoxilos que propagan la peroxidación lipídica consumiéndose oxígeno. Cuando se alcanza el equilibrio entre Fe^{2+} y Fe^{3+} la tasa de consumo de oxígeno es constante. Según este estudio la reacción de Fe^{3+} con peróxidos fue más lenta

que con Fe^{2+}, efecto que también observamos en nuestro sistema. La menor eficiencia de peroxidación observada con Fe^{3+} podría deberse a que esta especie posee mayor susceptibilidad al pH que Fe^{2+}. Los altos pHs utilizados en nuestro trabajo (cercanos a 7) hacen que Fe^{3+} forme su correspondiente hidróxido. Los hidróxidos de hierro formados juegan un papel determinante sobre la concentración de hierro activo sobre la superficie del liposoma.